

Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

Учредители

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Сибирское отделение Российской академии наук

Главный редактор

В.К. Шумный – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Россия)

Заместители главного редактора

Н.А. Колчанов – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Россия)

И.Н. Леонова – д-р биол. наук (Россия)

Н.Б. Рубцов – д-р биол. наук, профессор (Россия)

Ответственный секретарь

Г.В. Орлова – канд. биол. наук (Россия)

Редакционный совет

Л.И. Афтанас – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
В.С. Баранов – чл.-кор. РАН, д-р мед. наук (Россия)
Л.А. Беспалова – академик РАН, д-р с.-х. наук (Россия)
А. Бёрнер – д-р наук (Германия)
М.И. Воевода – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
И. Гроссе – д-р наук, проф. (Германия)
Г.Л. Дианов – д-р биол. наук, проф. (Великобритания)
Ю.Е. Дуброва – д-р биол. наук, проф. (Великобритания)
Н.Н. Дыгало – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
И.К. Захаров – д-р биол. наук, проф. (Россия)
И.А. Захаров-Гезехус – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
С.Г. Инге-Вечтомов – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
И.Е. Керкис – д-р наук (Бразилия)
А.В. Кильчевский – чл.-кор. НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)
С.В. Костров – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)
А.В. Кочетов – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция)
Б. Люгтенберг – д-р наук, проф. (Нидерланды)
В.И. Молодин – академик РАН, д-р ист. наук (Россия)
В.П. Пузырев – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
А.Ю. Ржецкий – канд. биол. наук, проф. (США)
И.Б. Рогозин – канд. биол. наук (США)
А.О. Рувинский – д-р биол. наук, проф. (Австралия)
Е.А. Салина – д-р биол. наук, проф. (Россия)
К.Г. Скрябин – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
К.В. Славин – д-р наук, проф. (США)
В.А. Степанов – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
И.А. Тихонович – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
Е.К. Хлесткина – д-р биол. наук, профессор (Россия)
Л.В. Хотылева – академик НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)
Э.К. Хуснутдинова – д-р биол. наук, проф. (Россия)
М.Ф. Чернов – д-р мед. наук (Япония)
С.В. Шестаков – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
Н.К. Янковский – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Редакционная коллегия

Т.Г. Амстиславская – д-р биол. наук (Россия)
Е.Е. Андронов – канд. биол. наук (Россия)
Ю.С. Аульченко – д-р биол. наук (Россия)
Д.А. Афонников – канд. биол. наук, доцент (Россия)
Е.В. Березиков – канд. биол. наук, проф. (Нидерланды)
С.А. Боринская – д-р биол. наук (Россия)
П.М. Бородин – д-р биол. наук, проф. (Россия)
Т.А. Гавриленко – д-р биол. наук (Россия)
В.Н. Даниленко – д-р биол. наук, проф. (Россия)
С.А. Демаков – д-р биол. наук (Россия)
Е.А. Долгих – д-р биол. наук (Россия)
Ю.М. Константинов – д-р биол. наук, проф. (Россия)
О. Кребс – д-р биол. наук, проф. (Германия)
И.Н. Лаврик – канд. хим. наук (Германия)
Д. Ларкин – д-р биол. наук (Великобритания)
Л.А. Лутова – д-р биол. наук, проф. (Россия)
В.Ю. Макеев – чл.-кор. РАН, д-р физ.-мат. наук (Россия)
М.П. Мошкин – д-р биол. наук, проф. (Россия)
Е. Песцова – д-р биол. наук (Германия)
Н.А. Проворов – д-р биол. наук, проф. (Россия)
Д.В. Пышный – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)
А.В. Ратушный – канд. биол. наук (США)
М.Г. Самсонова – д-р биол. наук (Россия)
Е. Турусупов – канд. биол. наук (Казахстан)
М. Чен – д-р биол. наук (Китайская Народная Республика)
Ю. Шавруков – д-р биол. наук (Австралия)

Scientific Peer Reviewed Journal

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

VAVILOVSKII ZHURNAL GENETIKI I SELEKTSII

*Founded in 1997**Published 8 times annually***Founders**

Federal State Budget Scientific Institution "The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences"
The Vavilov Society of Geneticists and Breeders
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Editor-in-Chief

V.K. Shumny, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

Deputy Editor-in-Chief

N.A. Kolchanov, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.N. Leonova, Dr. Sci. (Biology), Russia
N.B. Rubtsov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

Executive Secretary

G.V. Orlova, Cand. Sci. (Biology), Russia

Editorial council

L.I. Aftanas, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
V.S. Baranov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
L.A. Beshpalova, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Agric.), Russia
A. Börner, Dr. Sci., Germany
M.F. Chernov, Dr. Sci. (Medicine), Japan
G.L. Dianov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain
Yu.E. Dubrova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain
N.N. Dygalo, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
J. Le Gouis, Dr. Sci., France
I. Grosse, Professor, Dr. Sci., Germany
S.G. Inge-Vechtomov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.E. Kerkis, Dr. Sci., Brazil
E.K. Khlestkina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
L.V. Khotyleva, Full Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus
E.K. Khusnutdinova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
A.V. Kilchevsky, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus
A.V. Kochetov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
S.V. Kostrov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia
B. Lugtenberg, Professor, Dr. Sci., Netherlands
V.I. Molodin, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (History), Russia
V.P. Puzyrev, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
I.B. Rogozin, Cand. Sci. (Biology), United States
A.O. Ruvinsky, Professor, Dr. Sci. (Biology), Australia
A.Yu. Rzhetsky, Professor, Cand. Sci. (Biology), United States
E.A. Salina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
S.V. Shestakov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
K.G. Skryabin, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
K.V. Slavin, Professor, Dr. Sci., United States
V.A. Stepanov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.A. Tikhonovich, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
M.I. Voevoda, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
N.K. Yankovsky, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.K. Zakharov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.A. Zakharov-Gezekhus, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

Editorial board

D.A. Afonnikov, Associate Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia
T.G. Amstislavskaya, Dr. Sci. (Biology), Russia
E.E. Andronov, Cand. Sci. (Biology), Russia
Yu.S. Aulchenko, Dr. Sci. (Biology), Russia
E.V. Berezikov, Professor, Cand. Sci. (Biology), Netherlands
S.A. Borinskaya, Dr. Sci. (Biology), Russia
P.M. Borodin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
M. Chen, Dr. Sci. (Biology), People's Republic of China
V.N. Danilenko, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
S.A. Demakov, Dr. Sci. (Biology), Russia
E.A. Dolgikh, Dr. Sci. (Biology), Russia
T.A. Gavrilenko, Dr. Sci. (Biology), Russia
Yu.M. Konstantinov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
O. Krebs, Professor, Dr. Sci. (Biology), Germany
D. Larkin, Dr. Sci. (Biology), Great Britain
I.N. Lavrik, Cand. Sci. (Chemistry), Germany
L.A. Lutova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
V.Yu. Makeev, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Physics and Mathem.), Russia
M.P. Moshkin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
E. Pestsova, Dr. Sci. (Biology), Germany
N.A. Provorov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
D.V. Pyshnyi, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia
A.V. Ratushny, Cand. Sci. (Biology), United States
M.G. Samsonova, Dr. Sci. (Biology), Russia
Y. Shavrukov, Dr. Sci. (Biology), Australia
E. Turuspekov, Cand. Sci. (Biology), Kazakhstan

801

ОТ РЕДАКТОРА

Пятая международная научная конференция PlantGen2019.

А.В. Кочетов, Е.А. Салина

Актуальные технологии генетики растений

803

ОБЗОР

Генетический анализ на основе гаплотипов: проблемы и перспективы.

Д. Сегал, С. Дрейзигакер (на англ. языке)

809

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Обнаружение CRISPR-кассет и генов *cas* в геноме *Arabidopsis thaliana*.

Ю.М. Константинов, И.С. Петрушин

817

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Геномная конституция и дифференциация субгеномов эндемичных сибирских и дальневосточных видов рода *Elymus* (Poaceae) по данным секвенирования ядерного гена *waxy*. А.В. Агафонов, С.В. Асбаганов, Е.В. Шабанова (Кобозева), И.В. Морозов, А.А. Бондарь

Цитогенетика растений

827

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Создание и изучение интрогрессивных линий мягкой пшеницы, полученных на основе синтетической формы RS7.

Р.О. Давоян, И.В. Бебякина, Э.Р. Давоян, Д.С. Миков, Ю.С. Зубанова, Д.М. Болдаков, Е.Д. Бадаева, И.Г. Адонина, Е.А. Салина, А.Н. Зинченко

836

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Идентификация унивалентных хромосом у моносомных линий хлопчатника *Gossypium hirsutum* L. с помощью цитогенетических маркеров. М.Ф. Санамьян, Ш.У. Бобохужаев

846

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Создание и характеристика линии мягкой пшеницы с центрической транслокацией T2DL.2RL.

Ю.Н. Иванова, Л.А. Соловей, Д.Б. Логинова, Е.Е. Мирошникова, Н.И. Дубовец, О.Г. Силкова

Устойчивость растений к биотическим факторам

856

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Влияние хозяин-специфичного токсина SnTOX3 патогена *Stagonospora nodorum* на сигнальный путь этилена и редокс-статус растений мягкой яровой пшеницы.

С.В. Веселова, Г.Ф. Бурханова, Т.В. Нужная, С.Д. Румянцев, И.В. Максимов

865

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Индукцированная устойчивость представителей рода *Triticum* к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum* Rond. С.Д. Румянцев, С.В. Веселова, Г.Ф. Бурханова, И.В. Максимов

873

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Эндофитные бактерии *Bacillus* spp. с РНКазной активностью и устойчивостью картофеля к вирусам. Г.Ф. Бурханова, А.В. Сорокань, Е.А. Черепанова, Е.Р. Сарварова, Р.М. Хайруллин, И.В. Максимов

879

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Фитопатологический скрининг и молекулярный анализ гермоплазмы пшеницы из Казахстана и СИММУТ на устойчивость к пиренофорозу.

А.М. Кохметова, М.Н. Атишова, М.Т. Кумарбаева, И.Н. Леонова (на англ. языке)

887

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Идентификация локусов количественных признаков устойчивости к листовой и стеблевой ржавчинам мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с использованием картирующей популяции Памяти Азиева × Парагон. Ю.А. Гениевская, Е.Н. Федоренко, А.Т. Сарбаев, А.Ы. Амалова, С.И. Абуғалиева, С. Гриффис, Е.К. Турусбеков (на англ. языке)

896

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Семейство генов дегидрогеназ коричневого спирта вовлечено в ответ устойчивых и восприимчивых генотипов льна на заражение *Fusarium oxysporum*. Р.О. Новаковский, Л.В. Повхова, Г.С. Краснов, Т.А. Рожмина, А.А. Жученко, Л.П. Кудрявцева, Е.Н. Пушкова, П. Кезимана, А.В. Кудрявцева, А.А. Дмитриев, Н.В. Мельникова (на англ. языке)

Генетические ресурсы растений

902

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Сравнительная оценка variability ядерного и хлоропластного генома лука-порея (*Allium porrum* L.). Е.А. Дьяченко, Т.М. Середин, М.А. Филюшин

910

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Изучение линий мягкой пшеницы селекции Национального центра зерна им. П.П. Лукьяненко по аллельным вариантам генов *Waxy*. Э.Р. Давоян, Л.А. Беспалова, Р.О. Давоян, Е.В. Агаева, Г.И. Букреева, Ю.С. Зубанова, Д.С. Миков, Д.М. Болдаков

- 916 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Фенотипическое проявление аллеля низкостебельности *Rht-B1p (Rht-17)* у яровой твердой пшеницы в двух климатических условиях. А.Г. Черноок, П.Ю. Крупин, Л.А. Беспалова, В.В. Панченко, В.Я. Ковтуненко, М.С. Баженов, Л.А. Назарова, Г.И. Карлов, А.Ю. Крупина, М.Г. Дивашук
- 926 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Формирование и изучение коллекционного генофонда ресурсных видов рода *Miscanthus* Anderss. в условиях лесостепи Западной Сибири. О.В. Дорогина, О.Ю. Васильева, Н.С. Нуждина, Л.В. Буглова, Е.В. Жмудь, Г.А. Зуева, О.В. Комина, И.С. Кубан, А.С. Гусар, Р.В. Дудкин
- 933 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Особенности ресурсного вида *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack. при интродукции в Западной Сибири. Ю.А. Гисматулина, В.В. Будаева, Г.В. Сакович, О.Ю. Васильева, Г.А. Зуева, А.С. Гусар, О.В. Дорогина
- 941 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Влияние условий выращивания различных генотипов гуара (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) на свойства камеди семян. И.В. Кручина-Богданов, Е.В. Мирошниченко, Р.А. Шаухаров, Е.Н. Кантемирова, М.А. Головина, К.М. Абдуллаев, А.В. Балашов, Е.В. Русинова, П.Г. Русинов, Е.К. Потокина
- Исправление**
- 949 **Исправление к статье «Применение полногеномной амплификации для генетической оценки эмбрионов коров»**
К.С. Пантюх, И.В. Рукин, С.М. Портнов, А. Хатиб, С.Л. Пантелеев, А.М. Мазур

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

CONTENTS • 2019 • 23 • 7

- 801 **FROM THE EDITOR**
The Fifth International Scientific Conference PlantGen2019.
A.V. Kochetov, E.A. Salina
- Mainstream technologies in plant genetics**
- 803 **REVIEW**
Haplotypes-based genetic analysis: benefits and challenges. D. Sehgal, S. Dreisigacker
- 809 **ORIGINAL ARTICLE**
Detection of CRISPR cassettes and *cas* genes in the *Arabidopsis thaliana* genome.
Yu.M. Konstantinov, I.S. Petrushin
- 817 **ORIGINAL ARTICLE**
Genome constitution and differentiation of subgenomes in Siberian and Far Eastern endemic species of the genus *Elymus* (Poaceae) according to the sequencing of the nuclear gene *waxy*. A.V. Agafonov, S.V. Asbaganov, E.V. Shabanova (Kobozeva), I.V. Morozov, A.A. Bondar
- Plant cytogenetics**
- 827 **ORIGINAL ARTICLE**
The development and study of common wheat introgression lines derived from the synthetic form RS7. R.O. Davoyan, I.V. Bebyakina, E.R. Davoyan, D.S. Mikov, Yu.S. Zubanova, D.M. Boldakov, E.D. Badaeva, I.G. Adonina, E.A. Salina, A.N. Zinchenko
- 836 **ORIGINAL ARTICLE**
Identification of univalent chromosomes in monosomic lines of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by means of cytogenetic markers. M.F. Sanamyran, Sh.U. Bobokhujayev
- 846 **ORIGINAL ARTICLE**
The creation and characterization of the bread wheat line with a centric translocation T2DL.2RL. Yu.N. Ivanova, L.A. Solovey, D.B. Loginova, E.E. Miroshnikova, N.I. Dubovets, O.G. Silkova
- Resistance of plants to biotic factors**
- 856 **ORIGINAL ARTICLE**
Effect of the host-specific toxin SnTOX3 from *Stagonospora nodorum* on ethylene signaling pathway regulation and redox-state in common wheat. S.V. Veselova, G.F. Burkhanova, T.V. Nuzhnaya, S.D. Rumyantsev, I.V. Maksimov
- 865 **ORIGINAL ARTICLE**
Induced resistance to the greenbug aphid *Schizaphis graminum* Rond. in species of the genus *Triticum*. S.D. Rumyantsev, S.V. Veselova, G.F. Burkhanova, I.V. Maksimov
- 873 **ORIGINAL ARTICLE**
Endophytic *Bacillus* bacteria with RNase activity in the resistance of potato plants to viruses. G.F. Burkhanova, A.V. Sorokan, E.A. Cherepanova, E.R. Sarvarova, R.M. Khairullin, I.V. Maksimov
- 879 **ORIGINAL ARTICLE**
Phytopathological screening and molecular marker analysis of wheat germplasm from Kazakhstan and CIMMYT for resistance to tan spot. A.M. Kokhmetova, M.N. Atishova, M.T. Kumarbayeva, I.N. Leonova
- 887 **ORIGINAL ARTICLE**
Identification of QTLs for resistance to leaf and stem rusts in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) using a mapping population of 'Pamyati Azieva × Paragon'. Y. Genievsкая, Y. Fedorenko, A. Sarbayev, A. Amalova, S. Abugalievа, S. Griffiths, Y. Turuspekov
- 896 **ORIGINAL ARTICLE**
The cinnamyl alcohol dehydrogenase gene family is involved in the response to *Fusarium oxysporum* in resistant and susceptible flax genotypes. R.O. Novakovskiy, L.V. Povkhova, G.S. Krasnov, T.A. Rozhmina, A.A. Zhuchenko, L.P. Kudryavtseva, E.N. Pushkova, P. Kezimana, A.V. Kudryavtseva, A.A. Dmitriev, N.V. Melnikova
- Plant genetics resources**
- 902 **ORIGINAL ARTICLE**
Nuclear and chloroplast genome variability in leek (*Allium porrum* L.). E.A. Dyachenko, T.M. Seredin, M.A. Filyushin
- 910 **ORIGINAL ARTICLE**
Allelic variants for *Waxy* genes in common wheat lines bred at the Lukyanenko National Grain Center. E.R. Davoyan, L.A. Bespalova, R.O. Davoyan, E.V. Agaeva, G.I. Bukreeva, Yu.S. Zubanova, D.S. Mikov, D.M. Boldakov

- 916 ORIGINAL ARTICLE
Phenotypic effects of the dwarfing gene *Rht-17* in spring durum wheat under two climatic conditions. A.G. Chernook, P.Yu. Kroupin, L.A. Bespalova, V.V. Panchenko, V.Ya. Kovtunenکو, M.S. Bazhenov, L.A. Nazarova, G.I. Karlov, A.Yu. Kroupina, M.G. Divashuk
- 926 ORIGINAL ARTICLE
The formation and the study of a collection of the *Miscanthus* resource species gene pool in the conditions of the West Siberian forest steppe. O.V. Dorogina, O.Yu. Vasilyeva, N.S. Nuzhdina, L.V. Buglova, E.V. Zhmud, G.A. Zueva, O.V. Komina, I.S. Kuban, A.S. Gusar, R.V. Dudkin
- 933 ORIGINAL ARTICLE
Features of the resource species *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack. when introduced in West Siberia. Yu.A. Gismatulina, V.V. Budaeva, G.V. Sakovich, O.Yu. Vasilyeva, G.A. Zueva, A.S. Gusar, O.V. Dorogina
- 941 ORIGINAL ARTICLE
Impact of growing conditions on the gum properties of different genotypes of guar (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.). I.V. Kruchina-Bogdanov, E.V. Miroshnichenko, R.A. Shaukharov, E.N. Kantemirova, M.A. Golovina, K.M. Abdullaev, A.V. Balashov, E.V. Rusinova, P.G. Rusinov, E.K. Potokina

Erratum

- 949 Erratum to: "The use of whole genome amplification for genomic evaluation of bovine embryos"
K.S. Pantiukh, I.V. Rukin, S.M. Portnov, A. Khatib, S.L. Panteleev, A.M. Mazur

Пятая международная научная конференция PlantGen2019

Дорогие читатели! Седьмой выпуск журнала тематический, он посвящен Пятой международной научной конференции «Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений» (PlantGen2019), которая состоялась 24–29 июня 2019 г. в новосибирском Академгородке. Организаторами конференции выступили Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирский государственный университет, Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, межрегиональная общественная организация «Вавиловское общество генетиков и селекционеров», Новосибирская областная общественная организация «Вавиловское общество генетиков и селекционеров», EUCARPIA (European Association for Research on Plant Breeding – Европейская ассоциация по исследованию селекции растений). В работе конференции приняли участие около 300 ученых из 19 стран.

Большинство докладов первой конференции PlantGen (Новосибирск, 2010 г.) было посвящено пшенице – исключительно важной для человечества зерновой культуре. Это обуславливалось результатами, полученными сотрудниками Института цитологии и генетики по данной теме, и вхождением института в крупный международный консорциум по секвенированию генома пшеницы (IWGSC).

Сейчас, спустя десятилетие программа конференции существенно расширилась. В пленарных и ключевых докладах на тематических секциях были рассмотрены новейшие достижения в области изучения структурно-функциональной организации генома растений и применения полученных данных для решения практических задач растениеводства. Прозвучали сообщения, посвященные самым разным сельскохозяйственным культурам и их использованию в селекции и функциональном питании, оценке устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессам, развитию биотехнологии растений в постгеномную эру, системной биологии растений и цифровым технологиям. Для детального обсуждения отдельных методов исследований, в том числе эффективных подходов, направленных на сопровождение селекционного процесса, были организованы дополнительные секции по селекции растений в XXI в., цитогенетике растений в геномную и постгеномную эру, ассоциативному картированию.

На секции «Генетические ресурсы растений для селекции и функциональных продуктов питания» обсуждалось современное состояние исследований по хранению и изучению коллекций растений в различных генбанках. Основной акцент был сделан на актуальные направления изучения коллекций для решения генетических задач, а также их использование в селекции и при создании функциональных продуктов питания.

В центре внимания секции «Устойчивость растений к фитопатогенам и другим биотическим стрессам» оказались работы по поиску новых генов устойчивости к биотическим факторам внешней среды. Механизмы фор-



мирования устойчивости растений к засухе, морозам и пониженным температурам, засолению и устойчивости растений к токсическим металлам были представлены в докладах секции «Генетические и эпигенетические механизмы устойчивости растений к абиотическим стрессам». Актуальной задачей признан поиск генетических и эпигенетических факторов, определяющих устойчивость растений к абиотическому стрессу.

В биотехнологии растений, направленной на создание новых форм растений с улучшенными признаками, можно выделить несколько подходов. Предметом рассмотрения на секции «Биотехнология растений в постгеномную эру» были современные подходы, связанные с использованием методов генетической, хромосомной и клеточной инженерии, а также геномного редактирования. Большой интерес вызвали исследования, нацеленные на ускорение создания растений с заранее заданным генотипом с помощью комбинированных биотехнологических подходов.

Секция «Системная биология растений и цифровые технологии» была посвящена геномным и постгеномным методам анализа структурно-функциональной организации генома и интеграции полученных знаний в системную биологию растений. В рамках секции обсуждались вопросы по разработке и использованию генетических моделей для решения задач системной биологии. Особый акцент сделан на методах биоинформатического анализа и сборки *de novo* секвенированных геномов растений. В последние годы существенно расширился круг растительных объектов, для которых получены данные полногеномного секвенирования, и встает вопрос, как успешно интегрировать эти данные в системную биологию, для того чтобы вплотную подойти к пониманию закономерностей организации и функционирования генома растений, реализу-



емого в процессе развития и взаимодействия организма с окружающей средой. Для решения поставленного вопроса было рассмотрено использование методов системной биологии у растительных организмов, различающихся по размерам и пloidности геномов.

В настоящее время генетические технологии активно внедряются в селекционные процессы. На параллельной секции «Селекция растений в XXI веке» обсуждались насущные задачи селекции растений и возможности их решения с помощью методов маркер-ориентированной и геномной селекции, а также современных подходов в геномном редактировании.

На секции «Ассоциативное картирование для диссекции признаков и выявление генов-кандидатов» была показана актуальность данного методического подхода для изучения генетических основ хозяйственно ценных признаков. Технология идентификации генов, контролирующих хозяйственно ценные признаки растений, разно-

образна. Докладчики представили наиболее эффективные методы ассоциативного картирования для генома растений и подходы, повышающие уровень достоверности полученных результатов.

В связи с массовым широкомасштабным секвенированием геномов растений существенно изменились направления применения методов цитогенетики для изучения генома растений. Эти актуальные вопросы были поставлены на секции «Цитогенетика растений в геномную и постгеномную эру» с учетом современных технологий изучения генетического материала и новых методик анализа цифровых изображений.


Помимо докладов, важной частью работы на конференции является неформальное общение ученых, которое нередко выливается в совместные исследовательские проекты. Не стала исключением и конференция PlantGen2019, по итогам которой достигнут ряд важных договоренностей между ее участниками.

*А.В. Кочетов,
член-корреспондент РАН, директор ИЦиГ СО РАН,
председатель конференции PlantGen2019*


*Е.А. Салина,
профессор, главный научный сотрудник ИЦиГ СО РАН,
сопредседатель конференции PlantGen2019*

The Fifth International Scientific Conference PlantGen2019

Haplotypes-based genetic analysis: benefits and challenges

D. Sehgal , S. Dreisigacker

International Center for Maize and Wheat Improvement (CIMMYT), Texcoco, México

 e-mail: d.sehgal@cgiar.org

The increasing availability of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) discovered by Next Generation Sequencing will enable a range of new genetic analyses in crops, which was not possible before. Concomitantly, researchers will face the challenge of handling large data sets at the whole-genome level. By grouping thousands of SNPs into a few hundred haplotype blocks, complexity of the data can be reduced with fewer statistical tests and a lower probability of spurious associations. Owing to the strong genome structure present in breeding lines of most crops, the deployment of haplotypes could be a powerful complement to improve efficiency of marker-assisted and genomic selection. This review describes in brief the commonly used approaches to construct haplotype blocks and some examples in animals and crops are cited where haplotype-based dissection of traits were proven beneficial. Some important considerations and facts while working with haplotypes in crops are reviewed at the end.


Key words: haplotype; GWAS; genomic selection; SNP.

For citation: Sehgal D., Dreisigacker S. Haplotypes-based genetic analysis: benefits and challenges. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(7):803-808. DOI 10.18699/VJ19.37-o

Генетический анализ на основе гаплотипов: проблемы и перспективы

Д. Сегал , С. Дрейзигакер

Международный центр улучшения кукурузы и пшеницы (CIMMYT), Тексоко, Мексика

 e-mail: d.sehgal@cgiar.org

Возросшая доступность однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), разработанных с помощью технологий секвенирования нового поколения (NGS), позволяет проводить генетические исследования культурных растений, которые ранее были невозможны. Одновременно с этим ученые сталкиваются с необходимостью обработки больших массивов данных, полученных на основе полногеномного скрининга. Сложность обработки и интерпретации экспериментальных данных может быть уменьшена за счет сокращения числа статистических тестов и снижения вероятности ложных ассоциаций путем группировки тысяч SNP в несколько сотен блоков гаплотипов. Благодаря устойчивой структуре генома в селекционных линиях большинства культур, построение гаплотипов может стать мощным дополнением для повышения эффективности маркер-ориентированной и геномной селекции. В настоящем обзоре кратко перечислены подходы, традиционно применяемые для конструирования гаплотипных блоков, а также приведены успешные примеры исследований, проведенных на культурных растениях и животных, по диссекции хозяйственно важных признаков на основе гаплотипного анализа. Представлены выводы и важные заключения, сделанные по результатам изучения генома культурных растений с использованием подхода, основанного на анализе гаплотипов.

Key words: гаплотип; GWAS; геномная селекция; SNP.

Introduction

Advances in Next Generation Sequencing (NGS) technologies by whole genome (Berkman et al., 2012; Chia et al., 2012), transcriptome (Cavanagh et al., 2013), reduced-representation (Elshire et al., 2011; Poland et al., 2012) and/or exome sequencing (Winfield et al., 2016) have led to new levels of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) discovery. Hence, a paradigm shift from marker-based to sequencing-based genotyping of breeding populations and diversified germplasm panels has been observed in the post-genome sequencing era. These developments have facilitated development of high-density maps, identification of Quantitative Trait Loci (QTL) and discovery of new genes in several crops, thus assisting the

breeding process (Sehgal et al., 2016, 2017; Singh et al., 2016; Pandey et al., 2017; Su et al., 2017). Especially polyploid crops such as wheat have benefited from these advances, as marker number and density were major gaps in conducting in depth genetic analyses. Dense sets of SNPs now available from different marker platforms [90K Illumina iSelect, Genotyping-by-Sequencing (GBS), Diversity Array Technology Sequencing (DArTseq), high-density Affymetrix Axiom[®] genotyping array] have significantly upgraded the genetic toolkit available in wheat. Therefore, rapidly growing numbers of breeding lines are being genotyped at low cost (Poland, 2015). In addition, whole genome sequence (>15 Gb) of wheat is now available, by combining next generation (short Illumina reads)

and third generation sequencing data (long Pacific Biosciences reads), which will make cloning of genes feasible (Shi, Ling, 2018).

With upsurge in dense marker data sets coming from different genotyping platforms leading to more markers than observations, scientists will face the challenge of handling large data sets at the whole-genome level for both reliable gene discovery and genomic predictions. Therefore, new approaches will be required to deal with cumbersome data and to make analysis easier. Constructing haplotypes from SNPs is one of the options to deal with bulky datasets. Being multiallelic, haplotypes are more informative than SNPs and allow more powerful and less exhaustive genome-wide scan. In this review, we have first defined what haplotypes are and what approaches are available to make haplotypes. Many examples are cited in animals and crops where haplotypes-based analysis have yielded better results than using SNPs in Genome Wide Association studies (GWAS), Genomic Prediction (GP) and in candidate gene identification.

What are haplotype blocks?

A haplotype block defines a region in the genome that comprises a set of neighboring SNPs, whereby their phased alleles are likely inherited together with little chance of contemporary recombination (Fig. 1). Mainly, three approaches are used to construct haplotype blocks: (1) user-defined length, (2) sliding-window, and (3) linkage disequilibrium (LD). Any of these three methods can be used depending on the skills of the user and/or on the objective of the research. The user-defined fixed length of haplotype blocks (2 to 15 bp) is the easiest approach; however, generated haplotypes do not reflect any biological phenomenon such as LD (Gabriel et al., 2002) or shared evolutionary history (Templeton et al., 2005). The sliding-window approach is the most widely used, and has been used intensively for building haplotypes in GWAS for quantitative or qualitative traits. In this method, a genomic region under study is divided into windows, either of uniform-size or variable-size (Tang et al., 2009), and a multiple-marker association test is performed for each window. This approach is easy to use and handle, however, when adjacent SNPs are in strong LD, it provides redundant information thus making the sliding-window approach no more informative than a SNP. Similarly, when LD pattern vary over large genomic regions, it is difficult to determine window-size for a genome-wide scan. The LD-based approaches are the most advantageous because they focus directly on the detection of historical recombination in a given population and LD coefficients are easy to visualize.

Today most genomic analyses such as GWAS or GP use bi-allelic SNP markers. However, SNPs can be combined into short, multi-allelic haplotypes to overcome bi-allelic problem and to perform a powerful and less exhaustive genome scan. By using haplotype blocks, information on multiple markers jointly can be used and hence local epistatic interactions can be naturally modelled, and the reduced number of parameters enables a range of genomic analyses including GWAS, GP, and/or detection of selection signatures. Further, haplotype blocks can be coded in a simple numeric (binary) form to be used in different R codes or Java-based programs. Figure 2 shows how a haplotype block composed of two adjoining

SNPs and having four alleles (AC, GT, AT and GC) can be converted to a simple binary 1-0 format.

Case studies in animals and humans

GWAS studies based on haplotypes are common in animals and humans (Grapes et al., 2004; Hayes et al., 2007; Calus et al., 2009; Shim et al., 2009; Khankhanian et al., 2015; Jónás et al., 2016; Sato et al., 2016). Studies have generated plethora of evidences to establish that multi-allelic haplotypes significantly improve the power and robustness of association as compared with individual SNPs. A common observation in SNP-based GWAS is the large gap between the variance explained by the identified SNP-associations and the total variance, termed as the 'missing heritability'. J. Yang et al. (2010) showed that a part of the 'missing heritability' could be attributed to a lack of LD between SNP markers and causative variants. Combining neighboring SNPs into haplotype blocks is a simple way to generate a more complete LD. It has been shown that the use of haplotype-based methods have reduced the heritability gap in many cases compared with SNP-based methods when both were applied to the same dataset. P. Khankhanian et al. (2015) investigated the genetic basis of Multiple Sclerosis (MS), a complex genetic disorder in humans controlled by a major histocompatibility complex (MHC) on the short arm of chromosome 6. Haplotypes of various lengths (from 1 up to 15 contiguous SNPs) were constructed at each of the 110 previously identified, MS-associated, genomic regions. The results based on haplotypes outperformed the results using individual SNPs by at least three orders of magnitude. Moreover, when 932 MS-associated haplotypes (identified from 102 genomic regions) were included as independent variables into a logistic linear model; the amount of MS heritability was 38 %, while with individual SNPs it was 29 %.

Simulations based on the LD and population history of livestock have shown that haplotypes can provide greater QTL detection power and mapping accuracy than single markers (Hayes et al., 2007; Calus et al., 2009). Use of haplotypes have also led to the discovery of new genetic regions of interest, which have not been identified by a SNP-based GWAS (Lu et al., 2003; Hagenblad et al., 2004; Shim et al., 2009). W. Barendse (2011) showed that haplotype analysis improved evidence for candidate genes for intramuscular fat (IMF) percentage in cattle as they explained around 80 % more of the phenotypic variance for the five genes that showed some evidence of association to IMF compared to individual SNP analyses. Further studies in animal breeding have also accumulated evidences that integration of haplotypes or haplotype-tagged QTL in genomic selection models can improve GP accuracies for complex traits (Boichard et al., 2012; Cuyabano et al., 2014, 2015a, b; Jónás et al., 2016; Hess et al., 2017; Jiang et al., 2018).

Case studies in crops

Although only a few case studies have been reported in crops, results have been encouraging towards haplotype-based analyses. A.J. Lorenz et al. (2010) used a sliding window approach and explored the utility of haplotype blocks over individual SNPs for GWAS in barley. They used heading date collected on a large set of barley germplasm from the Barley Coordi-

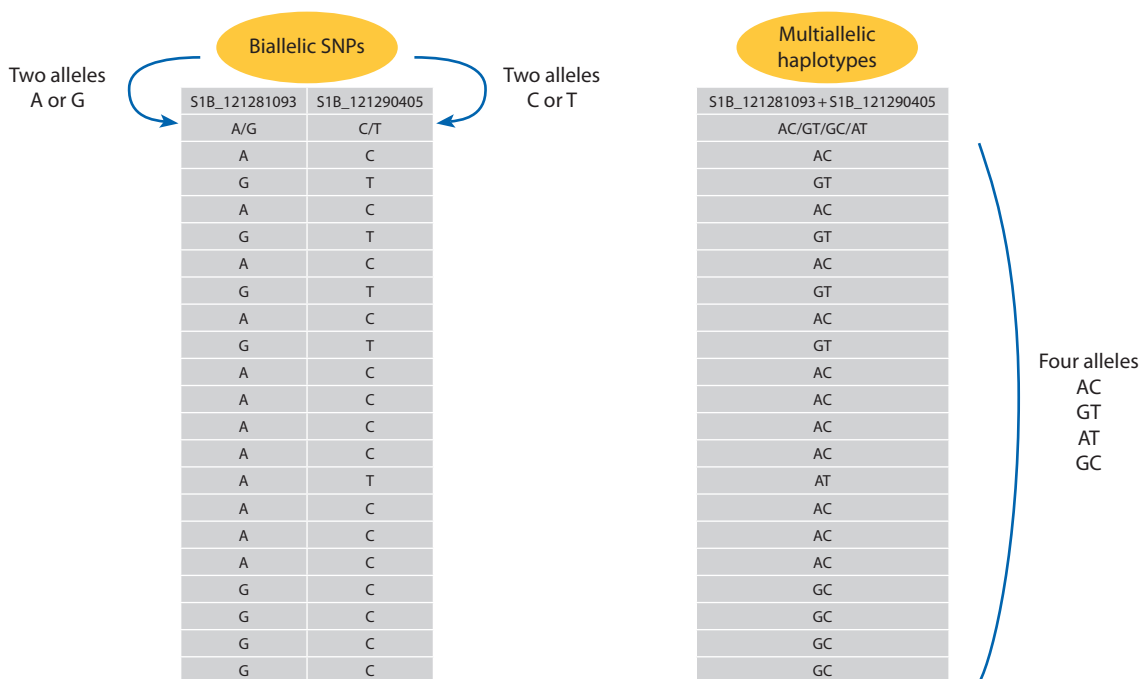


Fig. 1. Two close SNPs shown on the left side, each with two alleles. Haplotypes formed by combining these two SNPs are shown on the right side resulting in four alleles.

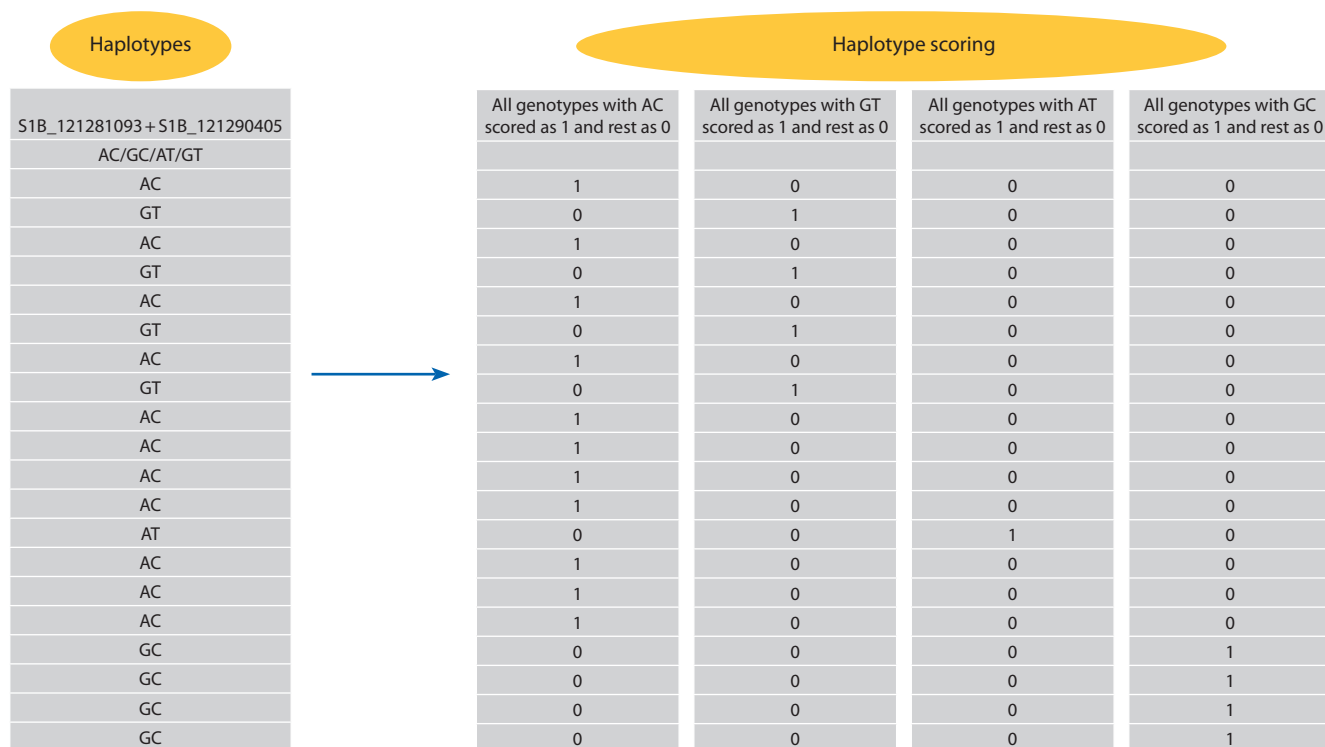


Fig. 2. Strategy to convert haplotypes to binary format to be used in well known R scripts and Java-based platforms for genetic analysis.

nated Agricultural Project. Three associations were found for heading date, two of which were detected by haplotype analyses only. Further, the authors determined the effect of three sets of QTL simulations. The power of individual SNP-based analysis was superior to that of haplotypes when the causal SNP was present in genotyping data. In the absence of

causal SNP, haplotypes-based GWAS was more powerful to detect QTL than SNPs. In the latter case, however, the type of method used to construct haplotype blocks affected power of the GWAS. Y. Ma et al. (2016) studied the effect of marker preselection on the prediction accuracy in soybean on plant height and yield per plant. The three strategies tested were

(a) a random SNP sampling method (RSM), (b) a haplotype block analysis-based sampling (HBA), and (c) even SNP sampling method (ESM). They found that for grain yield, prediction accuracy increased by approximately 4 % based on HBA-based approach compared with RSM and ESM.

Y. Lu et al. (2012) conducted comparative LD mapping using SNPs and haplotype blocks to identify QTL for plant height and biomass under drought stress in maize. They used a 10 kb sliding-window approach accounting for the average length of LD to construct haplotype blocks. Using haplotype-based LD mapping, three and 12 significant haplotypes were identified for plant height and biomass, respectively, of which six haplotypes contained at least one SNP that was also significantly associated with the specific trait revealed by SNP-based LD mapping. The haplotype-based analysis explained higher phenotypic variation (on average 2.9 %) than SNPs for both traits.

A few genetic studies have attempted to model the effect of interactions between haplotypes (epistasis) on quantitative traits in crops. Some examples include the vernalization response in barley (Cockram et al., 2007) and chlorophyll content in rapeseed (Qian et al., 2016).

Studies in wheat (published and ongoing)

In wheat, studies are so far very few where haplotypes-based genetic analysis have been conducted. K. Voss-Fels et al. (2017) explored molecular interactions connecting root and shoot development and growth in European elite wheat germplasm to investigate plant's demand for water and nutrients along with its ability to access them. They mapped two highly significant haplotypes for root biomass in close proximity to a major locus known to affect spike development. It was concluded that possibly, strong selection for a haplotype variant controlling heading date, has eliminated a specific combination of two flanking, highly conserved haplotype variants whose interaction confers increased root biomass. Breeders could reverse this consequence of selection to recover root diversity that may be useful under stress environments.

N'Diaye et al. (2017) conducted a SNP- and haplotype-based GWAS of semolina and pasta color in elite durum wheat lines. They combined SNPs within a window size of 5.3 cM (based on average LD decay) on the same chromosome to form haplotype blocks. Haplotype-based GWAS resulted in an increase of the phenotypic variance explained (50.4 % on average) and the allelic effect (33.7 % on average) compared to SNP-based GWAS.

In the past decade, various high-throughput genotyping platforms have been adopted by CIMMYT including the 20K and 90K Illumina iSelect SNP arrays, the Breeders' 35K Axiom® array (Affymetrix), DArTseq GBS. As a result, large data sets have been generated on different sets of germplasm. Several SNP-based GWAS studies have been performed (reviewed in Dreisigacker et al., 2019) and haplotype-based GWAS has been initially tested. A latest example include haplotype-based quantification of exotic (landrace, synthetics, etc.) genome imprints in pre-breeding germplasm (Singh et al., 2018). A set of 984 pre-breeding lines (PBLs) generated by a three-way cross (exotic/elite1//elite2) were genotyped with DArTseq and phenotyped for a range of agronomic traits under stress environments. Haplotype blocks, generated using

the LD approach, identified 361 and 367 blocks in PBLs and exotics, respectively. Haplotype block-by-block comparison on each chromosome revealed that 58 (16 %) blocks identified in PBLs were exotic-specific. Further, a rare and favorable haplotype (GT) was identified on chromosome 6D that minimized grain yield (GY) loss under heat stress without penalty under irrigated conditions.

A large GWAS using haplotypes and individual SNPs was performed for GY and superiority index P_i (measure of GY stability) using a large set of advanced bread wheat lines (4,302), which were genotyped with GBS markers and phenotyped under contrasting (irrigated and stress) environments (unpublished work). The average R^2 explained by haplotypes and SNPs showed a 6.1 to 9.9 % higher variation with the haplotype-based GWAS as compared to the individual SNP-based GWAS for GY and P_i (Sehgal et al. personal communication). We further explored whether integrating haplotype-tagged QTL for GY as fixed variables in prediction models improved prediction accuracy. It was observed that the model accounting for the haplotype-based GWAS results as fixed effects led to up to 9 to 10 % increase in prediction accuracy, whereas it was only 4 to 5 % with SNP-tagged QTL. Similarly, haplotype-based GWAS conducted for thousand-grain weight identified four major loci in CIMMYT germplasm; all the four loci showed higher p values than the associated individual SNPs on chromosomes 4A and 6A.

Considerations and challenges

Due to the growing availability of SNP datasets in crops, haplotype-based approaches for genomic analyses is likely to increase markedly. However, the power of analyses using haplotypes vs. SNPs must be evaluated on a case-by-case basis, as risk factors are common for both approaches. For example, under certain disease models (simple Mendelian or complex multi-gene additive or epistatic inheritance) and certain LD patterns one method outperforms the other, so different architectures of QTL and LD patterns interact with marker characteristics to influence power in GWAS. Similarly, bottlenecks are known to increase LD and shift allele frequency spectra toward higher minor allele frequencies. Hence, after a bottleneck, SNPs are more likely to be in LD with QTL and haplotypes might provide little advantage. Marker ascertainment is another important criterion and is a characteristic of SNP chips. In the standard method of developing a SNP chip or an array, a small SNP discovery panel is used, which means that low frequency mutations often go undetected and SNPs occurring at intermediate to high frequencies dominate in such chips or arrays. This over-sampling of mutations at intermediate frequencies results in lower levels of LD than if SNPs were selected randomly. For GP, haplotype-based prediction approaches are favored only if alleles at QTL are more closely linked to the haplotype than to individual SNPs. Finally, map order errors can play a significant role in determining the safe and best approach for analysis. For example, SNP analysis is unlikely to be affected by ordering errors and hence is the best approach when map order is doubtful.

References

Barendse W. Haplotype analysis improved evidence for candidate genes for intramuscular fat percentage from a genome wide association study of cattle. *PLoS One*. 2011;6(12):e29601.

- Berkman P.J., Lai K., Lorenc M.T., Edwards D. Next-generation sequencing applications for wheat crop improvement. *Am. J. Bot.* 2012;99:365-371.
- Boichard D., Guillaume F., Baur A., Croiseau P., Rossignol M.N., Boscher M.Y., Druet T., Genestout L., Colleau J.J., Journaux L., Ducrocq V., Fritz S. Genomic selection in French dairy cattle. *Anim. Prod. Sci.* 2012;52:115-120.
- Calus M.P., Meuwissen T.H., Windig J.J., Knol E.F., Schrooten C., Veerijken A.L.J., Veerkamp R.F. Effects of the number of markers per haplotype and clustering of haplotypes on the accuracy of QTL mapping and prediction of genomic breeding values. *Genet. Sel. Evol.* 2009;41(1):11.
- Cavanagh C.R., Chao S., Wang S., Huang B.E., Stephen S., Kiani S., Forrest K., Sainenac C., Brown-Guedira G.L., Akhunova A., See D., Bai G., Pumphrey M., Tomar L., Wong D., Kong S., Reynolds M., da Silva M.L., Bockelman H., Talbert L., Anderson J.A., Dreisigacker S., Baenziger S., Carter A.K., Morrell P.L., Dubcovsky J., Morrell M.K., Sorrells M.E., Hayden M.J., Akhunov E. Genome-wide comparative diversity uncovers multiple targets of selection for improvement in hexaploid wheat landraces and cultivars. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013;110:8057-8062.
- Chia J.-M., Song C., Bradbury P.J., Costich D., de Leon N., Doebley J., Elshire R.J., Gaut B., Geller L., Glaubitz J.C., Gore M., Guill K.E., Holland J., Hufford M.B., Lai J., Li M., Liu X., Lu Y., McCombie R., Nelson R., Poland J., Prasanna B.M., Pyhäjärvi T., Rong T., Sekhon R.S., Sun Qi, Tenaillon M.I., Tian F., Wang J., Xu X., Zhang Z., Kaeppeler S.M., Ross-Ibarra J., McMullen M.D., Buckler E.S., Zhang G., Xu Y., Ware D. Maize HapMap2 identifies extant variation from a genome in flux. *Nat. Genet.* 2012;44:803-807.
- Cockram J., Chiapparino E., Taylor S.A., Stamati K., Donini P., Laurie D.A., O'Sullivan D.M. Haplotype analysis of vernalization loci in European barley germplasm reveals novel *VRN-H1* alleles and a predominant winter *VRN-H1/VRN-H2* multi-locus haplotype. *Theor. Appl. Genet.* 2007;115:993-1001.
- Cuyabano B.C., Su G., Lund M.S. Genomic prediction of genetic merit using LD-based haplotypes in the Nordic Holstein population. *BMC Genomics.* 2014;15(1):1171.
- Cuyabano B.C., Su G., Lund M.S. Selection of haplotype variables from a high-density marker map for genomic prediction. *Genet. Sel. Evol.* 2015a;47(1):61.
- Cuyabano B.C., Su G., Rosa G.J.M., Lund M.S., Gianola D. Bootstrap study of genome-enabled prediction reliabilities using haplotype blocks across Nordic Red cattle breeds. *J. Dairy Sci.* 2015b;98(10):7351-7363.
- Dreisigacker S., Sehgal D., Singh R.P., Sansaloni C., Braun J.H. Application of genetic and genomic tools in wheat for developing countries. In: Miedaner T., Korzun V. (Eds.). *Application of Genetic and Genomic Research in Cereals.* Woodhead Publ., 2019;251-271.
- Elshire R.J., Glaubitz J.C., Sun Q., Poland J.A., Kawamoto K., Buckler E.S., Mitchell S.E. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One.* 2011;6:e19379.
- Gabriel S.B., Schaffner S.F., Nguyen H., Moore J.M., Roy J., Blumenstiel B., Higgins J., DeFelice M., Lochner A., Faggart M., Liu-Cordero S.N., Rotimi C., Adeyemo A., Cooper R., Ward R., Lander E.S., Daly M.J., Altshuler D. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science.* 2002;296:2225-2229.
- Grapes L., Dekkers J.C.M., Rothschild M.F., Fernando R.L. Comparing linkage disequilibrium-based methods for fine mapping quantitative trait loci. *Genetics.* 2004;166:1561-1570.
- Hagenblad J., Tang C.L., Molitor J., Werner J., Zhao K., Zheng H., Marjoram P., Weigel D., Nordborg M. Haplotype structure and phenotypic associations in the chromosomal regions surrounding two *Arabidopsis thaliana* flowering time loci. *Genetics.* 2004;168(3):1627-1638.
- Hayes B.J., Chamberlain A.J., McPartlan H., Macleod I., Sethuraman L., Goddard M.E. Accuracy of marker-assisted selection with single markers and marker haplotypes in cattle. *Genet. Res.* 2007;89(4):215-220.
- Hess M., Druet T., Hess A., Garrick D. Fixed-length haplotypes can improve genomic prediction accuracy in an admixed dairy cattle population. *Genet. Sel. Evol.* 2017;3:49(1):54.
- Jiang Y., Schmidt R.H., Reif J.C. Haplotype-based genome-wide prediction models exploit local epistatic interactions among markers. *G3: Genes Genomes Genetics.* 2018;8(5):1687-1699.
- Jónás D., Ducrocq V., Fouilloux M.-N., Croiseau P. Alternative haplotype construction methods for genomic evaluation. *J. Dairy Sci.* 2016;99:4537-4546.
- Khankhanian P., Gourraud P.A., Lizee A., Goodin D.S. Haplotype-based approach to known MS-associated regions increases the amount of explained risk. *J. Med. Genet.* 2015;52:587-594.
- Lorenz A.J., Hamblin M.T., Jannink J.L. Performance of single nucleotide polymorphisms versus haplotypes for genome-wide association analysis in barley. *PLoS One.* 2010;5(11):e14079.
- Lu X., Niu T.H., Liu J.S. Haplotype information and linkage disequilibrium mapping for single nucleotide polymorphisms. *Genome Res.* 2003;13(9):2112-2117.
- Lu Y., Xu J., Yuan Z., Hao Z., Xie C., Li X., Shah T., Lan H., Zhang S., Rong T., Xu Y. Comparative LD mapping using single SNPs and haplotypes identifies QTL for plant height and biomass as secondary traits of drought tolerance in maize. *Mol. Breed.* 2012;30(1):407-418.
- Ma Y., Reif J.C., Jiang Y., Wen Z., Wang D., Liu Z., Guo Y., Wei S., Wang S., Yang C., Wang H., Yang C., Lu W., Xu R., Zhou R., Wang R., Sun Z., Chen H., Zhang W., Wu J., Hu G., Liu C., Luan X., Fu Y., Guo T., Han T., Zhang M., Sun B., Zhang L., Chen W., Wu C., Sun S., Yuan B., Zhou X., Han D., Yan H., Li W., Qiu L. Potential of marker selection to increase prediction accuracy of genomic selection in soybean (*Glycine max* L.). *Mol. Breed.* 2016;36:113.
- N'Diaye A., Haile J.K., Cory A.T., Clarke F.R., Clarke J.M., Knox R.E., Pozniak C.J. Single marker and haplotype-based association analysis of semolina and pasta colour in elite durum wheat breeding lines using a high-density consensus map. *PLoS One.* 2017;12(1):e0170941.
- Pandey M.K., Agarwal G., Kale S.M., Clevenger J., Nayak S.N., Sriswathi M., Chitkineni A., Chavarro C., Chen X., Upadhyaya H.D., Vishwakarma M.K., Leal-Bertioli S., Liang X., Bertioli D.J., Guo B., Jackson S.A., Ozias-Akins P., Varshney R.K. Development and evaluation of a high density genotyping 'Axiom_Arachis' array with 58 K SNPs for accelerating genetics and breeding in groundnut. *Sci. Rep.* 2017;7:40577.
- Poland J. Breeding-assisted genomics. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2015;24:119-124.
- Poland J.A., Brown P.J., Sorrells M.E., Jannink J.-L. Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *PLoS One.* 2012;7:e32253.
- Qian L., Qian W., Snowdon R.J. Haplotype hitchhiking promotes trait coselection in *Brassica napus*. *Plant Biotechnol. J.* 2016;14:1578-1588.
- Sato S., Uemoto Y., Kikuchi T., Egawa S., Kohira K., Saito T., Sakuma H., Miyashita S., Arata S., Kojima T., Suzuki K. SNP- and haplotype-based genome-wide association studies for growth, carcass, and meat quality traits in a Duroc multigenerational population. *BMC Genetics.* 2016;17:60.
- Sehgal D., Autrique E., Singh R.P., Singh S., Ellis M., Dreisigacker S. Identification of genomic regions for grain yield and yield stability and their epistatic interactions. *Nat. Sci. Rep.* 2017;7:41578.
- Sehgal D., Dreisigacker S., Belen S., Küçüközdemir Ü., Mert Z., Özer E., Morgounov A. Mining centuries old *in situ* conserved Turkish wheat landraces for grain yield and stripe rust resistance genes. *Front. Genet.* 2016;18:7:201.
- Shi X., Ling H.-Q. Current advances in genome sequencing of common wheat and its ancestral species. *Crop J.* 2018;6(1):15-21.


- Shim H., Chun H., Engelman C.D., Payseur B.A. Genome-wide association studies using single-nucleotide polymorphisms versus haplotypes: an empirical comparison with data from the North American Rheumatoid Arthritis Consortium. *BMC Proc.* 2009;3(Suppl.7): S35.
- Singh S., Vikram P., Sehgal D., Burgueño J., Sharma A., Singh S.K., Sansaloni C.P., Joynson R., Brabbs T., Ortiz C., Solís-Moya E., Govindan V., Gupta N., Sidhu H.S., Basandrai A.K., Basandrai D., Ledesma-Ramires L., Suaste-Franco M.P., Fuentes-Dávila G., Moreno J.I., Sonder K., Singh V.K., Singh S., Shokat S., Arif M.A.R., Laghari K.A., Srivastava P., Bhavani S., Kumar S., Pal D., Jaiswal J.P., Kumar U., Chaudhary H.K., Crossa J., Payne T.S., Imtiaz M., Sohu V.S., Singh G.P., Bains N.S., Hall A., Pixley K.V. Harnessing genetic potential of wheat germplasm banks through impact-oriented-prebreeding for future food and nutritional security. *Nat. Sci. Rep.* 2018;8:12527.
- Singh V.K., Khan A.W., Saxena R.K., Kumar V., Kale S.M., Sinha P., Chitikineni A., Pazhamala L.T., Garg V., Sharma M., Sameer Kumar C.V., Parupalli S., Vechalapu S., Patil S., Muniswamy S., Ghanta A., Yamini K.N., Dharmaraj P.S., Varshney R.K. Next-generation sequencing for identification of candidate genes for *Fusarium* wilt and sterility mosaic disease in pigeonpea (*Cajanus cajan*). *Plant Biotechnol. J.* 2016;14:1183-1194.
- Su C., Wang W., Gong S., Zuo J., Li S., Xu S. High density linkage map construction and mapping of yield trait QTLs in maize (*Zea mays*) using the genotyping-by-sequencing (GBS) technology. *Front. Plant Sci.* 2017;8:706.
- Tang R., Feng T., Sha Q., Zhang S. A variable-sized sliding-window approach for genetic association studies via principal component analysis. *Ann. Hum. Genet.* 2009;73:631-637.
- Templeton A.R., Maxwell T., Posada D., Stengard J.H., Boerwinkel E., Sing C.F. Tree scanning: a method for using haplotype trees in phenotype/genotype association studies. *Genetics.* 2005;169: 441-453.
- Voss-Fels K.P., Qian L., Parra-Londono S., Uptmoor R., Frisch M., Keeble-Gagnère G. Linkage drag constrains the roots of modern wheat. *Plant Cell Environ.* 2017;40:717-725.
- Winfield M., Allen A., Burrige A., Barker G., Benbow H., Wilkinson P., Coghill J., Waterfall C., Davassi A., Scopes G., Pirani A., Webster T., Brew F., Bloor C., King J., West C., Griffiths S., King I., Bentley A., Edwards K. High-density SNP genotyping array for hexaploid wheat and its secondary and tertiary gene pool. *Plant Biotechnol. J.* 2016;14(5):1195-1206.
- Yang J., Benyamin B., McEvoy B.P., Gordon S., Henders A.K., Nyholt D.R. Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. *Nat. Genet.* 2010;42:565-569.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received June 3, 2019. Revised September 4, 2019. Accepted September 4, 2019. Published online October 8, 2019.


Пятая международная научная конференция PlantGen2019

Обнаружение CRISPR-кассет и генов *cas* в геноме *Arabidopsis thaliana*

Ю.М. Константинов^{1, 2} , И.С. Петрушин²

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

² Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия


 e-mail: yukon@sifibr.irk.ru

Современный уровень знаний в области эволюции растительных вирусов позволяет отнести проблему генетических основ противовирусного иммунитета высших растений (в том числе важнейших сельскохозяйственных культур) к разряду наиболее актуальных проблем генетики и селекции. В соответствии с эндосимбиотической теорией принято считать, что митохондрии произошли от альфа-протеобактерий, которые были поглощены, но не подвергнуты деструкции клеткой-хозяином. В связи с открытием у прокариот CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats – CRISPR-associated proteins) систем, выполняющих функцию адаптивного иммунитета, возникает вопрос, мог ли подобный механизм противовирусной защиты быть подхвачен эволюцией и использован представителями эукариот, например растениями. Задачей настоящей работы был анализ полных последовательностей ядерного, митохондриального и хлоропластного геномов *Arabidopsis thaliana* с целью поиска генетических элементов, сходных с таковыми в CRISPR-Cas системах у бактерий и архей. В результате методами *in silico* в митохондриальном геноме экотипов *A. thaliana* обнаружен локус регулярно перемежающихся коротких прямых повторов, соответствующий по своей организации CRISPR-локусу адаптивного CRISPR-Cas иммунитета прокариот. На вероятную связь обнаруженного в митохондриальном геноме высшего растения локуса с функцией адаптивного иммунитета указывает наличие у спейсерных последовательностей в составе найденной CRISPR-кассеты гомологии с геномом вируса мозаики цветной капусты, поражающего растения арабидопсиса. У линий арабидопсиса C24 и Ler последовательности повторов и спейсеров CRISPR-кассеты полностью идентичны. В то же время локализация самого CRISPR-локуса в митохондриальном геноме этих линий существенно различается. Установлено, что у линии Col-0 в результате четырех делеций и одной инсерции CRISPR-кассета полностью нарушена. Хотя гены *cas* в митохондриальном геноме исследуемых экотипов арабидопсиса не были найдены, установлено их наличие в ядерном геноме. В ядерном геноме экотипа Col-0 на всех пяти хромосомах обнаружены гены *cas* и многочисленные CRISPR-касеты. Полученные результаты позволяют предположить существование у растений системы адаптивного иммунитета, аналогичного CRISPR-иммунитету бактерий и архей.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*; экотипы; митохондриальный геном; ядерный геном; CRISPR-кассета; гены *cas*; гомология CRISPR-спейсеров; геном растительного вируса; адаптивный иммунитет; РНК-интерференция.


Для цитирования: Константинов Ю.М., Петрушин И.С. Обнаружение CRISPR-кассет и генов *cas* в геноме *Arabidopsis thaliana*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(7):809-816. DOI 10.18699/VJ19.554

Detection of CRISPR cassettes and *cas* genes in the *Arabidopsis thaliana* genome

Yu.M. Konstantinov^{1, 2} , I.S. Petrushin²

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SB RAS, Irkutsk, Russia

² Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

 e-mail: yukon@sifibr.irk.ru

The state of the art in the evolution of plant viruses allows the genetic foundations of antiviral immunity in higher (including the most important crops) plants to be categorized as one of the most pressing issues of genetics and selection. According to the endosymbiotic theory, mitochondria descended from alphaproteobacteria that had been absorbed but not degraded by the host cell. The discovery of CRISPR-Cas systems (clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-associated proteins), which implement the adaptive immunity function in prokaryotes, raises the question whether such a mechanism of antiviral protection could be caught up by evolution and used by representatives of eukaryotes (in particular, plants). The purpose of this work was to analyze the complete sequences of nuclear, mitochondrial, and chloroplast genomes of *Arabidopsis thaliana* in order to search for genetic elements similar to those in CRISPR-Cas systems of bacteria and archaea. As a result, *in silico* methods helped us to detect a locus of regularly intermittent short direct repeats in the mitochondrial genome of *A. thaliana* ecotypes. The structure of this locus corresponds to the CRISPR locus of the prokaryotic adaptive

antiviral immune system. The probable connection between the locus found in the mitochondrial genome of the higher plant and the function of adaptive immunity is indicated by a similarity between the spacer sequences in the CRISPR cassette found and the genome of *Cauliflower mosaic virus* affecting *Arabidopsis* plants. Sequences of repeats and spacers of CRISPR cassettes in *Arabidopsis* C24 and Ler lines are perfectly identical. However, the locations of the CRISPR locus in the mitochondrial genomes of these lines differ significantly. The CRISPR cassette in the Col-0 line was found to be completely broken as a result of four deletions and one insertion. Although *cas* genes were not detected in the mitochondrial genome of the studied *Arabidopsis* ecotypes, their presence was detected in the nuclear genome. Both *cas* genes and numerous CRISPR cassettes were found on all the five chromosomes in the nuclear genome of the Col-0 ecotype. The results suggest the existence of a system of adaptive immunity in plants, which is similar to the CRISPR immunity of bacteria and archaea.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; ecotypes; mitochondrial genome; nuclear genome; CRISPR cassette; *cas* genes; homology of CRISPR spacers; plant virus genome; adaptive immunity; RNA interference.

For citation: Konstantinov Yu.M., Petrushin I.S. Detection of CRISPR cassettes and *cas* genes in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(7): 809-816. DOI 10.18699/VJ19.554 (in Russian)

Введение

В настоящее время признается бесспорным, что одним из важнейших событий в возникновении эукариотической клетки стало приобретение архейного происхождения хозяином в качестве эндосимбионта альфа-протеобактерии, давшей впоследствии начало митохондриям (Archibald, 2015). В последние годы методами филогеномики удалось получить принципиально новые данные, демонстрирующие возможность нескольких эволюционных сценариев возникновения эукариотической клетки, включающих «позднее» или «раннее» приобретение митохондрий клеткой-хозяином (Poole, Gribaldo, 2014; Pittis, Gabaldon, 2016). В связи с обнаружением у огромного числа видов бактерий и архей CRISPR-Cas системы адаптивного иммунитета, основанного на явлении РНК-интерференции (Jansen et al., 2002; Mojica et al., 2005; Makarova et al., 2006; Barrangou et al., 2007; Lander, 2016), естественным образом возникает вопрос, возможно ли существование подобной защитной системы у эукариотических митохондрий – органелл, имеющих очевидное эволюционное родство со своим бактериальным происхождением предками. Особый интерес в этом отношении представляют митохондрии высших растений, имеющие геном чрезвычайно большого размера по сравнению с геномами животных и дрожжей.

Митохондриальный геном растений отличается, помимо размеров, необычной динамичностью, проявляющейся в виде высокой рекомбинационной активности, которая обусловлена повторяющимися последовательностями (Gualberto, Newton, 2017). Результатом этой рекомбинационной активности являются образование набора субгеномных форм и высокая геномная вариабельность даже в пределах одного вида. Подобные изменения в геномной структуре приводят к быстрой эволюции митохондриального генома растений. Кроме того, митохондриальный геном высших растений активно участвует в процессах горизонтального переноса генов, где может выступать в качестве как донора, так и акцептора генов (Kleine et al., 2009; Zhao et al., 2018).

Еще одной важной особенностью митохондриального генома высших растений является наличие в органеллах у многих исследованных в этом отношении видов растений видоспецифических наборов линейных и кольцевых плазмид, состав которых в пределах вида может существенно

различаться, например, у фертильных и стерильных форм (Esser et al., 1986; Thomas, 1986). Происхождение митохондриальных плазмид до сих пор остается неизвестным. Предполагают, что двуцепочечные плазмиды могли быть внесены в клетки высших растений симбиотическим или патогенным путем (Douce, Neuburger, 1989). В поддержку этой гипотезы свидетельствует тот факт, что митохондриальные линейные плазмиды своим 5'-концом ассоциированы с белком, что напоминает структуру некоторых вирусных нуклеиновых кислот (Douce, Neuburger, 1989). Кроме того, в пользу вероятного вирусного происхождения линейных плазмид S1 и S2 митохондрий кукурузы свидетельствует обнаружение в них генов, кодирующих белки нуклеинового обмена вирусного типа (Kuzmin, Levchenko, 1987; Kuzmin et al., 1988). В последние годы наблюдается значительный прогресс в изучении митовирусов – вирусов с простейшим РНК-геномом, которые специфически инфицируют митохондрии грибов (Shahi et al., 2019). Однако при этом появляются также данные в пользу существования растительных митовирусов, которые, как предполагают, могли возникнуть в результате горизонтального переноса соответствующих генов от инфицирующих растения грибов (Marienfeld et al., 1997; Bruenn et al., 2015; Nibert et al., 2018). Таким образом, если проводить аналогии между бактериями и растительными митохондриями, у последних в ходе эволюции, подобно прокариотам, также имела острая потребность в защите от инфицирующих нуклеиновых кислот вирусного и/или плазмидного происхождения.

Тем не менее вплоть до недавнего времени данных о существовании подобного механизма защиты от патогенной ДНК у представителей эукариот получено не было, за исключением единичного факта обнаружения в работе (Mojica et al., 2000) типичного CRISPR-локуса на митохондриальной плазмиде высшего растения *Vicia faba*. Дальнейшего развития в направлении поиска генов *cas* в митохондриальном, хлоропластном и ядерном геномах этого растительного вида данная работа, однако, не получила. Сведений об обнаружении генетических элементов CRISPR-Cas иммунитета в ядерном геноме растений ранее также не было получено (Jansen et al., 2002).

С учетом эволюционного происхождения митохондрий и особенностей организации митохондриального генома растений в настоящей работе методами *in silico* предпри-

нята попытка поиска генетических элементов, сходных с элементами CRISPR-Cas систем бактерий и архей, в митохондриальном, хлоропластном и ядерном геномах модельного растения *Arabidopsis thaliana*. Принимая во внимание высокую динамичность митохондриального генома растений, полногеномный анализ с целью поиска элементов, предположительно связанных с признаком адаптивного CRISPR-Cas иммунитета, проводили в митохондриальном геноме трех экотипов *A. thaliana* (C24, Ler и Col-0).

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использованы полные последовательности ядерного генома (экотип Col-0), генома митохондрий (экотипы C24, Ler, Col-0) и генома хлоропластов (экотипы Ler, Col-0) модельного растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Последовательности ДНК взяты из базы GenBank (номера доступа ядерного генома NC_003070, NC_003071, NC_003074, NC_003075, NC_003076, митохондриального генома JF729200, JF729202, NC_037304 и генома хлоропластов KX551970, NC_000932). Изначально последовательности анализировали с помощью программы UGENE (Okonechnikov et al., 2012), она же применялась для построения иллюстраций (совместно с пакетом векторной графики Inkscape).

Поиск элементов CRISPR-Cas систем в геномах осуществлялся в онлайн-сервисе CRISPROne (Zhang, Ye, 2017). Для определения происхождения обнаруженных CRISPR-спейсеров выполнен поиск по базе NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) по вирусным таксонам с параметрами по умолчанию. В дальнейшем были отобраны случаи совпадения с числом отличий (mismatches) менее трех нуклеотидов.

Выравнивание последовательностей CRISPR-локуса в составе митохондриального генома экотипов *A. thaliana* проводилось программами Matcher (парное) (Rice et al., 2000) и MUSCLE (множественное) (Edgar, 2004). Анализ гомологии CRISPR-спейсеров с геномами видоспецифичных вирусов осуществлялся как в работе (Mihara et al., 2016), согласно Virus-Host DB (<https://www.genome.jp/virushostdb/3702>).

Результаты и обсуждение

К настоящему времени убедительно продемонстрировано, что критическими элементами CRISPR-Cas систем у бактерий и архей являются в общем случае CRISPR-локус, лидерная последовательность (an upstream leader sequence) и гены *cas* (Jansen et al., 2002; Richter et al., 2012). Основываясь на известном эволюционном родстве митохондрий и бактерий, мы осуществили поиск элементов CRISPR-Cas системы в митохондриальном геноме трех экотипов *A. thaliana* с использованием подходов и методов биоинформатики, широко применяемых в последние годы при изучении CRISPR-Cas систем прокариот (Jansen et al., 2002; Makarova et al., 2006, 2015; Grissa et al., 2007; Zhang, Ye, 2017; Couvin et al., 2018).

Контекстный анализ полной последовательности митохондриального генома *A. thaliana* таких экотипов, как C24 и Ler, позволил обнаружить сайт, структура которого полностью соответствует организации CRISPR-кассет

прокариотического происхождения. Особенности нуклеотидной организации CRISPR-подобного локуса в митохондриальном геноме данных экотипов представлены на рис. 1, а. Как видно из представленных данных, обнаруженная в митохондриальном геноме растительного происхождения CRISPR-касета образована тремя совершенными прямыми повторами длиной 20 п. н., разделенными двумя спейсерными последовательностями длиной 42 и 33 п. н. соответственно. В то же время полногеномный анализ митохондриальной ДНК экотипа Col-0 показал, что структура CRISPR-касеты в этом случае полностью нарушена в результате четырех делеций и одной инсерции в области повторов (см. рис. 1, б).

Примечательным, на наш взгляд, результатом проведенного анализа экотип-специфических особенностей характеристик митохондриальной CRISPR-касеты является тот факт, что при полном совпадении последовательности повторов и спейсеров локализация CRISPR-касеты (и ее нарушенного варианта) в митохондриальном геноме линий арабидопсиса C24, Ler и Col-0 существенно различается (рис. 2). Такие изменения локализации CRISPR-касеты в митохондриальной ДНК изучаемых экотипов арабидопсиса являются, по всей вероятности, результатом интенсивных перестроек митохондриального генома, обусловленных высокой рекомбинационной активностью, что характерно для митохондриального генома высших растений (Gualberto, Newton, 2017).

Специальный поиск позволил установить наличие многочисленных CRISPR-кассет в ядерном геноме *A. thaliana* (рис. 3). Их размеры и расположение на хромосомах представлены в электронном Приложении¹. Общее число спейсеров, содержащихся в 110 ядерных CRISPR-касетах, составляет 330. Подробный анализ гомологии спейсеров ядерных CRISPR-кассет с геномами растительных вирусов нами не проводился.

Результаты анализа спейсерных последовательностей в CRISPR-касете, локализованной в митохондриальной ДНК арабидопсиса с использованием базы данных растительных вирусов, суммированы в табл. 1. Установлено, что обнаруженные спейсеры имеют участки неслучайной гомологии с геномом трех штаммов вируса мозаики цветной капусты, который способен поражать растения *A. thaliana*. Дополнительно можно отметить, что для отдельных спейсеров были выявлены участки гомологии с несовпадающими участками генома разных штаммов этого вируса (данные не приводятся).

Поиск в митохондриальном геноме экотипов C24, Ler и Col-0 *A. thaliana* генов *cas* ни на последовательностях, непосредственно прилегающих к CRISPR-локусу, ни в остальных областях генома не дал положительных результатов. В то же время последовательности отдельных генов *cas* были обнаружены нами в ядерном геноме (табл. 2).

Проведенный *in silico* поиск позволил локализовать на трех хромосомах арабидопсиса (хромосомы 1, 2 и 3) ген *cas5*, входящий, в соответствии с существующей классификацией CRISPR-Cas систем (Makarova et al., 2015; Koonin et al., 2017), в состав эффекторного модуля CRISPR-Cas систем I типа. На хромосоме 3 помимо гена

¹ Приложение см. по адресу:

<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2019-23/appx18.pdf>



Рис. 1. Парное выравнивание (а) CRISPR-локуса экотипов C24 и Ler (повторы выделены жирным шрифтом) и множественное выравнивание (б) последовательностей CRISPR-локуса в митохондриальном геноме экотипов *A. thaliana*.

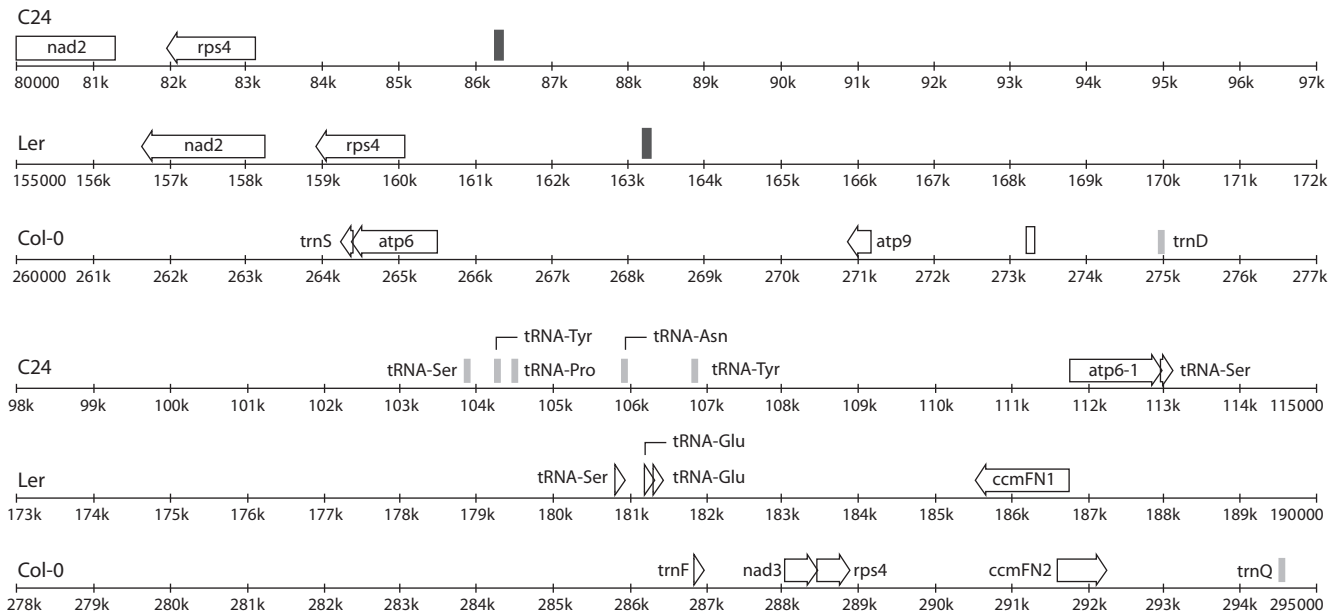


Рис. 2. Локализация CRISPR-кассеты в митохондриальном геноме экотипов *A. thaliana*.

Для линий C24 и Ler положение CRISPR-кассеты показано в виде черного прямоугольника. Для линии Col-0 положение нарушенной CRISPR-кассеты в митохондриальном геноме обозначено в виде незаполненного прямоугольника.

cas5 локализован ген *csm6*, кодирующий ассоциированную с CRISPR-Cas системой III-A типа РНКазу, которая у прокариот участвует в реализации противовирусного иммунитета путем деградации фаговых транскриптов (Jiang et al., 2016). В составе хромосомы 4 был обнаружен ген *csa5*, белковый продукт которого является универсальным компонентом CRISPR-Cas систем I-A типа (Daume et al., 2014). Данному белку приписывают роль в стабили-

зации R-петли в ходе протекания стадии интерференции (Daume et al., 2014). Наконец, в составе хромосомы 5 локализовано три участка разной длины, соответствующих гену *DEDDh*, который ранее был аннотирован в ядерном геноме арабидопсиса и является представителем генного семейства 3'→5' экзонуклеаз, участвующих в метаболизме малых некодирующих РНК (Chen et al., 2018). Отнесение *DEDDh* к генам *cas* может означать, что его белковый про-

Таблица 2. Характеристика обнаруженных в ядерном геноме *A. thaliana* генов *cas*

Хромосома	Ген	Тип CRISPR-Cas системы	Начало–конец OPC*	Идентификация гена <i>cas</i> в соответствии с классификацией (Makarova et al., 2015; Koonin et al., 2017)
1	<i>cas5</i>	I	11918718–11919893	COG1688
2	<i>cas5</i>	I	2540882–2541148	cd09693
3	<i>cas5</i>	I-B	12023929–12024258	mkCas0191
	<i>csm6</i>	III-A, III-D	10339967–10340668	cd09742
4	<i>csa5</i>	I-A	5072131–5072607	mkCas0163
5	<i>DEDDh</i>	I	9481429–9481962	cd06127
			9482093–9482377	
			9482399–9482647	
1	RT	I, III	11916164–11916466	pfam00078
			11916554–11917162	
2			10826–12517	
			17624–20293	
			23971–25653	
			30408–31532	
			3223463–3224872	
			3224999–3225685	
			3228729–3230522	
			5235099–5235800	
			5241327–5241869	
			5241873–5242298	
			5600424–5602496	
			5602506–5603024	
			5619463–5619846	
			5619956–5620156	
3			9435745–9436644	
			9436766–9437260	
			9444515–9444907	
			9445029–9445523	
			10341391–10343106	
			10343111–10343806	
			12021817–12022311	
			13167127–13168218	
			13174969–13175118	
			13175226–13175606	
			13467703–13469727	
			13469756–13470868	
			13476637–13477317	
			15489669–15490154	
15490132–15490506				
15493988–15496318				
4			3296005–3296457	
			3303483–3304247	
			3304260–3305717	
			3744233–3746887	
			3749914–3752901	
			3754635–3756176	
			5071003–5071551	
			5081577–5082176	
5			14576286–14579228	
			14582070–14582471	
			14582509–14584656	

* OPC – открытая рамка считывания.

митохондрии растений, если принять во внимание существование митовирусов, поражающих этот тип органелл (Marienfeld et al., 1997; Bruenn et al., 2015; Nibert et al., 2018), и природную компетентность растительных митохондрий к поглощению ДНК (Koulintchenko et al.,

2003). В целом, исходя из имеющейся на сегодняшний день информации, представляется преждевременным строить какие-либо гипотезы о возможном эволюционном происхождении элементов CRISPR-Cas системы в геноме арабидопсиса. Можно лишь заметить следующее. Сейчас

накоплено уже достаточно много экспериментальных фактов для реконструкции сценариев происхождения и эволюции CRISPR-Cas систем прокариот (Koonin, Makarova, 2019). Эти же данные, в свою очередь, могут оказаться полезными, если проблему происхождения CRISPR-Cas систем у растений попытаться рассмотреть с позиций эукариогенеза (Koonin, 2015; Lopez-Garia et al., 2017). В этом случае необходимо принять во внимание, что подобную систему защиты от патогенных нуклеиновых кислот мог иметь как альфа-протеобактериальный симбионт, давший начало митохондриям, так и, возможно, архейный хозяин протомитохондриального эндосимбионта. В принципе, наличия подобной защитной системы в эволюционном плане нельзя совершенно исключить и для цианобактериального предшественника современных хлоропластов.

На настоящем этапе изучения CRISPR-Cas систем у арабидопсиса нам не удалось идентифицировать известный для прокариот набор генов *cas*, продукты которых формируют модуль адаптации и эффекторный модуль CRISPR-Cas системы класса I и обеспечивают, таким образом, протекание стадий адаптации, экспрессии и интерференции (Koonin et al., 2017). Учитывая сведения о большом разнообразии найденных у бактерий и архей CRISPR-Cas систем (Westra et al., 2016; Koonin et al., 2017; Koonin, Makarova, 2019), естественно ожидать, что механизм адаптивного иммунитета у растений может существенно отличаться от такового у прокариот. В связи с этим, очевидно, что только использование комплексного подхода, включающего наряду с методами геномики методы транскриптомики и протеомики, позволит в дальнейшем составить более полное представление о генах и их белковых продуктах, образующих систему адаптивного иммунитета растений.

Заключение

В геноме высшего растения *A. thaliana* методами *in silico* впервые обнаружены такие элементы CRISPR-Cas системы прокариот, как CRISPR-касеты и гены *cas*, что может служить отправной точкой для проведения в дальнейшем детальных геномных, транскриптомных и протеомных исследований с использованием наряду с арабидопсисом более широкого набора видов растений (в том числе важнейших сельскохозяйственных) с целью определения групп генов, экспрессия которых может быть ассоциирована с работой природного механизма адаптивного иммунитета растений. Прикладное значение ожидаемых научных результатов по проблеме молекулярной природы адаптивного иммунитета растений трудно переоценить.

Список литературы / References

- Alkhnbashi O.S., Shah S.A., Garret R.A., Saundlers S.J., Costa F., Backhoven R. Characterizing leader sequences of CRISPR loci. *Bioinformatics*. 2016;32:i576-i585. DOI 10.1093/bioinformatics/btw454.
- Archibald J.M. Endosymbiosis and eukaryotic cell evolution. *Curr. Biology*. 2015;25:R911-R921. DOI 10.1016/j.cub.2015.07.055.
- Barrangou R., Freemaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007;315:1709-1712. DOI 10.1126/science.1138140.
- Bruenn J.A., Warner B.E., Yerramsetty P. Widespread mitovirus sequences in plant genomes. *PeerJ*. 2015;3:e876. DOI 10.7717/peerj.876.
- Chen J., Liu L., You C., Gu J., Ruan W., Zhang L., Gan J., Cao C., Huang Y., Chen X., Ma J. Structural and biochemical insights into small RNA 3' end trimming by *Arabidopsis* SDN1. *Nat. Commun*. 2018;9:3585. DOI 10.1038/s41467-018-05942-7.
- Couvin D., Bernheim A., Toffano-Nioche C., Touchon M., Michalik J., Néron B., Rocha E., Vergnaud G., Gautheret D., Pourcel C. CRISPRCasFinder, an update of CRISPRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Res*. 2018;46:W246-W251. DOI 10.1093/nar/gky425.
- Daume M., Plagens A., Randau L. DNA binding properties of the small cascade subunit Csa5. *PLoS One*. 2014;9:e105716. DOI 10.1371/journal.pone.0105716.
- Douce R., Neuburger M. The uniqueness of plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1989;40:371-414. DOI 10.1146/annurev.pp.40.060189.002103.
- Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(5):1792-1797. DOI 10.1093/nar/gkh340.
- Esser K., Kück V., Lang-Hinrichs C., Lemke P.A., Osiewacz H.D., Stahl P., Tudzynski U. *Plasmids of Eukaryotes. Fundamentals and Applications*. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 1986.
- Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:W52-W57. DOI 10.1093/nar/gkm360.
- Gualberto J.M., Newton K.J. Plant mitochondrial genomes: dynamics and mechanism of mutation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2017;68:225-252. DOI 10.1146/annurev-arplant-043015-112232.
- Jansen R., van Embden D.A., Gaastera W., Schouls L.M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 2002;43:1565-1575. DOI 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x.
- Jiang V.V., Samai P., Marraffini L.A. Degrading of phage transcripts by CRISPR-associated RNases enables type III CRISPR-Cas immunity. *Cell*. 2016;164:710-721. DOI 10.1016/j.cell.2015.12.053.
- Kleine T., Maier U.W., Leister D. DNA transfer from organelles to the nucleus: the idiosyncratic genetics of endosymbiosis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2009;60:115-138. DOI 10.1101/cshperspect.a015990.
- Koonin E.V. Origin of eukaryotes from within archaea, archaeal eukaryote and bursts of gene gain: eukaryogenesis just made easier? *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2015;370:201403333. DOI 10.1098/rstb.2014.0333.
- Koonin E.V., Makarova K.S. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2019;374(1772):20180087. DOI 10.1098/rstb.2018.0087.
- Koonin E.V., Makarova K.S., Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 2017;37:67-78. DOI 10.1016/j.mib.2017.05.008.
- Koulintchenko M., Konstantinov Y., Dietrich A. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex. *EMBO J*. 2003;22:1245-1254. DOI 10.1093/emboj/cdg128.
- Kuzmin E.V., Levchenko I.V. S1 plasmid from cms-S-maize mitochondria encodes a viral type DNA-polymerase. *Nucleic Acids Res*. 1987;15:6758. DOI 10.1093/nar/15.16.6758.
- Kuzmin E.V., Levchenko I.V., Zaitseva G.N. S2 plasmid from cms-S-maize mitochondria potentially encodes a specific RNA polymerase. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:4177. DOI 10.1093/nar/16.9.4177.
- Lander E.S. The heroes of CRISPR. *Cell*. 2016;164:18-28. DOI 10.1016/j.cell.2015.12.041.
- Lopez-Garcia P., Eme L., Moreira D. Symbiosis in eukaryotic evolution. *J. Theor. Biol.* 2017;434:20-33. DOI 10.1016/j.jtbi.2017.02.031.
- Makarova K.S., Grishin N.V., Shabalina S.A., Wolf Y.I., Koonin E.V. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol. Direct*. 2006;1:7. DOI 10.1186/1745-6150-1-7.

- Makarova K.S., Wolf Y.I., Alkhnbashi O.S., Costa F., Shah S.A., Saunders S.J., Barrangou R., Brouns S.J.J., Charpentier E., Haft D.H., Horvath R., Moineau S., Mojica F.J.M., Terns R.M., Terns M.P., White M.F., Yakunin A.F., Garrett R.A., van der Oost J., Backofen R., Koonin E.V. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015;13:1-15. DOI 10.1038/nrmicro3569.
- Marienfeld J.R., Unselid M., Brandt P., Brennicke A. Viral nucleic acid sequence transfer between fungi and plants. *Trends Genet.* 1997;13: 260-261. DOI 10.1016/S0168-9525(97)01168-2.
- Mihara T., Nishimura Y., Shimizu Y., Nishiyama H., Yoshikawa G., Uehara H. Linking virus genomes with host taxonomy. *Viruses.* 2016;8:66. DOI 10.3390/v8030066.
- Mojica F.J.M., Diez-Villasenor C., Soria E., Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol. Microbiol.* 2000;36:244-246. DOI 10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x.
- Mojica F.J., Garcia-Martinez J., Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* 2005;60:174-182. DOI 10.1007/s00239-004-0046-3.
- Nibert M., Vong M., Fugate K.K., Debat H.J. Evidence for contemporary plant mitoviruses. *Virology.* 2018;518:14-24. DOI 10.1016/j.virol.2018.02.005.
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics.* 2012;28;1166-1167. DOI 10.1093/bioinformatics/bts091.
- Pittis A.A., Gabaldon T. Late acquisition of mitochondria by a host with chimeric prokaryotic ancestry. *Nature.* 2016;531(7592):101-104. DOI 10.1016/S0168-9525(00)02024-2.
- Poole A.M., Gribaldo S. Eukaryotic origins: how and when was the mitochondrion acquired? *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2014;6: a015990. DOI 10.1101/cshperspect.a015990.
- Rice P., Longden I., Bleasby A. EMBOSS: the European molecular biology open software suite. *Trends Genet.* 2000;16(6);276-277. DOI 10.1016/S0168-9525(00)02024-2.
- Richter C., Chang J.T., Fineran P. Function and regulation of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR associated (Cas) systems. *Viruses.* 2012;4:2291-2311. DOI 10.3390/v4102291.
- Shahi S., Eusebio-Cope A., Kondo H., Hillman B.I., Suzuki N. Investigation of host range of and host defense against a mitochondrially replicating mitovirus. *J. Virol.* 2019;93(6):e01503-18. DOI 10.1128/JVI.01503-18.
- Silas S., Mohr G., Sidote D.J., Markham L.M., Sanchez-Amat A., Bhaya D., Lambowitz A.M., Fire A.Z. Direct CRISPR spacer acquisition from RNA by a natural reverse transcriptase-Cas1 fusion protein. *Science.* 2016;351(6276):aad4234. DOI 10.1126/science.aad4234.
- Thomas C.M. The nucleotide sequence and transcription of minicircular mitochondrial DNA's associated with fertile and cytoplasmic male-sterile lines of sugar beet. *Nucleic Acids Res.* 1986;14:9353-9370. DOI 10.1093/nar/14.23.9353.
- Toro N., Martinez-Abarca F., Gonzalez-Delgado A. The reverse transcriptases associated with CRISPR-Cas systems. *Sci. Rep.* 2017;7: 7089. DOI 10.1038/s41598-017-07828-y.
- Westra E.R., Dowling A.J., Broniewski J.M., van Houte S. Evolution and ecology of CRISPR. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2016;47:307-334. DOI 10.1146/annurev-ecolsys-121415-032428.
- Zhang Q., Ye Y. Not all predicted CRISPR-Cas systems are equal: isolated *cas* genes and classes of CRISPR like elements. *BMC Bioinformatics.* 2017;18:92. DOI 10.1186/s12859-017-1512-4.
- Zhao N., Wang Y., Hua J. The roles of mitochondrion in intergenomic gene transfer in plants: a source and a pool. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19:547. DOI 10.3390/ijms19020547.

ORCID ID

Yu.M. Konstantinov orcid.org/0000-0002-0601-2788
I.S. Petrushin orcid.org/0000-0002-8788-5352

Благодарности. Авторы выражают благодарность Ian Max Møller и R. Shyama Prasad Rao за проявленный к работе интерес, критические замечания и полезное обсуждение. Отдельная благодарность А. Фадееву за ценные советы и полезные замечания по структуре статьи. Авторы чрезвычайно признательны анонимному рецензенту, чьи замечания и конструктивный анализ первоначального варианта статьи способствовали ее существенной переработке, приведшей к качественному улучшению изложения полученных результатов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 05.06.2019. После доработки 20.08.2019. Принята к публикации 21.08.2019.

Пятая международная научная конференция PlantGen2019

Геномная конституция и дифференциация субгеномов эндемичных сибирских и дальневосточных видов рода *Elymus* (Poaceae) по данным секвенирования ядерного гена *waxy*

А.В. Агафонов¹✉, С.В. Асбаганов¹, Е.В. Шабанова (Кобозева)¹, И.В. Морозов^{2,3}, А.А. Бондарь²¹ Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия² Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: agalex@mail.ru

В России распространены 53 вида многолетних трав рода *Elymus* L. (Poaceae) предположительно трех гапломных комбинаций: StH, StY и StHY. Наименее изученными остаются бореальные StH-геномные виды – эндемики РФ. Ранее R. Mason-Gamer с соавторами в серии исследований было показано, что молекулярно-филогенетический анализ последовательностей низкокопийного гена *waxy* (*GBSS1*) существенно дополняет цитогенетические данные по геномной конституции и эволюционным взаимоотношениям как среди североамериканских, так и среди азиатских видов рода *Elymus*. Мы исследовали ген *GBSS1* у 18 видов *Elymus* из Сибири и Дальнего Востока России (включая 14 эндемичных), чтобы определить их геномную конституцию и оценить уровни филогенетической дифференциации: *E. charkeviczii*, *E. jacutensis*, *E. kamczadolorum*, *E. komarovii*, *E. kronokensis*, *E. lenensis*, *E. macrourus*, *E. margaritae*, *E. subfibrosus*, *E. sajanensis*, *E. transbaicalensis*, *E. peschkovae*, *E. uralensis*, *E. viridiglumis*. Продукты ПЦР-амплификации фрагментов гена *GBSS1* (область экзонов 9–14) были клонированы и секвенированы (по 6–8 клонов на образец). Все изученные виды включали субгеномные вариации St и H. Наиболее существенные различия между субгеномными фрагментами St и H обнаружены в интроне 13. Этот интрон в субгеноме H содержит делецию в 21 п. н. во всех генотипах *Elymus*, вероятно, унаследованную от общего предка геномов H и P. Вместо этой делеции все субгеномы St имеют относительно консервативную последовательность, близкую по нуклеотидному составу к таковой у рода *Pseudoroegneria*, предок которого является донором современного субгенома St всех видов *Elymus*. Кластерный филогенетический анализ выявил дифференциацию последовательностей каждого из субгеномов St и H на два эволюционных варианта – условно St₁ и St₂, H₁ и H₂. Установлено, что варианты субгеномов St и H гомогенны с различными современными видами предковых родов *Pseudoroegneria* и *Hordeum*: St₁ – *P. strigosa*, St₂ – *P. spicata*, H₁ – *H. jubatum*, H₂ – *H. californicum*. Выявлены особенности взаимоотношений между российскими и североамериканскими видами рода, а также ряд микроэволюционных связей в группе эндемичных бореальных видов Сибири и Дальнего Востока. Полученные новые данные необходимы для построения филогенетически ориентированной таксономической системы рода *Elymus*. Ключевые слова: *Elymus*; филогения; аллополиплоиды; геномная конституция; *GBSS1*.

Для цитирования: Агафонов А.В., Асбаганов С.В., Шабанова (Кобозева) Е.В., Морозов И.В., Бондарь А.А. Геномная конституция и дифференциация субгеномов эндемичных сибирских и дальневосточных видов рода *Elymus* (Poaceae) по данным секвенирования ядерного гена *waxy*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(7):817-826. DOI 10.18699/VJ19.555

Genome constitution and differentiation of subgenomes in Siberian and Far Eastern endemic species of the genus *Elymus* (Poaceae) according to the sequencing of the nuclear gene *waxy*

A.V. Agafonov¹✉, S.V. Asbaganov¹, E.V. Shabanova (Kobozeva)¹, I.V. Morozov^{2,3}, A.A. Bondar²¹ Central Siberian Botanical Garden, SB RAS, Novosibirsk, Russia² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: agalex@mail.ru

Fifty-three species of perennial grasses in the genus *Elymus* L. (Poaceae), which are widespread in Russia, are generally assumed to have three haplome combinations: StH, StY and StHY. The StH-genome species, endemic to Russia, remain the least studied. R. Mason-Gamer and co-authors have previously shown in a series of studies that a molecular phylogenetic analysis of the low-copy gene *waxy* (*GBSS1*) sequences significantly complements cytogenetic data on the genomic constitution and evolutionary relationships among both North American and Asian species of the genus *Elymus*. To determine the species' genomic constitution and to evaluate the level of phylogenetic differentiation, we examined the *GBSS1* gene in 18 species of *Elymus* from Siberia and the Russian Far East, including the following 14 endemics: *E. charkeviczii*, *E. jacutensis*,

E. kamczadalarum, *E. komarovii*, *E. kronokensis*, *E. lenensis*, *E. macrourus*, *E. margaritae*, *E. subfibrosus*, *E. sajanensis*, *E. transbaicalensis*, *E. peschkovae*, *E. uralensis*, and *E. viridiglumis*. PCR amplification products of *GBSS1* gene fragments (including exons 9–14) were cloned and 6–8 clones per accession were sequenced. It appears that all the species studied have St and H subgenomic gene variations. The most significant differences between the subgenomic variants St and H were found in intron 13. The H subgenome contains a 21-bp-long deletion in intron 13 in all *Elymus* genotypes, probably derived from a common ancestor of the H and P genomes. Instead of this deletion, all St subgenomes have a relatively conservative sequence similar to that of the genus *Pseudoroegneria*, whose ancestor is considered to be the donor of the modern St subgenome for all *Elymus* species. Cluster phylogenetic analysis revealed differentiation in St and H subgenome sequences into two evolutionary variants: St₁ vs. St₂ and H₁ vs. H₂, respectively. Variants of the St and H subgenomes were found homologous to various modern species of the ancestral genera *Pseudoroegneria* and *Hordeum*: St₁ to *P. strigosa*, St₂ to *P. spicata*, H₁ to *H. jubatum*, and H₂ to *H. californicum*. The details of the relationships between Russian and North American species of the genus, as well as a number of microevolutionary interconnections in the group of boreal endemic species of Siberia and the Russian Far East were revealed. The new results obtained here are essential for the development of a phylogenetically oriented taxonomic system for the genus *Elymus*.

Key words: *Elymus*; phylogeny; allopolyploids; genome constitution; *GBSS1*.

For citation: Agafonov A.V., Asbaganov S.V., Shabanova (Kobozeva) E.V., Morozov I.V., Bondar A.A. Genome constitution and differentiation of subgenomes in Siberian and Far Eastern endemic species of the genus *Elymus* (Poaceae) according to the sequencing of the nuclear gene *waxy*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(7):817-826. DOI 10.18699/VJ19.555 (in Russian)

Введение

Род *Elymus* L. (Пырейник) – самый крупный род трибы *Triticeae* Dumort. семейства Poaceae Barn. Он содержит исключительно амфилоидные самоопыляющиеся виды многолетних трав (Dewey, 1984; Löve, 1984), которые широко распространены на всех континентах от Голарктики до субтропиков. При этом более половины видов произрастает в Центральной Азии (Lu, 1994). Геномная конституция всех видов образована гапломами от предков современных родов: *Pseudoroegneria* (Nevski) Á. Löve (гаплом St), *Hordeum* L. (гаплом H), *Agropyron* Gaertn. (гаплом P), *Australopyrum* (Tzvelev) Á. Löve (гаплом W) и гапломом Y от неизвестного предка. Общим для всех видов рода является гаплом St. После создания и признания геномной системы классификации трибы *Triticeae* (Dewey, 1984) стала получать распространение таксономическая система, в которой род *Elymus* в широком понимании подразделяют на самостоятельные роды на основе геномного состава видов (Baum et al., 2011): *Elymus* L. (StStHH-геном), *Roegneria* C. Koch (StStYY-геном), *Campeiostachys* Drobov (StStHHYY-геном), *Kengyia* C. Yen & J.L. Yang (StStYYPP-геном), *Douglasdeweya* C. Yen, J.L. Yang et B.R. Baum (StStPP). По последним обработкам род *Elymus* в пределах России подразделен на четыре секции: *Turczaninovia* (Nevski) Tzvelev (4 вида), *Goulardia* (Husn.) Tzvelev (42 вида), *Elymus* (6 видов), *Clinelymopsis* (Nevski) Tzvelev (1 вид) (Цвелев, Пробатова, 2010). Эта система построена по традиционным критериям (сравнительно-морфологический и эколого-географический), обеспечивает целостность и единство рода, но в состав секций входят виды с разной геномной конституцией.

В настоящее время становится очевидной необходимость сбалансированного комплексного подхода для построения филогенетически ориентированной системы таксонов рода *Elymus*. Сложность на этом направлении заключается в объединении двух совершенно разных методологий в ботанике – традиционной таксономии с приоритетом морфологических критериев и экспериментальной генетики на основе современных молекулярных технологий. В отношении использования молекулярных маркеров существенные результаты получены Dr. R. Mason-Gamer

с сотрудниками (Helfgott, Mason-Gamer, 2004; Mason-Gamer, 2001, 2004, 2008, 2013; Mason-Gamer et al., 1998; 2010a, b). Так, проведенные ими исследования показали, что сведения о нуклеотидных последовательностях низкокопийного гена *waxy* (гранул-связанная синтаза крахмала 1, *GBSS1*) согласуются с цитогенетическими данными в отношении геномной конституции и эволюционного происхождения североамериканских (Mason-Gamer, 2001) и азиатских (Mason-Gamer et al., 2010a) видов рода *Elymus*.

Нами сделан краткий анализ пригодности таких генетических маркеров, как низкокопийные гены ядерной локализации *bmy2*, *waxy* и ITS кластеров рПНК, для изучения филогенетических отношений между видами рода, встречающимися в Сибири и на Дальнем Востоке России (Shmakov et al., 2015). Было подтверждено, что в сочетании с другими молекулярными маркерами результаты секвенирования позволяют реконструировать филогенетические отношения между таксонами. Более того, эти исследования доказывают, что при построении филогенетически ориентированной системы рода для территории России необходимо опираться на данные о геномной конституции видов и их микроэволюционных взаимоотношениях. Наличие в базе данных NCBI Nucleotide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) множества последовательностей гена *GBSS1* позволяет более подробно оценить родство между большим числом генотипов каждого вида в сравнительных исследованиях.

Нами проведено изучение нуклеотидных последовательностей гена *GBSS1* (~1 300 п. н., экзоны 9–14) у 18 видов *Elymus* (включая 14 эндемичных), произрастающих на территории Сибири и Дальнего Востока России, с целью установления или подтверждения их геномной конституции, а также для оценки уровней эволюционной дифференциации субгеномов, образующих генотипы у разных видов. Эти сведения являются необходимым условием для построения филогенетически ориентированной таксономической системы рода в пределах России.

Материалы и методы

Набор образцов включал распространенные в Азиатской части России виды рода *Elymus*, в основном с неустанов-

ленной геномной конституцией (Прил. 1)¹. Для сравнительного анализа были использованы последовательности гена *GBSSI* у видов, имеющих маркерные геномы St, H и Y, из базы данных NCBI (Прил. 2). Геномную ДНК экстрагировали из свежих или высушенных листьев по модифицированной методике (Khanuja et al., 1999) или с помощью наборов Nucleospin Plant II (Macherey-Nagel, Германия) в соответствии с инструкциями производителя.

Аmplификацию фрагментов гена *GBSSI* проводили с праймерами F-for (TGCGAGCTCGACAACATCATGCG) и M-bac (GGCGAGCGGCGGATCCCTCGC), предложенными ранее (Mason-Gamer et al., 1998), которые формируют продукт длиной приблизительно 1.3 тыс. п. н., включающий фрагмент гена *GBSSI*, содержащий экзоны 9–14. ПЦР проводили на термоджеле C-1000 (Bio-Rad, США). Объем реакционной смеси для ПЦР составлял 15 мкл и содержал Taq буфер, по 0.2 mM каждого dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 1 мкл каждого праймера, 20 нг геномной ДНК, 1 ед. HS Taq ДНК полимеразы («Евроген», Россия). Использовали следующий температурный профиль: первичная денатурация при 94 °C – 4 мин; затем 38 циклов: денатурация при 94 °C – 25 с, отжиг праймеров при 65 °C – 30 с, элонгация при 72 °C – 1 мин; финальная элонгация – 20 мин при 72 °C для усиления терминального нематричного присоединения дезоксиаденозина к 3'-концу ПЦР-продукта (Mason-Gamer et al., 1998). Амплификат, содержащий исследуемый фрагмент, анализировали электрофорезом в 1.7 % агарозном геле в буфере TAE при удельном напряжении 4 В/см.

Поскольку аллополиплоидные геномы *Elymus* содержат не менее двух субгеномных вариаций гена *GBSSI*, то для минимизации PCR drift эффекта, обусловленного стохастическими флуктуациями на начальных стадиях ПЦР, амплификацию выполняли в трехкратной повторности (Wagner et al., 1994). Объединенный из трех повторностей ПЦР-продукт лигировали в pAL2-T вектор («Евроген») в соответствии с инструкциями производителя. Полученной лигазной смесью трансформировали химически компетентные клетки *E. coli* XL1-Blue. Колонии клеток, содержащие рекомбинантную плазмиду со встройкой, отбирали методом бело-голубой селекции на твердой LB питательной среде с X-gal, IPTG и ампициллином. Для каждого образца отбирали 20 белых колоний, которые тестировали на наличие вставки ожидаемой длины с помощью электрофореза продуктов амплификации при использовании суспензии колонии в качестве матрицы и универсальной пары праймеров M13 («Евроген»). Для каждого образца отбирали не менее шести колоний, содержащих вставку расчетного размера ~1300 п. н. Отобранные колонии растили в 4 мл жидкой среды LB в течение 16 ч при 37 °C и 220 об/мин. Плазмидную ДНК выделяли набором Plasmid Miniprep («Евроген») по инструкции производителя.

Реакционная смесь реакции Сэнгера содержала 0.7 мкг плазмидной ДНК общей длиной около 4300 п. н., 20 пМ праймера M13F или M13R, 1.8 мкл реагента BigDye v.3.1, 7.2 мкл 5X буфера для секвенирования и воду до суммарного объема реакции в 40 мкл. Для реакции Сэнгера

был использован следующий температурный профиль: денатурация при 95 °C в течение 2 мин, а затем 50 циклов: плавления при 95 °C – 30 с; отжига при 55 °C – 10 с; элонгации при 60 °C – 4 мин. Продукты реакции Сэнгера очищали от избытка компонентов BigDye с помощью гель-фильтрации в микроколонках, содержащих 600–700 мкл подготовленного Sephadex G-50 (GE Healthcare) с удалением жидкости из мертвого объема центрифугированием при 900 g в течение 2 мин. Затем их анализировали на автоматическом геномном анализаторе ABI 3130XL (Applied Biosystems) в ЦКП СО РАН «Геномика». Полученные последовательности собирали в контиги, перекрывающие нуклеотидную последовательность *GBSSI* с 9-го по 14-й экзон, включая 5 интронов, с помощью Unipro UGENE v1.31.0 (Okonechnikov et al., 2012). В итоге получено не менее 6 контигов нуклеотидных последовательностей для каждого из 22 образцов *Elymus*. Дополнительно для сравнительного анализа были привлечены 42 нуклеотидные последовательности из GenBank NCBI.

Множественное выравнивание последовательностей производили с помощью программы T-Coffee (www.tcoffee.org) и проверяли вручную. Выровненные структуры исследуемого фрагмента *GBSSI* использовали для расчета филогенетических деревьев методом максимального правдоподобия (ML) на веб-сервере IQ-TREE (Trifinopoulos et al., 2016). Для каждого экзона и интрона были определены наилучшие модели нуклеотидных замен в программе PartitionFinder версии 2.1.1 (Lanfear et al., 2016) с помощью модели выбора AICc, алгоритма поиска “greedy” (Lanfear et al., 2012) и связанными (linked) длинами ветвей. Для укоренения дендрограмм применяли предложенную ранее последовательность *Bromus tectorum* AY362757.1 из генбанка NCBI (Mason-Gamer, 2004). Статистическую поддержку топологии в IQ-TREE анализе оценивали с помощью 1000 репликаций методами SH-aLRT (Guindon et al., 2010) и UFBoot (Minh et al., 2013).

Результаты и обсуждение

Полученные результаты с использованием реперных образцов – носителей предковых для рода *Elymus* геномов St (виды рода *Pseudoroegneria*) и H (виды рода *Hordeum*) отчетливо показали, что у всех изученных видов из Сибири и российского Дальнего Востока обнаружены варианты последовательностей, присущие только геномам St и H. Это означает, что рассмотренные виды относятся к тетраплоидной StH-геномной группе. Очевидно, что центр видового разнообразия StH-геномной группы смещен к северу по сравнению с центром происхождения большинства StY-геномных видов, находящимся на территории Китая (Lu, Salomon, 1992). Примечательно, что видовой состав аллотетраплоидной группы видов *Elymus* Северной Америки также представлен в основном StH-геномными видами (Mason-Gamer, 2001). Там отмечены только редкие особи нескольких заносных азиатских StHY- и StY-геномных видов (Barkworth et al., 2007).

Наиболее показательные отличия субгеномных фрагментов St и H прослеживаются в интроне 13 (рис. 1). Последовательности субгенома H этого интрона у всех включенных в анализ генотипов *Elymus* содержат протяженную делецию длиной 21 п. н., вероятнее всего, полученную от

¹ Приложения 1 и 2 см. по адресу:
<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2019-23/appx19.pdf>

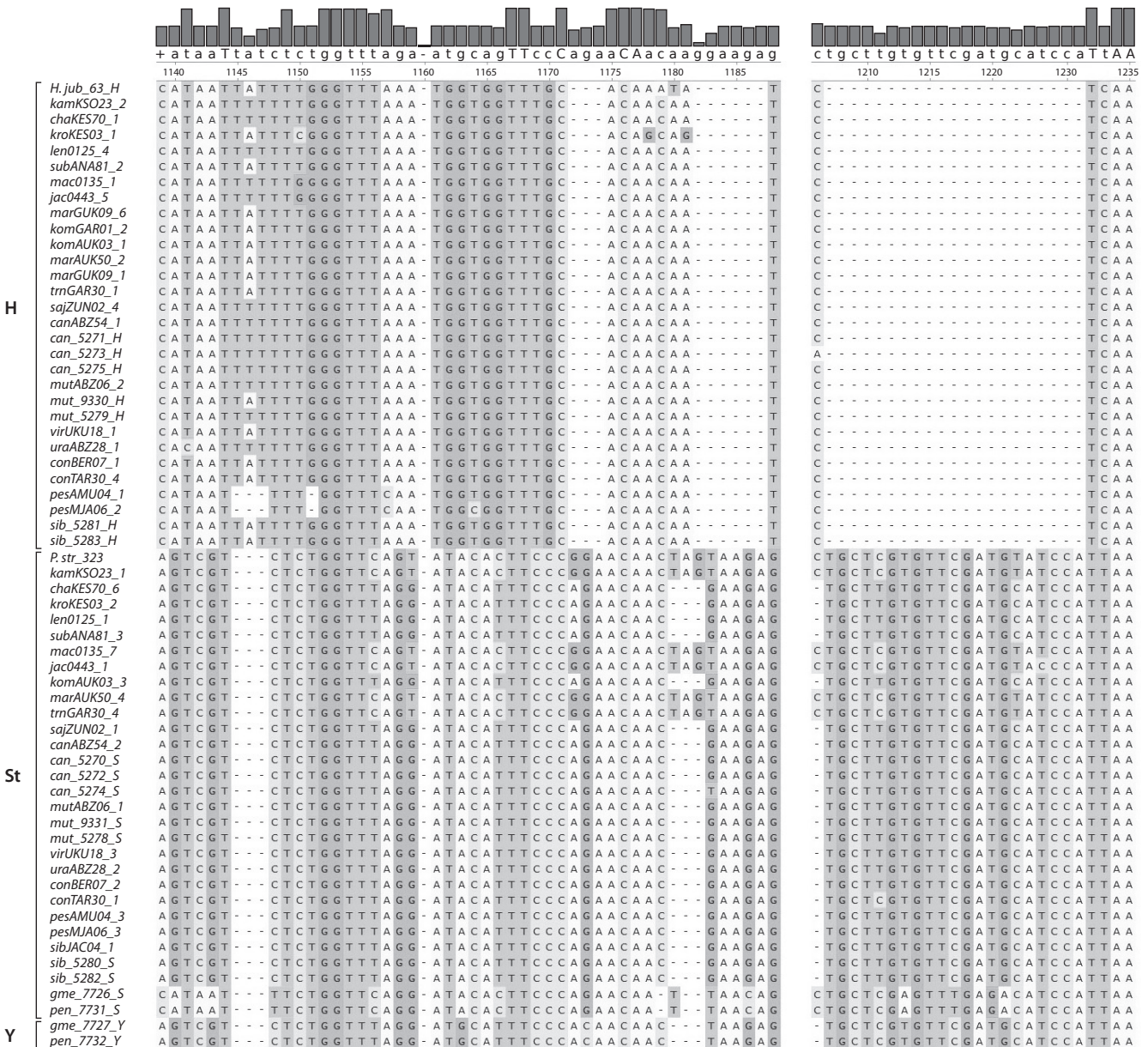


Рис. 1. Различия в нуклеотидных последовательностях в субгеномах H и St в интроне 13 гена *GBSS1* у видов *Elymus* с территории Азиатской части России в сравнении с последовательностями у реперных образцов евроазиатских видов.

общего предка субгеномов H и P, поскольку она присутствует также у современных представителей моногеномных родственных видов из родов *Hordeum* и *Agropyron*. На месте этой делеции у всех субгеномов St и Y отмечена относительно консервативная последовательность, во многом совпадающая с таковой у рода *Pseudoroegneria*, предок которого является донором современного генома St. Мелкие делеции характерны и для других участков этого интрона и в меньшей степени выражены в других участках анализируемого фрагмента *GBSS1*.

При этом на нашей выборке клонов не подтвердилось ранее опубликованные данные о существовании консервативных участков, абсолютные специфичных для гапломов H и St (Shmakov et al., 2015). Данный тезис подтвердился только для части последовательностей, принадлежащих разным гапломом.

Кластерный анализ последовательностей *GBSS1* с 9-го по 14-й экзон, а также отдельно интронов или экзонов демонстрировал схожие закономерности, высвечивая отдельные нюансы филогенетических связей как внутри, так и между родственными группами анализируемых таксонов *Elymus*. Анализ наиболее консервативных участков (экзоны 9–14) показал близкое родство внутри отдельных субгеномов и при этом их дифференциацию между собой (рис. 2).

Обнаружилось, что каждый из двух субгеномов у изученных видов отчетливо дифференцирован. Так, последовательности субгенома St делятся на две группы, условно обозначенные как St₁ и St₂. Последовательности субгенома St₁ для сибирских видов, вероятно, являются более древними, поскольку, наряду с северными биотипами *E. macrourus*, *E. jacutensis* и *E. kamczadalarum*, они



Рис. 2. Дендрограмма, построенная методом максимального правдоподобия по результатам анализа последовательностей экзонов 9–14 гена *GBSS1* субгеномов St и H у видов рода *Elymus* из Азиатской части России в сравнении с реперными образцами евроазиатских видов (субгеномы St, H и Y).

Указаны значения бутстреп-поддержки SH-aLRT (%) / UFboot (%).

обнаружены не только у более южных StY-геномных видов *E. gmelinii* и *E. pendulinus*, но и у образца *P. strigosa* PI 499637 из Северо-Восточного Китая.

Субгеномную группу St₂ образует более обширная часть видов, включающая как узколокальные (*E. komarovii*, *E. uralensis*, *E. sajanensis*, *E. margaritae*), так и широко

викарирующие виды (*E. caninus*, *E. sibiricus*). Этот факт отчетливо иллюстрируется специфичностью нуклеотидных последовательностей в разных участках гена, как показано на рис. 3. Примечательно, что образец алтайского вида *E. margaritae* AUK-0650 содержит оба варианта субгенома St. При этом в наборе из восьми последова-

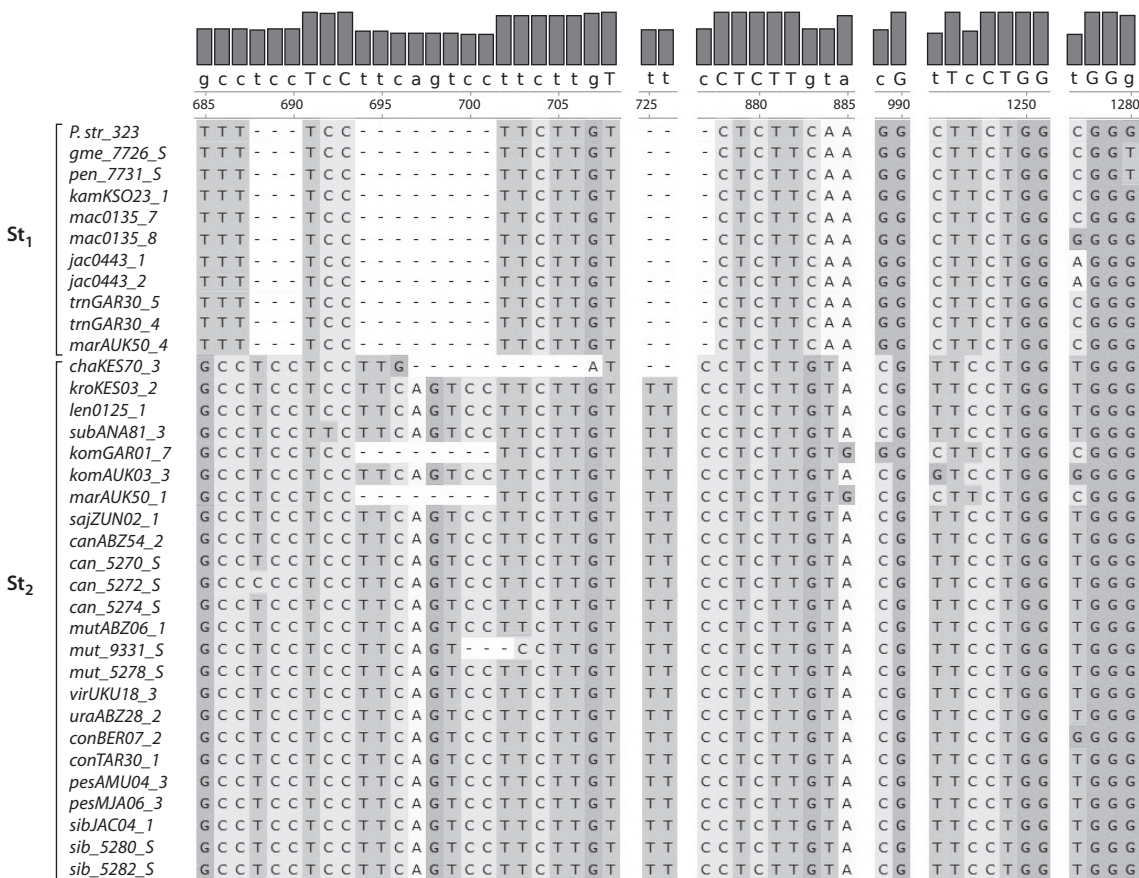


Рис. 3. Дифференциация субгеномов St на основе различий в нуклеотидных последовательностях в разных участках гена GBSS1 у видов *Elymus* с территории Азиатской части России в сравнении с последовательностями у реперных образцов евроазиатских видов.

тельностью у каждого из образцов *E. komarovii* GAR-0501 и *E. margaritae* GUK-1709 последовательности, принадлежащие субгеному St, выявлены не были.

По такому же принципу были подразделены последовательности североамериканских видов по первоначальным данным, где сравнивалось большее число природных образцов (Mason-Gamer, 2001). Поэтому нами была построена дендрограмма, в которую включены эндемичные виды Азиатской России в сравнении с некоторыми последовательностями североамериканских видов. Используются последовательности субгенома St, включающие экзоны 9–14 вместе с интронами (рис. 4).

В этом варианте построения дендрограммы азиатские виды снова распределились по двум кладам с тем же составом, как в варианте построения по экзонам. При этом часть североамериканских видов (отмечены на рис. 4 точками) вместе с азиатским видом *P. strigosa* образовали единую кладу с группой субгенома St₁, а другая часть расположилась в группе St₂ вместе со всеми образцами североамериканского вида *P. spicata*. Последовательности GBSS1 субгенома Y у *E. gmelinii* и *E. pendulinus* показали более близкое родство с группой St₂, что не противоречит данным об эволюционном происхождении этого субгенома (Mason-Gamer et al., 2010a).

Аналогичная картина дифференциации проявилась и для субгенома H (рис. 5). По полным последователь-

ностям интронов и экзонов генома H у российских и североамериканских (отмечены на рис. 5 точками) видов была построена дендрограмма. В качестве реперных взяты два многолетних вида *Hordeum* (помечены звездочками). Две главные клады, на которые разделились копии гена генома H, условно обозначены как H₁ и H₂. Клада H₁ включает исключительно российские виды, тогда как клада H₂ сформирована российскими северо-восточными и всеми североамериканскими видами. Каждому из вариантов соответствует свой предковый таксон современного рода *Hordeum*. Для российской группы H₁ это широко распространенный в Евразии *H. jubatum*, а для группы H₂ – североамериканский *H. californicum* Covas & Stebbins.

Российские виды, входящие в состав клады H₁, показали значительно большую дифференциацию, чем виды смешанной клады H₂. Клада H₁ разделилась на три субклады. В первую очередь отделились три клона северо-восточных видов *E. kronokensis* и *E. peschkovae*. Этот факт косвенно подтверждает значительную обособленность *E. peschkovae* от близкого по морфологии колоса сибирского *E. confusus*, который, в свою очередь, ближе всех прочих видов кластеризуется с реперным *H. jubatum*. Наиболее отдаленный кластер образован всеми образцами *E. caninus*, к которым присоединился клон эндемика Южного Урала *E. uralensis*. В самый крупный кластер вошли горные сибирские виды *E. komarovii*, *E. transbaicalensis*

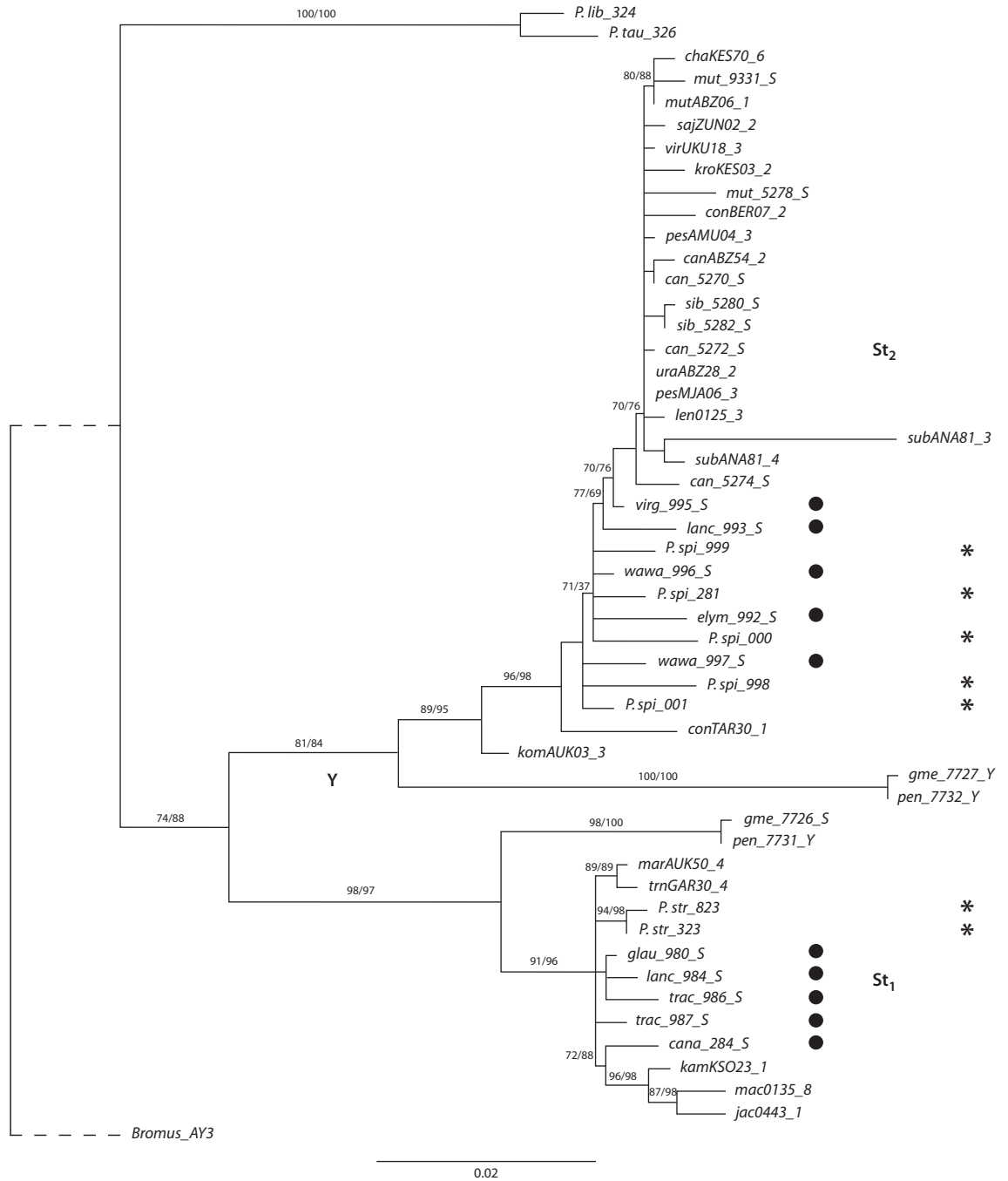


Рис. 4. Дендрограмма, построенная методом максимального правдоподобия по результатам анализа последовательностей интронов и экзонов (9–14) гена *GBSS1* субгенома St у видов рода *Elymus* из Азиатской части России в сравнении с образцами евроазиатских и североамериканских (отмечены точками) видов (субгеномы St и Y). Звездочками отмечены виды *Pseudoroegneria* – носители генома St.

Указаны значения бутструп-поддержки SH-aLRT (%)/UFboot (%).

и *E. margaritae*, к которым примыкают пара реперных клонов *E. sibiricus* и, что наиболее неожиданно, клон чукотского образца *E. subfibrosus*. Примечательно, что реперные образцы *E. mutabilis* попали в разные клады субгенома H.

Смешанная клада H₂ включила не только все североамериканские клоны видов *Elymus* вместе с *H. californicum*, но и клоны ряда российских видов из разных регионов: *E. kamczadalarum* и *E. charkeviczii* (камчатские виды),

E. macrourus, *E. jacutensis*, *E. lenensis* (северные образцы с п-ова Таймыр), горный сибирский вид *E. sajanensis* и два из трех *E. mutabilis* (реперный китайский *mut_5279_H* и южноуральский *ABZ06_2*). Третий реперный алтайский *mut_9330_H* попал в кладу H₁.

Таким образом, по субгеному H можно заметить только тенденцию к родству между североамериканскими и северными и восточными образцами российских видов. Более понятно близкое родство между американскими

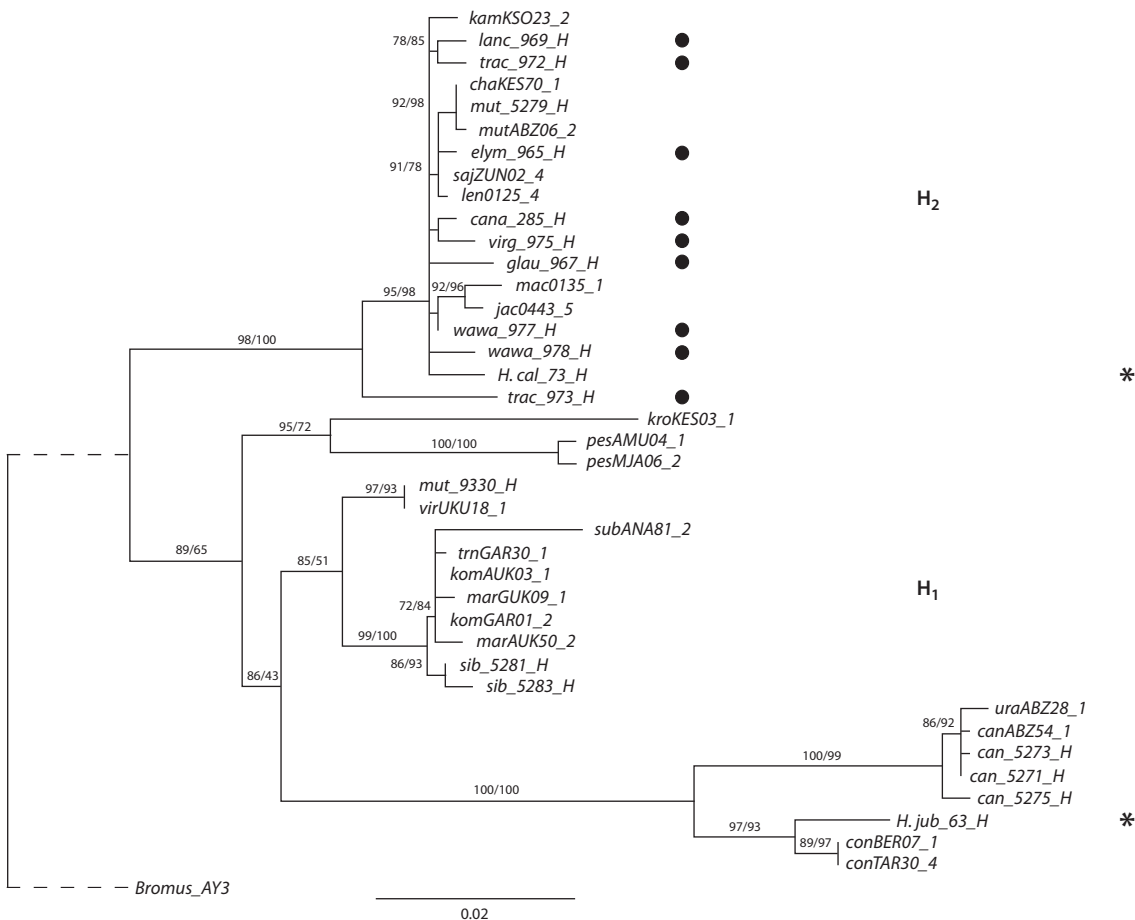


Рис. 5. Дендрограмма, построенная методом максимального правдоподобия по результатам анализа последовательностей интронов и экзонов (9–14) гена *GBSS1* субгенома Н у видов рода *Elymus* из Азиатской части России в сравнении с образцами евроазиатских и североамериканских (отмечены точками) видов. Звездочками отмечены носители генома Н: североамериканский вид *H. californicum* и широко распространенный вид азиатского происхождения *H. jubatum*.

Указаны значения поддержки SH-aLRT (%) / UFboot (%).

и камчатскими видами, учитывая исторические связи этих флор, а также видами широких северных ареалов *E. macrourus* и *E. jacutensis*. Труднее объяснить близость к этой группе китайского и южноуральского образцов *E. mutabilis*.

Тем не менее на примере вариабельности гена *GBSS1* можно проследить родственные отношения в эволюции видов и локальных географических рас с территории Сибири и Дальнего Востока. Если рассмотреть взаиморасположение образцов внутри клад субгеномов, то кластеры объединили их по предполагаемому родству. Так, виды *E. jacutensis* и *E. macrourus* объединились в общие кластеры в обеих кладах Н и St (см. рис. 2), а также на отдельных дендрограммах этих субгеномов (см. рис. 4 и 5), тем самым подтвердив ранее сделанные предположения о том, что *E. jacutensis* представляет собой остистую разновидность *E. macrourus* (Цвелев, 1964). Этот факт согласуется с данными сравнительно-морфологического и электрофоретического анализа и гибридизации выборочных биотипов этих видов (Агафонов, 2008).

Результаты секвенирования подтвердили обособленность *E. kamczadolorum* от камчатского вида *E. charkeviczii*, выявленную ранее с помощью методов сравнительной

морфологии, электрофореза запасных белков эндосперма семян, половой гибридизации (Агафонов, Герус, 2008) и молекулярного ISSR-анализа (Кобозева и др., 2017). Виды *E. komarovii* и *E. transbaicalensis* образовали неразличимые ветви в кладе H₁ вместе с алтайским видом *E. margaritae*, а в кладе St₁ объединились имеющиеся клоны *E. transbaicalensis* и *E. margaritae*. Филогенетическая близость первых двух видов неоднократно подтверждалась в эксперименте (Агафонов и др., 2019), тогда как исследование степени обособленности *E. margaritae* проводится в настоящее время методами биосистематики. Но наиболее неожиданные данные получены относительно взаимоотношений в группе южноуральских биотипов *E. uralensis*, *E. viridiglumis*, *E. caninus*, *E. mutabilis*. Сейчас эти данные проверяются в полевых и лабораторных экспериментах.

Заключение

Таким образом, несмотря на исторически сложную картину сетчатой эволюции в составе различных родственных аллополиплоидных родов и продолжающиеся активные микроэволюционные преобразования, базисные геномы сохраняют уникальные предковые черты. Это позволяет

относительно легко идентифицировать геномный состав и классифицировать современные виды в рамках филогенетически ориентированной таксономической модели рода. На наш взгляд, необходимо сохранить целостность рода, поскольку некоторые виды из самостоятельного рода *Roegneria* с геномной формулой StY (Baum et al., 1991) близки по морфологии видам из вновь предлагаемого рода *Campeiostrachys* с геномной формулой StHY (Baum et al., 2011). При этом виды рода *Campeiostrachys* в значительной мере различаются между собой морфологически. Генетически объединяет всех представителей рода геном St, ведущий происхождение от предков рода *Pseudoroegneria*.

В основу дифференциации рода должна быть положена модель микроэволюционных комплексов, которые представляют собой совокупность таксонов, эволюционирующих через гибридизацию и интрогрессию. Степень родства таксонов необходимо подтвердить при помощи методов биосистематики с обязательным определением скрещиваемости особей, т.е. с учетом положения в системе рекомбинационных и интрогрессивных генпулов (Агафонов, Саломон, 2002). По сути, микроэволюционный комплекс – это проекция совокупности рекомбинационных генпулов на таксономическую модель рода с учетом геномной конституции видов. Каждый микроэволюционный комплекс должен представлять собой разветвленную систему таксонов видового и внутривидового рангов, в этом случае система рода будет филогенетически подтвержденной структурой.

В перспективе предстоит определить таксономический ранг разных микроэволюционных комплексов. Это могут быть секции или агрегаты одного вида в широком понимании, как показано на примере ревизии подсекции *Pendulini* (Nevski) Tzvelev секции *Gouldardia* (Husn.) Tzvelev (Кобозева, Агафонов, 2015).

Список литературы / References

- Агафонов А.В. Биосистематическое исследование комплекса *Elymus macrourus* – *E. jacutensis* и критического таксона *E. ircutensis* (Triticeae: Poaceae). Растит. мир Азиатской России. 2008; 2:20-32.
[Агафонов А.В. Biosystematic research of the complex *Elymus macrourus* – *E. jacutensis* and the critical taxon *E. ircutensis* (Triticeae: Poaceae). Rastitel'nyj Mir Aziatskoj Rossii = Plant Life of Asian Russia. 2008;2:20-32. (in Russian)]
- Агафонов А.В., Герус Д.Е. Исследование полиморфного комплекса *Elymus charkeviczii* Probat. s. l. (Triticeae: Poaceae) полуострова Камчатка с позиций биосистематики и таксономической генетики. Растит. мир Азиатской России. 2008;1:58-70.
[Агафонов А.В., Герус Д.Е. Study of the polymorphic complex *Elymus charkeviczii* Probat. s. l. (Triticeae: Poaceae) in the Kamchatka Peninsula from the viewpoint of biosystematics and taxonomical genetics. Rastitel'nyj Mir Aziatskoj Rossii = Plant Life of Asian Russia. 2008;2:58-70. (in Russian)]
- Агафонов А.В., Никонова (Герус) Д.Е., Шабанова (Кобозева) Е.В. Изменчивость и специфичность сибирских видов *Elymus transbaicalensis*, *E. komarovii*, *E. sajanensis*, *E. kronokensis* (Poaceae) и некоторых морфологически отклоняющихся форм по гистону H1. Turczaninowia. 2019;22(1):5-18. DOI 10.14258/turczaninowia.22.1.1.
[Агафонов А.В., Никонова (Герус) Д.Е., Шабанова (Кобозева) Е.В. The variability and specificity of the histone H1 among the Siberian species *Elymus transbaicalensis*, *E. komarovii*, *E. sajanensis*, *E. kronokensis* (Poaceae) and some morphologically deviating forms. Turczaninowia. 2019;22(1):5-18. DOI 10.14258/turczaninowia.22.1.1. (in Russian)]
- Кобозева Е.В., Агафонов А.В. Ревизия подсекции *Pendulini* (Nevski) Tzvelev рода *Elymus* L. (Poaceae). Сист. заметки по материалам Гербария им. П.Н. Крылова ТГУ. 2015;112:22-31. DOI 10.17223/20764103.112.3.
[Kobozeva E.V., Agafonov A.V. Revision of the subsection *Pendulini* (Nevski) Tzvelev of the genus *Elymus* L. (Poaceae). Sistematische Zаметki po Materialam Gerbariya imeni P.N. Krylova TGU = Systematic Notes on the Materials of P.N. Krylov Herbarium of the Tomsk State University. 2015;112:22-31. DOI 10.17223/20764103.112.3. (in Russian)]
- Кобозева Е.В., Емцева М.В., Асбаганов С.В., Агафонов А.В. Таксономическая специфичность дальневосточных видов *Elymus kamczadorum*, *E. charkeviczii* s. l. и *E. kronokensis*, выявляемая с помощью ISSR-маркеров. Растит. мир Азиатской России. 2017; 3(27):43-50. DOI 10.21782/RMAR1995-2449-2017-3(43-50).
[Kobozeva E.V., Emceva M.V., Asbaganov S.V., Agafonov A.V. Taxonomical specificity among species from the Russian Far East *Elymus kamczadorum*, *E. charkeviczii* s. l. and *E. kronokensis* revealed by ISSR-markers. Rastitel'nyj Mir Aziatskoj Rossii = Plant Life of Asian Russia. 2017;3(27):43-50. DOI 10.21782/RMAR1995-2449-2017-3(43-50). (in Russian)]
- Цвелев Н.Н. *Roegneria* C. Koch – регнерия, пырей бескорневищный. В: Арктическая флора СССР. М.; JL., 1964;2:230-247.
[Tsveliyov N.N. Wheatgrass *Roegneria* C. Koch. In: Arctic Flora of the USSR. Moscow; Leningrad, 1964;2:230-247. (in Russian)]
- Цвелев Н.Н., Пробатова Н.С. Роды *Elymus* L., *Elytrigia* Desv., *Agropyron* Gaertn., *Psathyrostachys* Nevski и *Leymus* Hochst. (Poaceae: Triticeae) во флоре России. В: Комаровские чтения. Владивосток: Дальнаука, 2010;57:5-102.
[Tsveliyov N.N., Probatova N.S. The genera *Elymus* L., *Elytrigia* Desv., *Agropyron* Gaertn., *Psathyrostachys* Nevski and *Leymus* Hochst. (Poaceae: Triticeae) in the flora of Russia. In: V.L. Komarov Memorial Lectures. Vladivostok: Dalnauka Publ., 2010;57:5-102. (in Russian)]
- Агафонов А.В., Саломон В. Генепулы among SH genome *Elymus* species in boreal Eurasia. In: Hernández P. et al. (Eds.) Triticeae IV. Consejería de Agricultura y Pesca. Spain, Sevilla, 2002;37-41.
- Barkworth M.E., Cambell J.J.N., Salomon B. *Elymus* L. In: Barkworth M.E. et al. (Eds.). Flora of North America. New York; Oxford: Oxford Univ. Press, 2007;24:288-343.
- Baum B.R., Yang J.-L., Yen C., Agafonov A.V. A taxonomic revision of the genus *Campeiostrachys* Drobov. J. Syst. Evol. 2011;49(2):146-159.
- Baum B.R., Yen C., Yang J.-L. *Roegneria*: its generic limits and justification for its recognition. Can. J. Bot. 1991;69:282-294.
- Dewey D.R. The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial Triticeae. In: Gustafson J.P. (Ed.). Gene Manipulation in Plant Improvement. New York, USA: Plenum Publ. Corp., 1984;209-279.
- Guindon S.E.P., Dufayard J.C.C.O., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Syst. Biol. 2010;59:307-321. DOI 10.1093/sysbio/syq010.
- Helgott D.M., Mason-Gamer R.J. The evolution of North American *Elymus* (Triticeae, Poaceae) allotetraploids: evidence from phosphoenolpyruvate carboxylase gene sequences. Syst. Bot. 2004;29: 850-861.
- Khanuja S.P., Shasany A.K., Darokar M., Kumar S. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. Plant Mol. Biol. Rep. 1999;17:74. DOI 10.1023/A:1007528101452.
- Lanfear R., Calcott B., Ho S.Y.W., Guindon S. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. Mol. Biol. Evol. 2012;29:1695-1701.

- Lanfear R., Frandsen P.B., Wright A.M., Senfeld T., Calcott B. PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Mol. Biol. Evol.* 2016;34(3):772-773. DOI 10.1093/molbev/msw260.
- Löve A. *Conspectus of the Triticeae*. Feddes Repert. 1984;95:425-521.
- Lu B.-R. The genus *Elymus* in Asia. Taxonomy and biosystematics with special reference to genomic relationships. In: Wang R.R.-C., Jensen K. (Eds.). *Proc. 2nd Int. Triticeae Symp.* Logan, Utah, USA, 1994;219-233.
- Lu B.-R., Salomon B. Differentiation of the SY genomes in Asiatic *Elymus*. *Hereditas*. 1992;116:121-126.
- Mason-Gamer R.J. Origin of North American *Elymus* (Poaceae: Triticeae) allotetraploids based on granule-bound starch synthase gene sequences. *Syst. Bot.* 2001;26:757-768.
- Mason-Gamer R.J. Reticulate evolution, introgression, and intertribal gene capture in an allohexaploid grass. *Syst. Biol.* 2004;53:25-37.
- Mason-Gamer R.J. Allohexaploidy, introgression, and the complex phylogenetic history on *Elymus repens* (Poaceae). *Mol. Phyl. Evol.* 2008;47:598-611.
- Mason-Gamer R.J. Phylogeny of a genomically diverse group of *Elymus* (Poaceae) allopolyploids reveals multiple levels of reticulation. *PLoS One*. 2013;8:e78449. DOI 10.1371/journal.pone.0078449.
- Mason-Gamer R.J., Burns M.M., Naum M. Phylogenetic relationships and reticulation among Asian *Elymus* (Poaceae) allotetraploids: analysis of three nuclear genes. *Mol. Phyl. Evol.* 2010a;54:10-22. DOI 10.1016/j.ympev.2009.10.002.
- Mason-Gamer R.J., Burns M.M., Naum M. Reticulate evolutionary history of a complex group of grasses: phylogeny of *Elymus* StStHH allotetraploids based on three nuclear genes. *PLoS One*. 2010b;5(6):e10989. DOI 10.1371/journal.pone.0010989.
- Mason-Gamer R.J., Weil C.F., Kellogg E.A. Granule-bound starch synthase: structure, function, and phylogenetic utility. *Mol. Biol. Evol.* 1998;15:1658-1673.
- Minh B.Q., Nguyen M.A.T., von Haeseler A. Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Mol. Biol. Evol.* 2013;30:1188-1195.
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Ugene team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012;28:1166-1167.
- Shmakov N.A., Afonnikov D.A., Belavin P.A., Agafonov A.V. The suitability of the *BMV2* and *WAXY* genes and internal transcribed spacers of rRNA as markers for studying genetic variability in *Elymus* species. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2015;5(3):300-307. DOI 10.1134/S207905971503017X.
- Trifinopoulos J., Nguyen L.-T., von Haeseler A., Minh B.Q. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* 2016;W1:W232-W235. DOI 10.1093/nar/gkw256.
- Wagner A., Blackstone N., Cartwright P., Dick M., Misof B., Snow P., Wagner G.P., Bartels J., Murtha M., Pendleton J. Surveys of gene families using polymerase chain-reaction – PCR selection and PCR drift. *Syst. Biol.* 1994;43(2):250-261.

ORCID ID

A.V. Agafonov orcid.org/0000-0002-1403-5867
S.V. Asbaganov orcid.org/0000-0002-7482-7495
I.V. Morozov orcid.org/0000-0002-0307-4203
A.A. Bondar orcid.org/0000-0001-9181-0487

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ЦСБС СО РАН «Оценка морфогенетического потенциала популяций растений Северной Азии экспериментальными методами (№ гос. регистрации АААА-А17-117012610051-5) при частичной поддержке РФФИ (проект № 18-04-01030). При подготовке публикации использовались материалы биоресурсной научной коллекции ЦСБС СО РАН «Коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте», УНУ № USU 440534. Секвенирование ДНК выполнено в ЦКП «Геномика» (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск). Авторы выражают глубокую благодарность инженеру ЦСБС СО РАН М.В. Емцевой за существенную помощь в оформлении результатов секвенирования гена *GBSS1*.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 06.06.2019. После доработки 30.07.2019. Принята к публикации 31.07.2019.

Пятая международная научная конференция PlantGen2019

Создание и изучение интрогрессивных линий мягкой пшеницы, полученных на основе синтетической формы RS7

Р.О. Давоян¹✉, И.В. Бебякина¹, Э.Р. Давоян¹, Д.С. Миков¹, Ю.С. Зубанова¹, Д.М. Болдаков¹, Е.Д. Бадаева², И.Г. Адонина³, Е.А. Салина³, А.Н. Зинченко¹

¹ Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко, Краснодар, Россия

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

³ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: davoyanro@mail.ru

Синтетическая форма RS7 (BBAAUS), у которой первые два генома, A и B, происходят от мягкой пшеницы, а третий состоит из хромосом *Aegilops speltoides* (S) и *A. umbellulata* (U), получена от скрещивания синтетических форм Авродес (BBAASS) и Авролата (BBAAUU). От беккроссов с восприимчивыми к листовой ржавчине, желтой ржавчине и мучнистой росе сортами мягкой пшеницы Краснодарская 99, Фишт и Ростислав были созданы устойчивые к этим болезням интрогрессивные линии. ПЦР-анализ показал наличие амплификации фрагментов с маркером SCS421, специфичным для гена *Lr28*, у линии 4991п17. Цитологическое изучение (C-banding и FISH) 14 линий выявило хромосомные перестройки у 12 из них. В большинстве случаев линии несут транслокации от *Ae. speltoides*, установленные в хромосомах 1D, 2D, 3D, 2B, 4B, 5B и 7B. Были идентифицированы также линии с замещенными хромосомами 1B (1S), 4D (4S), 5D (5S) и 7D (7S). Отобраны линии, несущие одновременно генетический материал от *Ae. speltoides* и *Ae. umbellulata*. У линии 3379п14 идентифицированы транслокации: T7US-7DS.7DL – в коротком плече хромосомы 7D от *Ae. umbellulata* и в хромосомах 5BL, 1DL, 2DL от *Ae. speltoides*. В линии 4626п16 определены транслокации: 2DS.2DL-2UL от *Ae. umbellulata* и T7SS.7SL-7DL от *Ae. speltoides*. Транслокации T1DS.1DL-1SL, T3DS.3DL-3SL от *Ae. speltoides* и T2DS.2DL-2UL, T7DL.7DS-7US от *Ae. umbellulata* выявлены впервые. Сделано предположение, что линии могут нести неидентифицированные ранее гены устойчивости к грибным болезням, в частности к листовой ржавчине, от видов *Ae. speltoides* и *Ae. umbellulata*.

Ключевые слова: мягкая пшеница; синтетические формы; устойчивость к болезням; цитологический анализ; замещенные хромосомы; транслокации; C-banding; FISH.

Для цитирования: Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян Э.Р., Миков Д.С., Зубанова Ю.С., Болдаков Д.М., Бадаева Е.Д., Адонина И.Г., Салина Е.А., Зинченко А.Н. Создание и изучение интрогрессивных линий мягкой пшеницы, полученных на основе синтетической формы RS7. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(7):827-835. DOI 10.18699/VJ19.556

The development and study of common wheat introgression lines derived from the synthetic form RS7

R.O. Davoyan¹✉, I.V. Bebyakina¹, E.R. Davoyan¹, D.S. Mikov¹, Yu.S. Zubanova¹, D.M. Boldakov¹, E.D. Badaeva², I.G. Adonina³, E.A. Salina³, A.N. Zinchenko¹

¹ National Center of Grain named after P.P. Lukyanenko, Krasnodar, Russia

² Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, Russia

³ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: davoyanro@mail.ru

Synthetic recombination form RS7 (BBAAUS), in which the first two genomes, A and B, originate from common wheat, and the third recombinant genome consists of *Aegilops speltoides* (S) and *Ae. umbellulata* (U) chromosomes, was obtained from crossing synthetic forms Avrodes (BBAASS) and Avrolata (BBAAUU). Resistant to leaf rust, yellow rust and powdery mildew, introgression lines have been obtained from backcrosses with the susceptible varieties of common wheat Krasnodarskaya 99, Fisht and Rostislav. PCR analysis showed the presence of amplification fragments with marker SCS421 specific for the *Lr28* gene in the line 4991n17. The cytological study (C-banding and FISH) of 14 lines has revealed chromosomal modifications in 12 of them. In most cases, the lines carry translocations from *Ae. speltoides*, which were identified in chromosomes 1D, 2D, 3D, 2B, 4B, 5B and 7B. Also, lines with the substituted chromosomes 1S (1B), 4D (4S), 5D (5S) and 7D (7S) were identified. Lines that have genetic material from *Ae. speltoides* and *Ae. umbellulata* at once were revealed. In the line 3379n14, translocations in the short arm of chromosome 7D from *Ae. umbellulata* and chromosomes 5BL, 1DL, 2DL from *Ae. speltoides* were revealed. The line 4626p16 presumably has a translocation on the long arm of chromosome 2D from *Ae. umbellulata* and the T7SS.7SL-7DL translocation from *Ae. speltoides*. The T1DS.1DL-1SL and T3DS.3DL-3SL translocations from *Ae. speltoides*, and T2DS.2DL-2UL and T7DL.7DS-7US from

Ae. umbellulata have been obtained for the first time. These lines may carry previously unidentified disease resistance genes and, in particular, leaf rust resistance genes from *Ae. speltoides* and *Ae. umbellulata*.

Key words: common wheat; synthetic forms; resistance to diseases; cytological analysis; substituted chromosomes; translocations; C-banding; FISH.

For citation: Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan E.R., Mikov D.S., Zubanova Yu.S., Boldakov D.M., Badaeva E.D., Adonina I.G., Salina E.A., Zinchenko A.N. The development and study of common wheat introgression lines derived from the synthetic form RS7. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(7): 827-835. DOI 10.18699/VJ19.556 (in Russian)

Введение

Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) – важнейшая продовольственная культура. Генетический потенциал ее продуктивности в настоящее время практически исчерпан, и урожайность во многом зависит от устойчивости возделываемых сортов к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам среды. Генетических ресурсов самой мягкой пшеницы недостаточно для решения этих проблем. В особенности это касается генов устойчивости к болезням, ограниченное разнообразие которых является одним из основных лимитирующих факторов селекции.

Значительный резерв генов, контролирующих хозяйственно ценные признаки, находится в генофонде многочисленных родственных мягкой пшенице видов и родов. Многие из них были с успехом использованы для решения актуальных задач селекции мягкой пшеницы (Knott, 1987; Friebe et al., 1996). В настоящее время значительная часть эффективных генов устойчивости к болезням происходит из этого генофонда (McIntosh et al., 2013). Один из эффективных методов передачи ценного генетического материала от диких сороридей – создание и использование синтетических геномно-замещенных и геномно-добавленных форм в качестве «мостиков» для передачи генетического материала в культурную пшеницу от диких сороридей.

В Национальном центре зерна (НЦЗ) им. П.П. Лукьяненко разработан оригинальный подход, позволивший создать синтетические геномно-замещенные формы Авродес (BBAASS), Аврозис (BBAAS^{shSh}), Авролата (BBAUU), Авротата (BBAAN^{nN}), Авроале (BBAARR), у которых геном D мягкой пшеницы был замещен, соответственно, на геномы *Ae. speltoides*, *Ae. sharonensis*, *Ae. umbellulata*, *Ae. uniaristata* и *S. cereale* (Жиров и др., 1984). Эти формы были использованы для передачи хозяйственно ценных генов в мягкую пшеницу, а также для получения «вторичных» синтетических форм (Давоян и др., 2012). Основной формой для создания рекомбинантных синтетиков была синтетическая форма Авродес. Она обладает полученной от *Ae. speltoides* способностью стимулировать гомеологичную конъюгацию хромосом (Tsatsenco et al., 1993). Кроме этого, синтетическая форма Авродес проявляет высокую устойчивость к листовой ржавчине (*Puccinia triticina* Eriks.), желтой ржавчине (*Puccinia striiformis* West.), мучнистой росе (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*), а также отличается повышенным содержанием белка. Предполагалось, что общие для всех форм геномы ВА мягкой пшеницы могут стать основой для возможного рекомбинационного процесса между хромосомами двух различных геномов диких видов. Такие формы можно использовать для получения множественных интрогрессий, новых транслокаций, они способствуют в отдельных случаях передаче генетического материала одновременно от двух

дикорастущих видов. От скрещивания формы Авродес с другими геномно-замещенными формами были получены синтетические формы (RS-формы), у которых первые два генома, А и В, происходят от мягкой пшеницы сорта Аврора, а третий геном сочетает хромосомы генома S от *Ae. speltoides* с хромосомами других диких видов: *Ae. umbellulata* (U), *Ae. sharonensis* (S¹), *Secale cereale* (R) (Давоян и др., 2012).

В настоящей работе приведены результаты создания, молекулярно-цитологического анализа и оценки по устойчивости к грибным болезням интрогрессивных линий мягкой пшеницы, полученных с использованием синтетической формы RS7 (BBAASU) (Авролата × Авродес).

Материалы и методы

Исходным материалом были интрогрессивные линии мягкой пшеницы (BC₂F₆–BC₃F₅), полученные от последовательных скрещиваний синтетической формы RS7 с восприимчивыми к листовой ржавчине, желтой ржавчине и мучнистой росе сортами мягкой пшеницы селекции НЦЗ им. П.П. Лукьяненко: Краснодарская 99, Фишт и Ростислав. Сорт Ростислав несет в себе ржаную транслокацию 1RS.1BL. Сорт Фишт имеет транслокацию 5BS.5BL-5GL и замещенные хромосомы 1D(1D¹) и 6D(6D¹), полученные от видов *T. militinae*, *Ae. tauschii* через синтетическую форму *T. miguschovae*.

Конъюгацию хромосом в метафазе I мейоза изучали на давленных препаратах, окрашенных уксуснокислым гематоксилином. Для приготовления маточного раствора гематоксилина брали 4 г порошка гематоксилина, 1 г железо-аммиачных квасцов, доводили до 100 мл 45 % уксусной кислотой. Реактив созревал в течение 160 ч в темноте в термостате при подогреве до 40 °С. Полученный реактив черного цвета фильтровали с помощью складчатого фильтра и оставляли в темной бутылке на хранение в холодильнике. Для окрашивания колосков пшеницы, взятых в стадии прохождения мейоза, реактив разбавляли 45 % уксусной кислотой в 1.5–2 раза. Предварительно зафиксированные в фиксаторе Карнуа колосья (Паушева, 1974) окрашивали разбавленным раствором гематоксилина в термостате при 25 °С в течение 1–2 суток. В мейозе подсчитывали число би-, уни- и мультивалентов.

Заражение и оценку по устойчивости к болезням растений во взрослой стадии проводили в полевых условиях. Популяцию линий заражали смесью уредоспор желтой и листовой ржавчины, собранных с разных сортов пшеницы в фазах выхода в трубку и трубка–колосшение соответственно. Устойчивость к желтой ржавчине определяли по шкале Гасснера и Штрайба в фазу молочной спелости зерна (Gasner, Straib, 1934). Учет поражения листовой

Таблица 1. Гены устойчивости к листовой ржавчине и характеристика праймеров, использованных для их идентификации

Ген	Праймер	Условия амплификации фрагментов (температура отжига, °C)	Размер фрагмента, п. н.	Литературный источник
Lr28	CS421570-R	60	570	Cherukuri et al., 2005
	CS421570-L			
Lr35	BCD260F1	59	931	Seyfarth et al., 1999
	35R2			
Lr47	PS10R	61	224	Dubcovsky et al., 2000
	PS10L			
Lr51	S30-13L	52	422	Helguera et al., 2005
	AGA7-759R			
Lr9	FJ13/1	63	1100	Schachermayer et al., 1994
	FJ13/2			

ржавчиной проводили в фазу молочно-восковой спелости зерна по международной шкале Майнса и Джексона (Mains, Jackson, 1926). К устойчивым относили растения с типом реакции 0 (иммунные), 1 (высокоустойчивые) и 2 (умеренно устойчивые). Растения с промежуточным типом реакции от 0 до 1 (единичные очень мелкие пустулы с некрозом) обозначали баллом 01. К восприимчивым относили растения с типом реакции 3–4. Оценку устойчивости к мучнистой росе проводили на естественном инфекционном фоне в фазу колошения по шкале Гешеле (Пересыпкин, 1979). Растения со степенью поражения мучнистой росой 0–20 % считались устойчивыми.

ДНК выделяли из 5–7-дневных этилированных проростков пшеницы по методу Плашке с коллегами (Plaschke et al., 1995). Идентификацию генов *Lr* осуществляли с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами, маркирующими гены *Lr9*, *Lr28*, *Lr35*, *Lr47*, *Lr51* и *Lr66*. Праймеры подбирали на основании литературных данных, их названия и условия амплификации приведены в табл. 1.

Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 1× буфер для Taq-ДНК-полимеразы (50 мМ KCl, 20 мМ трис-HCl, pH 8.4, 2–5 мМ MgCl₂, 0.01 % твин-20), 2 мМ MgCl₂, по 0.2 мМ каждого dNTP, 12.5 мМ каждого праймера, 50 нг ДНК и 1 ед. Taq-полимеразы. Амплификацию вели согласно условиям, приведенным в табл. 1, с незначительными модификациями. Продукты ПЦР разделяли с использованием электрофореза в 1.8 % агарозном геле с 0.5× буфером TBE. Гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолетовом свете с помощью фотобокса Infinity 1000.

В качестве положительных контролей для определения генов были использованы почти изогенные линии сорта Thatcher с генами устойчивости к листовой ржавчине *Lr9* (TcLr9) и *Lr35* (TcLr35), в качестве отрицательного контроля был восприимчивый к листовой ржавчине сорт Аврора.

Дифференциальное окрашивание хромосом (C-banding) осуществляли в Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова по методике, разработанной в лаборатории функциональной морфологии хромосом Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (Badaeva et al., 1994).

Флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) проводили в Институте цитологии и генетики СО РАН по ранее опубликованной методике (Salina et al., 2006) с применением зондов pSc119.2 (Bedbrook et al., 1980) и pAs1 (Rayburn, Gill, 1986) для идентификации хромосом (Schneider et al., 2003), Spelt1 (Salina et al., 2004) – для выявления генетического материала *Ae. speltoides* в исследуемых линиях.

Результаты

Синтетическая форма RS7 проявляла высокую устойчивость к листовой и желтой ржавчине и мучнистой росе, но была полностью стерильна. Для передачи устойчивости и восстановления фертильности эту форму последовательно скрещивали с восприимчивыми к этим болезням сортами мягкой пшеницы Краснодарская 99, Фишт и Ростислав. Первое поколение гибридных растений было частично фертильным либо полностью стерильным и также проявляло устойчивость к комплексу болезней пшеницы. В зависимости от уровня фертильности этих растений проводили беккроссирование мягкой пшеницей от 1 до 3 раз, но в большинстве случаев для ее восстановления было достаточно двух беккроссов. Полученные от беккроссов растения имели от 40 до 42 хромосом. Результаты цитологического изучения хромосомных ассоциаций в метафазе I мейоза приведены в табл. 2.

В первых поколениях растений, полученных от беккроссов с мягкой пшеницей, наблюдается большое количество растений с мультивалентами (80 %), которое существенно уменьшается (до 8.2 %) по мере увеличения числа беккроссов и отбора фертильных растений с нужными признаками в следующих поколениях. Примеры конъюгации хромосом в метафазе I мейоза у гибридных растений показаны на рис. 1.

В результате отбора 42-хромосомных растений со стабильным протеканием мейоза из популяции гибридных растений RS7 × *T. aestivum* поколения BC₂F₆–BC₃F₅ получено 130 линий. В настоящей статье представлены результаты изучения 14 линий, наиболее интересных по своим морфо-биологическим признакам.

Поскольку главной задачей являлась передача от RS7 мягкой пшенице устойчивости к болезням, линии оценивались по устойчивости к наиболее распространенным и

Таблица 2. Характеристика гибридных растений RS7 × *T. aestivum* поколения F₁ и (BC₁F₁–BC₃F₁) по наличию мультивалентов в метафазе I мейоза

Поколение	Всего изученных растений	Кол-во растений с мультивалентами
F ₁	25	20 (80 %)*
BC ₁ F ₁	60	35 (58.3 %)
BC ₁ F ₁ –BC ₂ F ₁	75	25 (33.3 %)
BC ₂ F ₁ –BC ₃ F ₁	134	11 (8.2 %)

* Процентное содержание от общего числа растений.

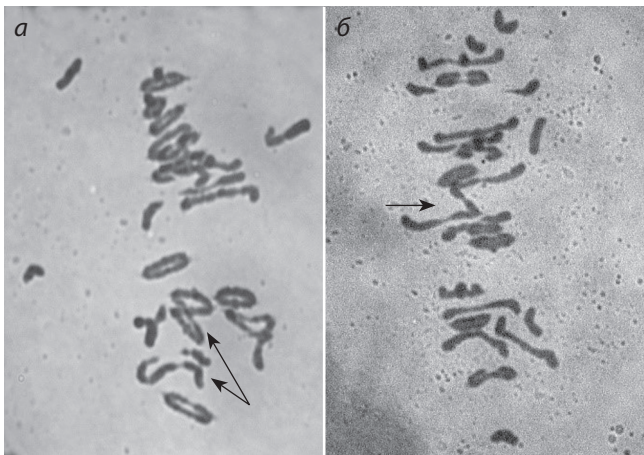


Рис. 1. Конъюгация хромосом в метафазе I мейоза у гибридных растений.

а – F₁ RS7 × Краснодарская 99 (12^{II}+6^I+1^{VIII}+1^{IV}) (42 хр.); б – BC₃ (RS7 × Краснодарская 99) × Ростислав (16^{II}+5^I+1^V). Стрелками обозначены мультиваленты.

вредоносным болезням – листовой и желтой ржавчине и мучнистой росе. В табл. 3 приведена их характеристика за 2017–2018 гг. Все 14 линий были устойчивы к листовой ржавчине. Высокую резистентность с типом реакции 01 и 1 имели 6 линий: 3379п14, 4581п16, 4662п16, 4665п16, 4991п17 и 5026п17. Остальные линии обладали средней устойчивостью к этой болезни. Резистентность к желтой ржавчине несли также все 14 линий, 3 из которых, 4581п16, 4623п16 и 4626п16, имеют тип реакции на заражение 01. Устойчивость к мучнистой росе проявили 12 линий.

Особую ценность для селекции представляют линии, устойчивые к комплексу болезней. Две линии, 4665п16 и 4670п16, имели групповую устойчивость к двум и 12 линий ко всем трем болезням. Следует отметить линии 3379п14, 4581п16 и 4991п17, обладающие высокой резистентностью ко всем трем болезням.

Разный тип реакции линий по устойчивости к листовой ржавчине может свидетельствовать о различных интрогрессиях чужеродного генетического материала в геном мягкой пшеницы. Для того чтобы выяснить природу переданного материала от синтетической формы RS7, были скрещены 10 изучаемых линий с одним из наиболее

Таблица 3. Характеристика интрогрессивных линий RS7 × *T. aestivum* по устойчивости к комплексу болезней пшеницы (2017–2018 гг.)

№ линии, сорта	Устойчивость		
	к листовой ржавчине, балл	к желтой ржавчине, балл	к мучнистой росе, %
4572п16	2	2	20
3379п14	01	2	15
4581п16	01	01	15
4586п16	2	1	20
4607п16	2	2	15
4623п16	2	01	15
4626п16	2	01	15
4635п16	2	2	20
4662п16	1	1	20
4665п16	1	2	25
4670п16	2	1	25
4671п16	2	2	20
4991п17	1	1	15
5026п17	1	2	20
Краснодарская 99	4	3	25
Фишт	3	3	30
Ростислав	3	3	30

мейотически стабильных сортов мягкой пшеницы Краснодарская 99 и изучен мейоз у гибридов F₁ (табл. 4).

Ассоциация хромосом у гибридных растений F₁, 20^{II}+2^I и 19^{II}+4^I может свидетельствовать о замещении одной или двух пар пшеничных хромосом на чужеродные. Такие замещения могут быть у 8 линий из 10 анализируемых – 3379п14, 4581п16, 4586п16, 4623п16, 4626п16, 4635п16, 4662п16 и 4671п16. Наличие мультивалентов у гибридов с линиями 3379п14 (0.5 %); 4626п16 (1.7 %); 4635п16 (2.9 %); 4662п16 (2.3 %) и 4671п16 (1.9 %) свидетельствует о том, что эти линии могут нести транслокации от синтетика RS7 и сортов Фишт и Ростислав.

Для идентификации перестроек хромосом и изменений в геноме у интрогрессивных линий нами были использованы методы дифференциального окрашивания хромосом (C-banding) и флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). Применение метода дифференциальной окраски хромосом для двух линий, 5026п17 и 4991п17, с генетическим материалом RS7 позволило выявить у них неизвестные ранее перестройки и замещения хромосом (рис. 2). Линия 5026п17, кроме известной транслокации 1RS.1BL, имеет замещение хромосомы 5D на хромосому 5S от *Ae. speltoides*. Линия 4991п17 несет замещения 7D (7S) от *Ae. speltoides* и 6D (6D^{ae}) от другого вида *Aegilops*. Предположительно, замещение 6D (6D^{ae}) происходит от сорта-реципиента Фишт, который, в свою очередь, получил это замещение от *T. miguschovae* (GGAADD), в которой присутствует геном D от *Ae. tauschii* (Давоян и др., 2012).

Таблица 4. Анализ мейоза в метафазе I в материнских клетках пыльцы у гибридов F₁, полученных от скрещивания цитологически стабильных линий RS7 × *T. aestivum* с сортом Краснодарская 99

Растительный материал	Изучено клеток	21 ^{II} , %	20 ^{II} +2 ^I , %	19 ^{II} +4 ^I , %	Клетки с мультивалентами, %
4572п16×K99*	168	89.5	7.9	2.6	–
3379п14×K99	205	56.3	43.2	–	0.5
4581п16×K99	226	66.7	30.5	2.8	–
4586п16×K99	178	69.3	30.7	–	–
4607п16×K99	128	92.2	7.0	0.8	–
4623п16×K99	256	45.6	42.3	12.1	–
4626п16×K99	305	79.6	14.4	4.3	1.7
4635п16×K99	238	79.8	11.2	6.1	2.9
4662п16×K99	334	67.4	20.1	10.2	2.3
4671п16×K99	312	46.5	39.4	12.2	1.9
Краснодарская 99	112	91.0	6.3	2.7	–

* K99 – сорт пшеницы Краснодарская 99.

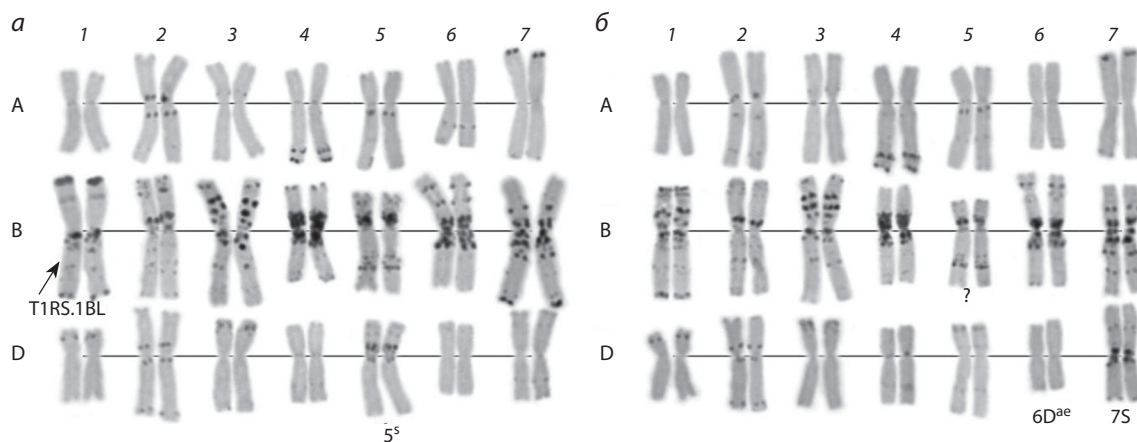


Рис. 2. Кариотипы интрогрессивных линий: а – 5026п17; б – 4991п17 с генетическим материалом рекомбинантной синтетической формы RS7.

С использованием метода флуоресцентной *in situ* гибридизации проанализировано 12 линий (табл. 5). Хромосомные перестройки затронули 10 из 12 изученных линий. Участие хромосом генома А в перестройках не установлено. Перестройки хромосом генома В определены у 8 линий и генома D – 11 линий. Наиболее часто перестройки затрагивают хромосомы 5В (6 линий) и 2D (4 линии). В большинстве случаев линии несут транслокации от *Ae. speltooides*. Транслокации от этого вида идентифицированы на хромосомах 1D, 2D, 3D, 5D, 7D, 4В, 5В. Выявлены также линии с замещением хромосом пшеницы на хромосомы *Ae. speltooides*: 1В(1S) и 4D(4S).

Линий, несущих транслокации и замещенные хромосомы только от *Ae. umbellulata*, не обнаружено. В то же время две линии несут одновременно генетический материал от *Ae. speltooides* и *Ae. umbellulata*. В линии 3379п14 (рис. 3, а) определены транслокации: T7DL.7DS-7US в коротком плече хромосомы 7D от *Ae. umbellulata* и на плечах хромосом 5BL, 1DL, 2DL от *Ae. speltooides*. Кроме этого, у этой линии обнаружено замещение хромосомы 4D на

хромосому 4S *Ae. speltooides*. Линия 4626п16 (см. рис. 3, б), предположительно, имеет транслокацию T2DS.2DL-2UL на длинном плече хромосомы 2D от *Ae. umbellulata* и транслокацию в хромосоме 7D от *Ae. speltooides*. В ней могут присутствовать также транслокации от *Ae. speltooides* на хромосомах 5В и 7В. Следует отметить, что транслокации T1DS.1DL-1SL, T2DS.2DL-2UL, T7DL.7DS-7U и хромосомное замещение 4D (4S) получены впервые.

Выявленные интрогрессивные линии представляют особый интерес как возможные доноры новых генов устойчивости к болезням, в частности к листовой ржавчине, переданных от видов *Ae. speltooides* и *Ae. umbellulata*. В настоящее время в каталог генных символов пшеницы внесено шесть генов устойчивости, переданных от *Ae. speltooides*: *Lr 28*, *Lr 35*, *Lr36*, *Lr47*, *Lr51*, *Lr66* и один ген, *Lr9*, от *Ae. umbellulata* (McIntosh et al., 2013).

Для постуляции генов устойчивости к листовой ржавчине в геноме полученных нами линий использовали ДНК-маркеры. Ранее (Давоян и др., 2012) был проведен анализ синтетической формы Авродес на присутствие

Таблица 5. Результаты анализа интрогрессивных линий RS7 × *T. aestivum* методом флуоресцентной *in situ* гибридизации

Линия	Источник чужеродного генетического материала	Выявленные транслокации и замещения
4572п16	<i>Ae. speltoides</i> <i>Ae. umbellulata</i>	Полный набор хромосом пшеницы. Хромосомные перестройки не выявлены
3379п14	<i>Ae. speltoides</i> <i>Ae. umbellulata</i>	T1RS.1BL; T1DS.1DL-1SL; T2DS.2DL-2SL; T5BS.5BL-5SL; 4D(4S); транслокация или делеция в 6DL T7DL.7DS-7US
4581п16	<i>Ae. speltoides</i> <i>Ae. umbellulata</i>	1B(1S), T5BS.5BL-5SL Не выявлены
4586п16	<i>Ae. speltoides</i> <i>Ae. umbellulata</i>	T1RS.1BL; T3DS.3DL-3SL Не выявлены
4607п16	<i>Ae. speltoides</i> <i>Ae. umbellulata</i>	Полный набор хромосом пшеницы. Хромосомные перестройки не выявлены
4623п16	<i>Ae. speltoides</i> <i>Ae. umbellulata</i>	T1RS.1BL; T5BS.5BL-5SL Не выявлены
4626п16	<i>Ae. speltoides</i> <i>Ae. umbellulata</i>	T7DL-7SL.7SS; T5BS.5BL-5SL T2DS.2DL-2UL
4635п16	<i>Ae. speltoides</i> <i>Ae. umbellulata</i>	T1RS.1BL; T2DS.2DL-2SL; T5BS.5BL-5SL Не выявлены
4662п16	<i>Ae. speltoides</i> <i>Ae. umbellulata</i>	T1RS.1BL; T5D Не выявлены
4665п16	<i>Ae. speltoides</i> <i>Ae. umbellulata</i>	T5BS.5BL-5SL Не выявлены
4670п16	<i>Ae. speltoides</i> <i>Ae. umbellulata</i>	T1RS.1BL. Возможная транслокация от <i>Ae. speltoides</i> на длинных плечах пары неидентифицированных хромосом генома A Не выявлены
4671п16	<i>Ae. speltoides</i> <i>Ae. umbellulata</i>	T1RS.1BL; T2DS.2DL-2SL; T4BS (неустановленной природы); T5BL (неустановленной природы) Не выявлены

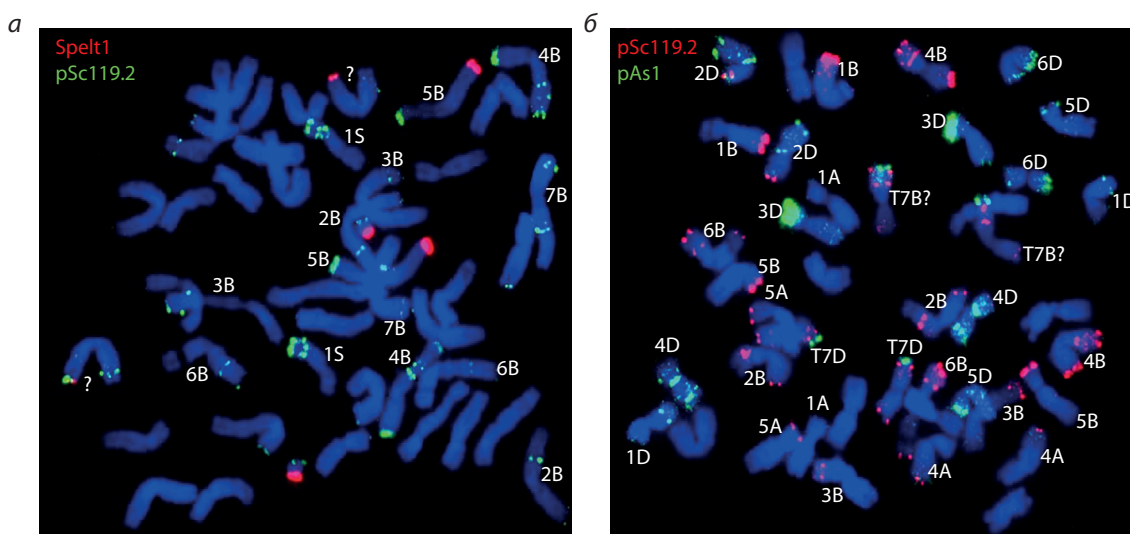


Рис. 3. Гибридизация *in situ*: а – с зондами Spelt1 (красный) и pSc119.2 (зеленый) на метафазных хромосомах линии 3379п14; б – с зондами pAs1 (зеленый) и pSc119.2 (красный) на метафазных хромосомах линии 4626 п16.

генов устойчивости к листовой ржавчине *Lr28*, *Lr35*, *Lr47*, *Lr51* и формы Авролата – на наличие гена *Lr9*. Ген устойчивости *Lr36* в анализ не был включен в связи с отсутствием эффективного молекулярного маркера к нему. Идентификацию гена *Lr66* на данном этапе не проводили.

Установлено, что синтетическая форма Авродес имеет из перечисленных генов только *Lr28*, *Lr35* и *Lr51*. В синтетической форме Авролата было подтверждено наличие гена *Lr9*. Исходя из этого, полученные интрогрессивные линии анализировали только на наличие у них эффектив-

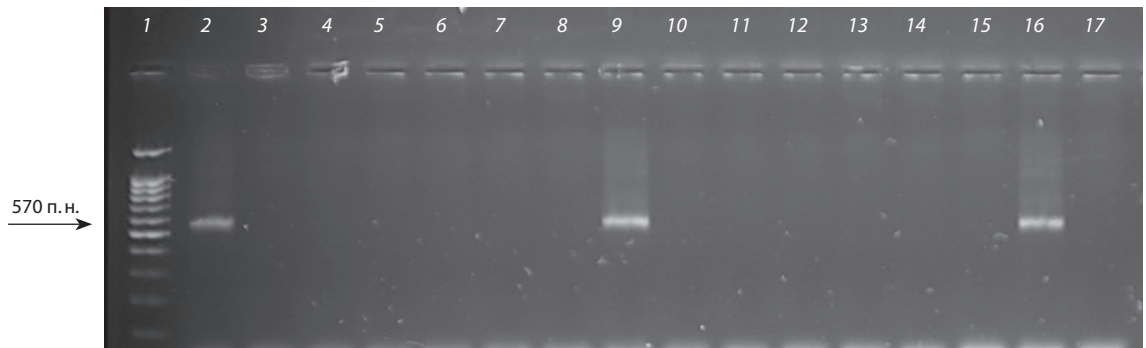


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов амплификации, полученных с использованием пары праймеров, CS421570-R и CS421570-L, к диагностическому маркеру, сцепленному с геном устойчивости к листовой ржавчине *Lr28*.

1 – маркер длины; 2 – TcLr28; 3–14 – интрогрессивные линии; 9 – линия 4991п17; 15 – Аврората; 16 – Авродес; 17 – сорт Аврора.

ных генов устойчивости к листовой ржавчине *Lr9*, *Lr28*, *Lr35* и *Lr51*.

В анализ было включено 12 линий, кроме двух линий, 4572п16 и 4607п16, в которых, по результатам цитологического анализа, не было выявлено чужеродных интрогрессий. Только у одной линии, 4991п17, установлена амплификация фрагмента для маркера SCS421, специфичного для гена *Lr28* (рис. 4). В остальных линиях искомые гены маркерным анализом не обнаружены.

Обсуждение

Основной практической задачей при создании и использовании синтетической формы RS7 была возможность передачи от *Ae. speltooides* и *Ae. umbellulata* мягкой пшенице новых генов устойчивости к болезням. Такая работа основана на получении интрогрессивных линий с генетическим материалом от этих видов. Анализ конъюгации хромосом в метафазе I мейоза у гибридных растений, полученных от скрещивания RS7 с мягкой пшеницей, выявил большое количество растений с мультивалентами (80 %) в F₁, которое по мере увеличения числа беккроссов и отбора фертильных растений с нужными признаками в следующих поколениях существенно уменьшилось (до 8.2 % в BC₃). При получении рекомбинантных синтетических форм геномно-замещенная форма Авродес использована нами не только как источник ценных генов устойчивости к болезням, но и как промотор гомеологичной конъюгации хромосом. Можно предположить, что наиболее активно гомеологичная конъюгация хромосом осуществлялась в первых поколениях. В популяции гибридных растений происходил естественный отбор, стабилизирующий количество хромосом и их ассоциацию в мейозе в сторону мягкой пшеницы. Таким образом, в поколениях BC₂–BC₃ можно было проводить отбор фертильных растений с полезными признаками.

Отобранные для изучения 14 линий RS7 × *T. aestivum* поколения BC₂F₆–BC₃F₅ различались по устойчивости к листовой и желтой ржавчине и мучнистой росе. Выявлены линии с типами реакции к листовой ржавчине 01, 1 и 2, к желтой ржавчине 01, 1 и 2, со степенью поражения мучнистой росой 15 и 20 %. Линии отличаются также по устойчивости к комплексу перечисленных болезней. Разнообразие линий по устойчивости к болезням может сви-

детельствовать о различных интрогрессиях генетического материала RS7 в геноме мягкой пшеницы и возможной передаче нового гена(ов) устойчивости.

Цитологический анализ (C-banding и FISH) выявил хромосомные перестройки у 12 из 14 линий. Установлено, что генетический материал от синтетической формы RS7 в изученных линиях представлен как в форме транслокаций, так и в виде замещенных хромосом. Несмотря на небольшое количество изученных линий, было выявлено 12 хромосом с интрогрессиями, при этом в основном перестройками были затронуты хромосомы геномов В (4 хромосомы) и D (7 хромосом) мягкой пшеницы. Полученные результаты вполне ожидаемы. Они объясняются, во-первых, тем, что в синтетических формах Авродес (BBAASS) и Аврората (BBAUU) геном D мягкой пшеницы замещен на геномы *S Ae. speltooides* и U от *Ae. umbellulata*, во-вторых, *Ae. speltooides* является вероятным донором генома В и, в-третьих – способностью синтетика Авродес стимулировать гомеологичную конъюгацию хромосом (Tsatsenco et al., 1993). Особо следует отметить обнаруженные впервые у мягкой пшеницы транслокации: T1DS.1DL-1SL, T2DS.2DL-2UL, T3DS.3DL-3SL, T7DL.7DS-7U, так как они могут быть вероятными источниками новых генов устойчивости к болезням, в частности к листовой ржавчине.

У некоторых линий результаты цитологического анализа и оценки по устойчивости к болезням не совпадают. Так, например, у линии 4623п16 методом гибридизации *in situ* идентифицировано всего две транслокации: T1RS.1BL и T5BS.5BL-5SL. В то же время анализ мейоза в метафазе I у гибридов F₁, полученных от скрещивания этой линии с сортом Краснодарская 99, свидетельствует о наличии в ней большего количества интрогрессий. В относительно устойчивых линиях 4572п16 и 4607п16 хромосомные перестройки не выявлены. Вероятно, в этих линиях присутствуют перестройки, которые не определяются методом FISH. В частности, это могут быть замещения 1D(1D¹) и 6D(6D¹), полученные от сорта Фишт. В нашей работе замещение 6D(6D¹) у линии 4991п17 было установлено методом дифференциального окрашивания хромосом (C-banding).

От вида *Ae. speltooides* мягкой пшенице переданы гены устойчивости к листовой ржавчине *Lr28*, *Lr35*, *Lr36*, *Lr47*,

Lr51 и *Lr66* (McIntosh et al., 2013). Эти гены были перенесены в хромосомы мягкой пшеницы 4A, 2B, 6B, 7A, 1B и 3A (Friebe et al., 1996; Dubcovsky et al., 2000; Helguera et al., 2005; Marais et al., 2010). Кроме этого, И.Г. Адонина с коллегами (2012) охарактеризовали новую транслокацию T5BS-5BL-5SL от *Ae. speltoides* с эффективным геном, обозначенным как *LrASP5*. Несмотря на довольно большое количество переданных генов, не исключено, что у *Ae. speltoides* могут присутствовать другие гены устойчивости к листовой ржавчине, о чем также свидетельствуют полученные нами ранее результаты (Давоян и др., 2017).

От *Ae. umbellulata* передан единственный ген устойчивости *Lr9*, локализованный в хромосоме 6B (Sears, 1956). Из перечисленных генов в селекции в основном используются гены устойчивости *Lr9*, *Lr28*, *Lr47*, *LrASP5* (Friebe et al., 1996; Адонина и др., 2016). На основании маркерного анализа сделано предположение, что синтетическая форма Авродес имеет из перечисленных генов только три: *Lr28*, *Lr35* и *Lr51* (Давоян и др., 2012). В синтетической форме Авролата подтверждено наличие гена *Lr9* (Давоян и др., 2012). Из проанализированных 14 линий только у одной линии, 4991п17, идентифицирован диагностический фрагмент амплификации маркера SCS421, разработанного для идентификации гена *Lr28*. В остальных линиях искомые гены не установлены.

Идентификация гена *LrAsp5* не проводилась. В то же время транслокация T5BS-5BL-5SL выявлена у шести из полученных нами линий: 3379п16, 4581п16, 4623п16, 4626п16, 4635п16, 4665п16. Возможно, эти линии также могут иметь ген устойчивости *LrAsp5* от *Ae. speltoides*.

Заключение

Таким образом, использование синтетической формы RS7 позволило получить большое разнообразие интрогрессивных линий, устойчивых к листовой и желтой ржавчине и мучнистой росе. Выявлены линии с новыми транслокациями и замещениями от *Ae. speltoides* и *Ae. umbellulata*, которые могут нести новые гены устойчивости к грибным болезням.

Список литературы / References

Адонина И.Г., Леонова И.Н., Бадаева Е.Д., Салина Е.А. Генотипирование сортов мягкой пшеницы разных регионов России. Вавиловский журнал генетики селекции. 2016;20(1):44-50. DOI 10.18699/VJ16.107.
[Adonina I.G., Leonova I.N., Badaeva E.D., Salina E.A. Genotyping of hexaploid wheat varieties from different Russian regions. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):44-50. DOI 10.18699/VJ16.107. (in Russian)]
Адонина И.Г., Петраш Н.В., Тимонова Е.М., Христов Ю.А., Салина Е.А. Создание и изучение устойчивых к листовой ржавчине линий мягкой пшеницы с транслокациями от *Aegilops speltoides* Tausch. Генетика. 2012;48(4):488-494.
[Adonina I.G., Petrash N.V., Timonova E.M., Khristov Y.A., Salina E.A. Construction and study of leaf rust resistant common wheat lines with translocations of *Aegilops speltoides* Tausch. Russ. J. Genet. 2012;48(4):404-409.]
Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян Э.Р., Миков Д.С., Бадаева Е.Д., Адонина И.Г., Салина Е.А., Зинченко А.С., Зубанова Ю.С. Использование синтетической формы Авродес для передачи устойчивости к листовой ржавчине от *Aegilops speltoides* мягкой

пшенице. Вавиловский журнал генетики селекции. 2017;21(6):663-670. DOI 10.18699/VJ17.284.
[Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan E.R., Mikov D.S., Badaeva E.D., Adonina I.G., Salina E.A., Zinchenko A.N., Zubanova Y.S. Use of synthetic form Avrodes for transfer of leaf rust resistance from *Aegilops speltoides* to common wheat. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):663-670. DOI 10.18699/VJ17.284. (in Russian)]
Давоян Э.Р., Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян О.Р., Зубанова Ю.С., Зинченко А.Н., Кравченко А.М. Идентификация генов устойчивости к листовой ржавчине в видах *Aegilops* L., синтетических формах и интрогрессивных линиях мягкой пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012;16(1):116-122.
[Davoyan E.R., Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan O.R., Zubanova Yu.S., Kravchenko A.M., Zinchenko A.N. Identification of a leaf rust-resistance gene in species of *Aegilops* L., synthetic forms, and introgression lines of common wheat. Russ. J. Genet.: Appl. Res. 2012;2(4):325-329.]
Жиров Е.Г., Терновская Т.К. Геномная инженерия у пшеницы. Вестник с.-х. науки. 1984;10:58-66.
[Zhirov E.G., Ternovskaya T.K. Genome engineering in wheat. Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki = Herald of Agricultural Science. 1984;10:58-66. (in Russian)]
Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1974;75.
[Pausheva Z.P. Laboratory Manual on Plant Cytology. Moscow: Kolos Publ., 1974;75. (in Russian)]
Пересыпкин В.Ф. Болезни зерновых культур. М.: Колос, 1979; 251-260.
[Peresipkin V.F. Diseases of Grain Cultures. Moscow: Kolos Publ., 1979;251-260. (in Russian)]
Badaeva E.D., Badaev N.S., Gill B.S., Filatenko A.A. Interspecific karyotype divergence in *Triticum araraticum*. Plant Syst. Evol. 1994;192(1):117-145.
Bedbrook J.R., Jones J., O'Dell M., Thompson R.D., Flavell R.B. A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. Cell. 1980;19:545-560. DOI 10.1016/0092-8674(80)90529-2.
Cherukuri D.P., Gupta S.K., Charpe A., Koul S., Prabhu K.V., Singh R.B., Haq Q.M.R. Molecular mapping of *Aegilops speltoides* derived leaf rust resistance gene *Lr28* in wheat. Euphytica. 2005; 143:19-26.
Dubcovsky J., Helguera M., Khan I.A. Development of PCR markers for wheat leaf rust resistance gene *Lr47*. Theor. Appl. Genet. 2000; 101:625-631.
Friebe B., Jiang J., Raupp W.J., McIntosh R.A., Gill B.S. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. Euphytica. 1996;91:59-87.
Gasner G., Straib U.W. Weitere Untersuchungen über die Spezialisierung sverhältnissedes Gelbrostes *Puccinia glumarum* (Schm.) Erikss. u. Henn. Arb. Boil. Reichsanstalt. 1934;21:121-145.
Helguera M., Vanzetti L., Soria M., Khan I.A., Kolmer J., Dubcovsky J. PCR markers for *Triticum speltoides* leaf rust resistance gene *Lr51* and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines. Crop Sci. 2005;45(2):728-734.
Knott D.R. Transferring Alien Genes to Wheat. In: Heyne E.G. (Ed.). Wheat and Wheat Improvement. American Society of Agronomy. Madison, WI, USA, 1987;462-471.
Mains E.B., Jackson H.S. Physiologic specialization in leaf rust of wheat, *Puccinia triticiana* Erikss. Phytopatology. 1926;16:89-120.
Marais G.F., Bekker T.A., Eksteen A., Mccallum B., Fetch T., Marais A.S. Attempts to remove gametocidal genes co-transferred to common wheat with rust resistance from *Aegilops speltoides*. Euphytica. 2010;171(1):71-85.
McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubovsky J., Rogers J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of gene symbols for wheat. 2013. Available at: <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes>.

- Plaschke J., Ganal M.W., Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 1995;91:1001-1007.
- Rayburn A.L., Gill B.S. Isolation of a D-genome specific repeated DNA sequence from *Aegilops squarrosa*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1986;4:102-109. DOI 10.1007/BF02732107.
- Salina E., Adonina I., Vatolina T., Kurata N. A comparative analysis of the composition and organization of two subtelomeric repeat families in *Aegilops speltoides* Tausch. and related species. *Genetics.* 2004;122:227-237.
- Salina E.A., Lim Y.K., Badaeva E.D., Shcherban A.B., Adonina I.G., Amosova A.V., Samatadze T.E., Vatolina T.Yu., Zoshchuk S.A., Leitch A.A. Phylogenetic reconstruction of *Aegilops* section Sitopsis and the evolution of tandem repeats in the diploids and derived wheat polyploids. *Genome.* 2006;49:1023-1035. DOI 10.1139/G06-050.
- Schachermayer G., Siedler H., Gale M.D. Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr9* leaf rust resistance gene of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1994; 88:110-115.
- Schneider A., Linc G., Molnar-Lang M. Fluorescence *in situ* hybridization polymorphism using two repetitive DNA clones in different cultivars of wheat. *Plant Breed.* 2003;122:396-400. DOI 10.1046/j.1439-0523.2003.00891.
- Sears E.R. The transfer of leaf rust resistance from *Aegilops umbellata* to wheat. *Brookhaven Symp. Biol.* 1956;9:1-22.
- Seyfarth R., Feuillet C., Schachermayer G., Winzeler M., Keller B. Development of molecular mapping of the adult-plant leaf rust resistance gene *Lr35* in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1999;99:554-560.
- Tsatsenko L.V., Zhirov E.G., Davoyan R.O. Hybrids between wheat and genome-substituted form Avrodes. *Cytogenetics and agronomy investigations. Cereal Res. Commun.* 1993;21(1):45-50.

ORCID ID

E.A. Salina orcid.org/0000-0001-8590-847X

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.


Поступила в редакцию 31.05.2019. После доработки 11.09.2019. Принята к публикации 12.09.2019.

Пятая международная научная конференция PlantGen2019

Идентификация унивалентных хромосом у моносомных линий хлопчатника *Gossypium hirsutum* L. с помощью цитогенетических маркеров

М.Ф. Санамьян , Ш.У. Бобохужаев

Национальный университет Узбекистана им. М. Улугбека, Ташкент, Узбекистан

 e-mail: sanam_marina@rambler.ru

Отсутствие четких морфологических маркеров хромосом хлопчатника способствовало разработке нетрадиционного метода маркировки хромосом с помощью транслокаций. Тестерные транслокационные линии хлопчатника на сегодняшний день представляют собой наиболее полный набор цитологических маркеров. Приведены результаты цитогенетического анализа гибридов F_1 , полученных от скрещиваний моносомных линий хлопчатника с транслокационными линиями с идентифицированными хромосомами. Цитогенетическая идентификация и нумерация унивалентных хромосом у 25 моносомных линий цитогенетической коллекции Национального университета Узбекистана позволила установить, что четыре моносомные линии имеют унивалентные хромосомы по хромосоме 2, 15 линий – по хромосоме 4, четыре линии – по хромосоме 6, одна линия – по хромосоме 7 субгенома A_t и одна линия – по хромосоме 18 субгенома D_t хлопчатника. Остальная 21 линия была дубликатом трех негомологичных хромосом. Все идентифицированные моносомные линии характеризовались различиями в размерах унивалентов, величине мейотического индекса, числа тетрад с микроядрами, фертильности пыльцы, частоты воспроизводства моносомного состояния в потомстве и комплекса морфологических признаков, ассоциированных с моносомией по идентифицированной хромосоме. Несмотря на различия в генотипической среде и методах получения моносомиков в двух коллекциях хлопчатника, наблюдается удивительное совпадение данных по большей частоте появления моносомиков по хромосомам 2, 4 и 6, тогда как моносомики по другим хромосомам набора появляются с куда меньшей частотой, а по восьми негомологичным хромосомам (5, 8, 13 субгенома A_t и 14, 15, 19, 22 и 24 субгенома D_t) вообще никогда не выявляются.


Ключевые слова: хлопчатник; *Gossypium hirsutum* L.; цитогенетический анализ; транслокационные линии; моносомные линии; идентификация хромосом.

Для цитирования: Санамьян М.Ф., Бобохужаев Ш.У. Идентификация унивалентных хромосом у моносомных линий хлопчатника *Gossypium hirsutum* L. с помощью цитогенетических маркеров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(7):836-845. DOI 10.18699/VJ19.557

Identification of univalent chromosomes in monosomic lines of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by means of cytogenetic markers

M.F. Sanamyan , Sh.U. Bobokhujayev

National University of Uzbekistan named after M. Ulugbek, Tashkent, Uzbekistan

 e-mail: sanam_marina@rambler.ru

The lack of clear morphological markers of cotton chromosomes contributed to the development of an unconventional method for marking chromosomes using translocations. Today, tester translocation cotton lines represent the most complete set of cytological markers. The results of cytogenetic analysis of F_1 hybrids obtained from crosses of monosomic cotton lines with translocation lines with identified chromosomes are presented. Cytogenetic identification and numbering of univalent chromosomes in 25 monosomic lines of the cytogenetic collection of the National University of Uzbekistan allowed us to establish the following univalent occurrences: chromosome 2 in four monosomic lines, chromosome 4 in 15 lines, chromosome 6 in four lines, chromosome 7 of the A_t -subgenome in one line and chromosome 18 of the D_t -subgenome in one line. The remaining 21 lines were duplicates of three non-homologous chromosomes. All monosomic lines identified were characterized by differences in univalent sizes, meiotic index, number of tetrads with micronuclei, pollen fertility, frequency of monosomy in the progeny, and a complex of morphological characters associated with the monosomy of the chromosome identified. Despite differences in the genotypic environment and methods for producing monosomics in the two cotton collections, there is a surprising coincidence of data suggesting a higher frequency of chromosomes 2, 4 and 6 occurring as monosomics, while the other chromosomes of the set occur as monosomics at a much lower frequency, and eight

nonhomologous chromosomes (5, 8, 13 of the A_1 -subgenome and 14, 15, 19, 22 and 24 of the D_1 -subgenome of cotton) never do.

Key words: cotton; *Gossypium hirsutum* L.; cytogenetic analysis; cotton cytogenetics; monosomic lines; chromosome identification.

For citation: Sanamyan M.F., Bobokhujayev Sh.U. Identification of univalent chromosomes in monosomic lines of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by means of cytogenetic markers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(7):836-845. DOI 10.18699/VJ19.557 (in Russian)

Введение

Необходимость кариологического изучения культур, имеющих слабо морфологически дифференцированные хромосомы, способствовала разработке нетрадиционных методов маркировки хромосом с помощью транслокаций. Широкое распространение получили работы по созданию тестерных наборов транслокаций, которые были найдены у пяти видов растений: кукурузы (Burnham, 1954), ячменя (Burnham et al., 1954), гороха (Lamm, Miravalle, 1959), ржи (Sybenga, Wolters, 1972) и томата (Gill et al., 1980). Частично была решена проблема идентификации отдельных хромосом набора у таких видов, как конские бобы, фасоль и соя, благодаря созданию транслокационных линий по некоторым негомологичным хромосомам генома (Sjodin, 1971; Ashraf, Bassett, 1986; Mahama et al., 1999).

Как известно, культивируемый хлопчатник вида *Gossypium hirsutum* L. является аллотетраплоидом ($2n = 52$) и включает два субгенома – A_1 и D_1 . M.S. Brown (1980) получила 62 транслокационные линии хлопчатника *G. hirsutum* с помощью X-, γ -, Бикини радиации и облучения быстрыми нейтронами семян или пыльцы различных сортов, а также нескольких линий. При этом в 58 линий было вовлечено две негомологичные хромосомы, в три линии – три хромосомы и в одну – четыре. Для идентификации и нумерации хромосом были проведены исследования по отнесению транслоцированных хромосом к субгеномам. В результате выяснилось, что хромосома 26 не была вовлечена ни в одну из транслокаций и определялась методом исключения, поскольку за все время исследований не удалось получить транслокацию с участием этой хромосомы (Stelly, 1993). Перечисленные транслокации составляют наиболее полный набор цитологических маркеров для изучения геномов хлопчатника (Menzel, Brown, 1978).

При идентификации мелких хромосом большие надежды были связаны с методом дифференциальной окраски, однако попытки получить дифференциальную исчерченность хромосом, достаточную для идентификации негомологичных хромосом, не привели к желаемому результату (Турков и др., 1980; Escalant, Schwendiman, 1984; Wang, 1985). Окраска прометафазных хромосом хлопчатника с помощью BrdU-Ноеchst-Giemsa и специальная система анализа позволили обнаружить от 2 до 9 главных блоков на хромосоме, которые соответствовали рано реплицирующейся ДНК (Muravenko et al., 1998; Муравенко, Зелен, 2009).

Культивируемый хлопчатник *G. hirsutum* толерантен к потере отдельных хромосом, поскольку является аллотетраплоидом. Однако создание серии моносомных линий в США, характеризующихся потерей отдельных хромосом ($2n = 51$), растянулось на многие годы (Endrizzi, Brown, 1964; Endrizzi et al., 1985). Так, до 1985 г. в США были вы-

делены и идентифицированы моносомики лишь по 15 из 26 негомологичных хромосом *G. hirsutum*. На сегодняшний день в созданной в США цитогенетической коллекции хлопчатника отсутствуют любые виды нехваток по хромосомам 13, 19 и 24, тогда как по пяти негомологичным хромосомам (хромосомы 5, 8 субгенома A_1 и 14, 15, 22 субгенома D_1) имеются нехватки только отдельных плеч хромосом (Saha et al., 2012). Тем не менее это не мешает использовать их для хромосомной локализации маркерных генов и получения серии замещенных линий, которые создаются одновременно при участии трех тетраплоидных видов (Saha et al., 2004, 2006, 2013).

В Национальном университете Узбекистана в течение многих лет проводились исследования по индуцированию растений хлопчатника с хромосомными aberrациями с использованием различных методов индуцированного мутагенеза (Санамьян, 2003; Samanyan, Rakhmatullina, 2003). В результате была создана уникальная цитогенетическая коллекция хлопчатника, включающая моносомные, монотелодисомные и транслокационные линии, которая по числу линий занимает второе место в мире после аналогичной американской коллекции (Sanamyan et al., 2010, 2014).

Целью работы является унифицированная идентификация унивалентных хромосом у ранее полученных моносомных линий хлопчатника с помощью набора тестерных транслокационных линий хлопчатника с идентифицированными хромосомами.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили гибридные моносомные растения хлопчатника, полученные от скрещивания моносомных линий различного происхождения цитогенетической коллекции хлопчатника *G. hirsutum* Национального университета Узбекистана (НУУз) (Sanamyan et al., 2014) с транслокационными линиями с идентифицированными хромосомами американской цитогенетической коллекции (Stelly, 1993). Моносомные линии хлопчатника, за которыми ведутся наблюдения, круглогодично произрастают в пленочной теплице НУУз, где выполняются все агротехнические мероприятия. Цитогенетические маркеры в виде набора линий с идентифицированными транслокациями были любезно предоставлены профессором Техасского университета Дэвидом Стелли через ARS-USDA программу обмена.

В процессе цитологических анализов исследовали мейоз на стадии метафазы I (MI) в материнских клетках пыльцы (МКП). Для этого проводили фиксацию 2–3 мм бутонов в спирт-уксусной смеси (7:3). Затем МКП окрашивали железом-ацетокармином. На временных давленных препаратах под световым микроскопом анализировали

метафазы первого деления мейоза и учитывали характер конъюгации хромосом, число уни-, би-, три- и мультивалентов.

Все цитологические наблюдения проводили с помощью микроскопов Laboval, AxioScope A1 (Carl Zeiss, Германия) и Biomed (Leica, Швейцария) при увеличении объективов 10×, 100×, бинокулярной насадки 1.6× и GF 12.5 ×120 и окуляра 10×. Микрофотографирование выполняли с использованием цифровой фотокамеры Mikroskop-Кamera AxioCam ERc5s. При экспонировании применяли зеленый светофильтр ЗС-11-3. Фотографии растений и их частей сделаны цифровой фотокамерой Canon A-610.

Результаты и обсуждение

Цитогенетический анализ гибридов F₁, полученных от скрещиваний моносомных линий хлопчатника с идентифицированными в соответствии с международной номенклатурой транслокационными линиями, позволил определить унивалентные хромосомы у моносомных линий цитогенетической коллекции хлопчатника НУУз. Известно, что выявление в материнских клетках пыльцы в метафазе I мейоза у гибридных транслокационных моносомиков квадριвалента и унивалента указывает на негомологичность унивалента и хромосом, вовлеченных в транслокацию (Endrizzi, Brown, 1964). Если же в МКП у гибридных транслокационных моносомиков обнаруживаются триваленты, то говорят о гомологичности унивалента и одной из хромосом в транслокации. В этом случае проводят скрещивания моносомика с другими транслокационными линиями, у которых одна из хромосом в транслокациях была такая же, как и у первой линии. Анализ ассоциаций хромосом у моносомных гибридов позволяет идентифицировать унивалентную хромосому как специфическую хромосому набора.

Исследования проведены для всех гибридных потомств, полученных от скрещиваний моносомных и транслокационных линий хлопчатника с идентифицированными хромосомами. В таблицу по конъюгации хромосом мы включили только те варианты, у которых были обнаружены общие хромосомы (табл. 1).

В результате анализа моносомных линий хлопчатника с помощью серии транслокационных линий с идентифицированными хромосомами удалось идентифицировать унивалентные хромосомы у ряда линий. Так, установлена гомологичность унивалентных хромосом у четырех моносомных линий (Mo11, Mo16, Mo19 и Mo93) и одной из транслоцированных хромосом в скрещиваниях с шестью транслокационными линиями – TT2L-6R, TT2L-3Lb, TT2R-3La, TT2R-8Ra, TT2R-8Rb и TT2R-14R, поскольку у моносомных транслокационных гибридов в метафазе I мейоза наблюдалось 24 бивалента плюс один тривалент (рис. 1, см. табл. 1). В шести транслокационных линиях участвует одна общая хромосома 2, поэтому унивалентные хромосомы у моносомных линий Mo11, Mo16, Mo19 и Mo93 являются хромосомой 2 субгенома A_t хлопчатника, а перечисленные четыре моносомные линии – дубликатами. Молекулярно-генетический анализ четырех моносомных межвидовых гибридов F₁ с участием линий Mo11, Mo16, Mo19 и Mo93 подтвердил эти данные (Санамьян и др., 2016).

Таблица 1. Цитогенетический анализ гибридов F₁, полученных от скрещиваний моносомных линий с транслокационными линиями тестерного набора с гомологичными хромосомами

Субгеномная принадлежность	Хромосома	Гибридный вариант		
Субгеном A _t	2	Mo11 × TT 2L-3Lb		
		Mo11 × TT 2R-3La		
		Mo11 × TT 2R-8Ra		
		Mo11 × TT 2R-8Rb		
		Mo11 × TT 2R-14R		
		Mo16 × TT 2L-3Lb		
		Mo16 × TT 2R-8Ra		
		Mo16 × TT 2R-8Rb		
		Mo16 × TT 2R-14R		
		Mo19 × TT 2L-6R		
		Mo19 × TT 2L-3Lb		
		Mo19 × TT 2R-8Ra		
		Mo19 × TT 2R-8Rb		
		Mo19 × TT 2R-14R		
		Mo93 × TT 2R-8Ra		
		Mo93 × TT 2R-8Rb		
		Mo93 × TT 2R-14R		
		4		Mo7 × TT 4L-19R
				Mo31 × TT 4L-19R
				Mo31 × TT 4R-15L
Mo38 × TT 4L-19R				
Mo58 × TT 4L-19R				
Mo59 × TT 4L-19R				
Mo60 × TT 4R-15L				
Mo69 × TT 4L-19R				
Mo70 × TT 4L-19R				
Mo70 × TT 4R-15L				
Mo71 × TT 4R-15L				
Mo72 × TT 4L-19R				
Mo72 × TT 4R-15L				
Mo73 × TT 4L-19R				
Mo73 × TT 4R-15L				
Mo75 × TT 4L-19R				
Mo75 × TT 4R-15L				
Mo76 × TT 4L-19R				
Mo76 × TT 4R-15L				
Mo81 × TT 4L-19R				
Mo89 × TT 4L-19R				
Mo89 × TT 4R-15L				
6		Mo13 × TT 3L-6L		
		Mo13 × TT 6L-7L		
		Mo13 × TT 6L-10R		
		Mo34 × TT 3L-6L		
		Mo34 × TT 6L-14L		
		Mo67 × TT 6L-7L		
		Mo95 × TT 3L-6L		
		Mo95 × TT 6L-10R		
7		Mo27 × TT 1L-7L		
		Mo27 × TT 7L-12R		
		Mo27 × TT 7R-11R		
		Mo27 × TT 7R-21R		
Субгеном D _t	18	Mo48 × TT 7L-18R		

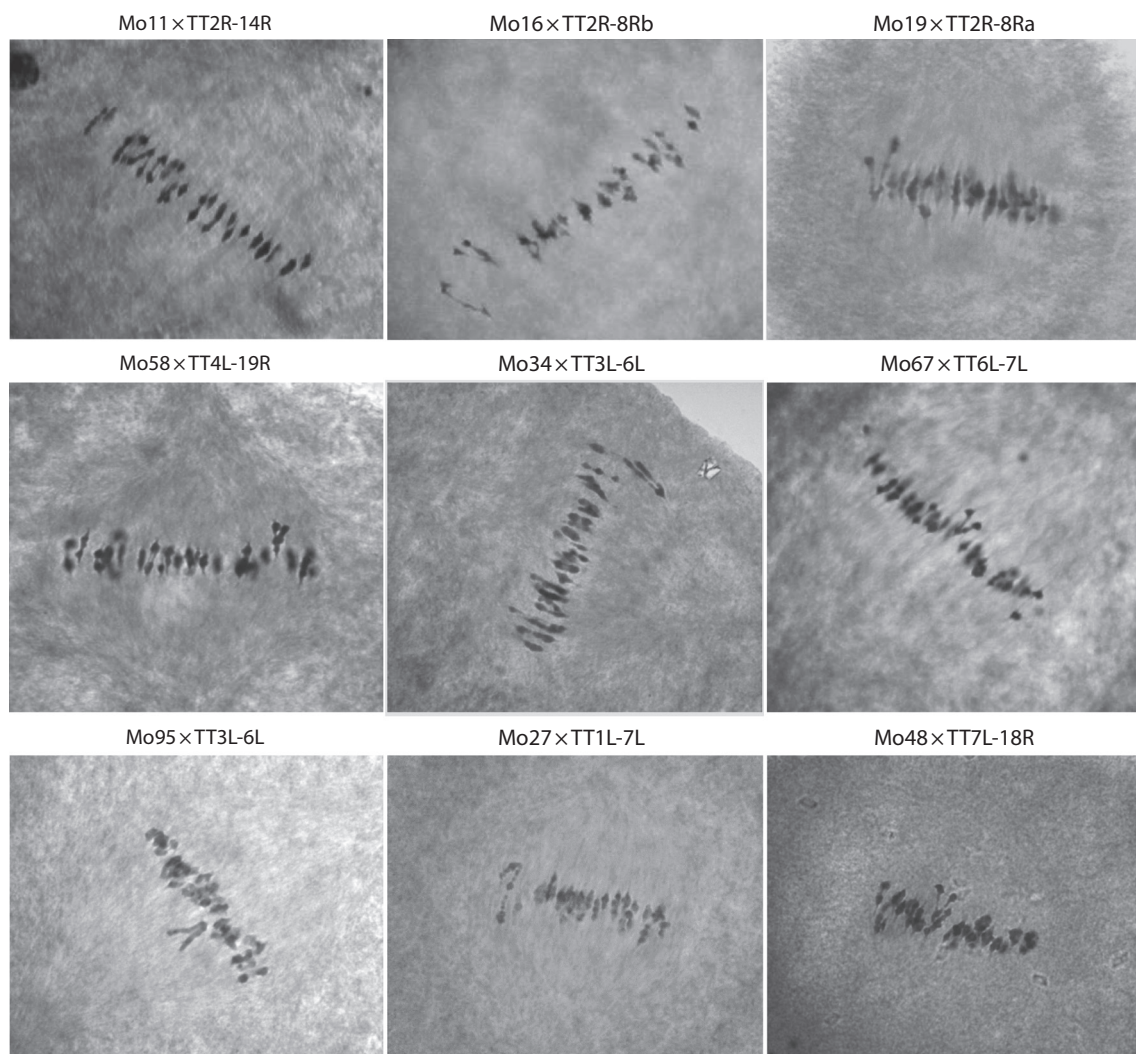


Рис. 1. Критические конфигурации хромосом ($24^{II} + 1^{III}$) в метафазе I мейоза у гибридных моносомных растений, полученных от разных комбинаций скрещивания.

Растения исходных первичных моносомиков четырех линий хлопчатника, моносомных по хромосоме 2, были получены в результате опыления облученной пылью в дозах 10–25 Гр. Все они характеризовались средним размером унивалентов, высоким мейотическим индексом (от 92.50 ± 0.31 до 98.25 ± 0.22), повышенным числом тетрад с микроядрами (до 3.00 ± 0.20 %) и высокой фертильностью пыльцы (от 91.54 ± 0.48 до 96.41 ± 0.42 %), а также сниженной частотой воспроизводства моносомного состояния в потомстве (от 19.35 до 44.44 %) и сниженной частотой передачи $n-1$ гамет. В потомстве моносомной линии Мо19 в одном случае отмечалось появление монотелодисомного растения, что свидетельствовало о неправильном (поперечном) делении центромеры унивалента у этой линии.

Моносомные линии по хромосоме 2 имели схожий набор характерных фенотипических признаков (табл. 2, рис. 2), отличались низкой завязываемостью семян (до 54.84 %) по сравнению с исходной инбредной линией Л-458 (89.81 %). Такое снижение завязываемости происходило за счет присутствия в коробочках моносомиков большого числа неоплодотворенных яйцеклеток в виде

улюков, наличие которых, наряду с уменьшением количества семян, приводило к уменьшению размеров коробочек.

При анализе гибридов F_1 , полученных от скрещивания семи моносомных линий хлопчатника (Мо31, Мо70, Мо72, Мо73, Мо75, Мо76, Мо89) с двумя тестерными транслокационными линиями ТТ4L-19R и ТТ4R-15L, была установлена гомологичность унивалентов этих семи линий с одной из транслоцированных хромосом, поскольку у моносомных транслокационных гибридов в метафазе I мейоза наблюдалось 24 бивалента и один тривалент (см. табл. 1, рис. 1). У тестерной линии ТТ4L-19R в транслокацию вовлечены хромосомы 4 и 19, а у линии ТТ4R-15L – хромосомы 4 и 15, т. е. одна из этих хромосом гомологична унивалентной хромосоме у семи исходных моносомных линий. Поскольку в обе транслокационные линии вовлечена хромосома 4, значит, унивалентные хромосомы у моносомных линий Мо31, Мо70, Мо72, Мо73, Мо75, Мо76, Мо89 представлены хромосомой 4 субгена A_1 хлопчатника, а сами моносомные линии являются дубликатами. Это предположение подтвердилось при молекулярно-генетическом исследовании моносомных межвидовых гибридов F_1 (Санамьян и др., 2016).

Таблица 2. Происхождение и некоторые особенности моносомных линий хлопчатника *G. hirsutum* L.

Моносомная линия	Происхождение	Год получения	Хромосома		Морфологические характеристики
			Размер	Идентичность	
Мо11	Облучение пыльцы	1991	Средний	A 2	Мелкий узкий лист, укороченные симподиальные ветви, маленькие круглые коробочки
Мо16		1991			
Мо19		1991			
Мо93		2007			
Мо7	Облучение пыльцы	1990	Средний	A 4	Густое пышное растение, удлиненные лопасти листа, длинные прицветники и цветоножки, удлиненные ребристые коробочки
Мо31		1993			
Мо38		1993			
Мо58		Десинапсис			
Мо59	1996				
Мо60	1996				
Мо69	1997				
Мо70	1997				
Мо71	1997				
Мо72	1997				
Мо73	1997	Облучение пыльцы	Крупный	A 6	Укороченные симподии, жесткий стебель, маленькие круглые коробочки, позднее цветение
Мо75	1999				
Мо76	2001				
Мо81	2003	Десинапсис	Крупный	A 6	Укороченные симподии, жесткий стебель, маленькие круглые коробочки, позднее цветение
Мо89	2003				
Мо13	Облучение пыльцы	1991	Крупный	A 6	Укороченные симподии, жесткий стебель, маленькие круглые коробочки, позднее цветение
Мо34		1993			
Мо67	Гетерозигота по транслокации	1996	Средний	A 7	Короткие симподии, толстые прицветники и листья, маленькая коробочка
Мо95	Облучение пыльцы	2012			
Мо27	Облучение пыльцы	1993			
Мо48		1994	Мелкий	D 18	Маленькие листья, длинный столбик и рыльце, короткие симподии

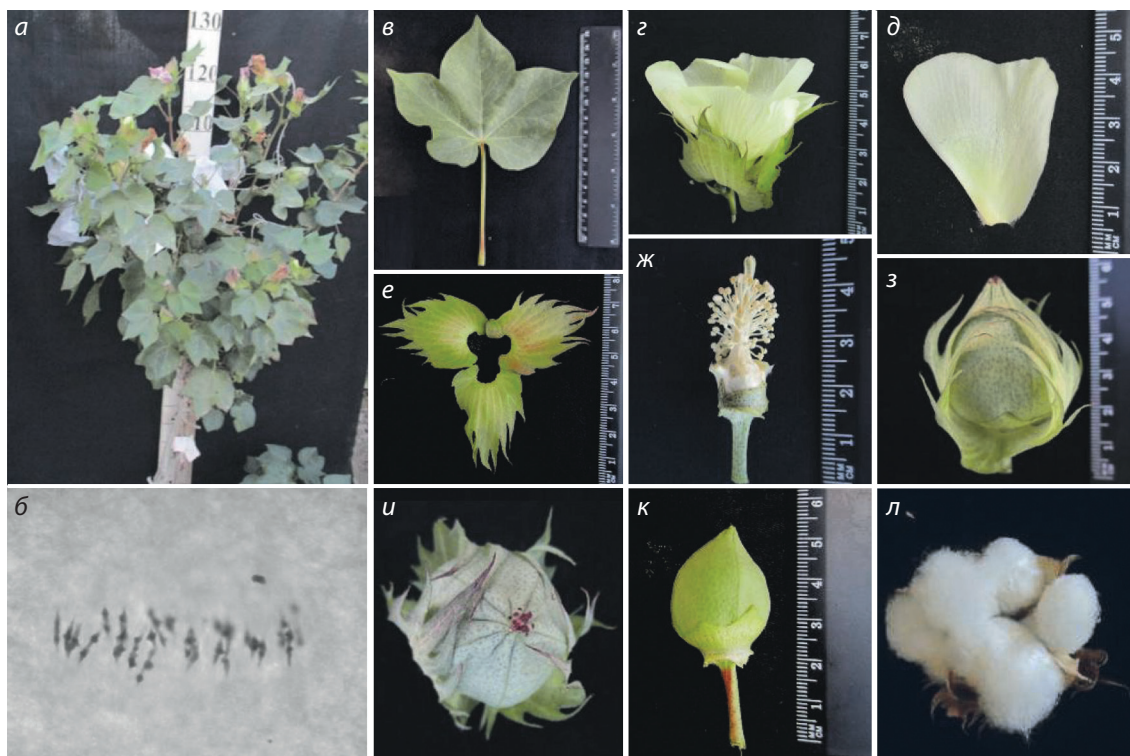


Рис. 2. Особенности моносомных линий хлопчатника по хромосоме 2:

а – куст; б – конфигурации хромосом ($25^{II}+1^I$); в – лист; г – цветок; д – лепесток; е – прицветники; ж – тычиночная колонка; з, и – зеленые коробочки; к – коробочка с плодоножкой; л – раскрывшаяся коробочка.

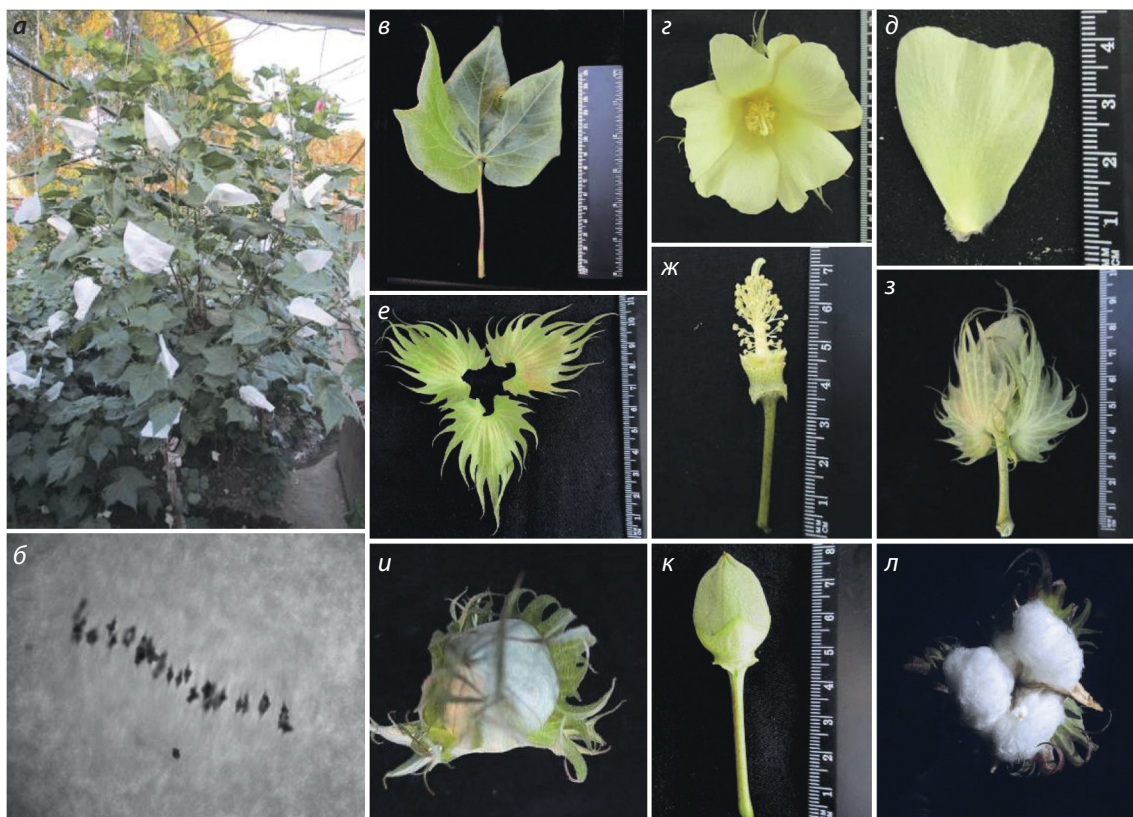


Рис. 3. Особенности моносомных линий хлопчатника по хромосоме 4:

а – куст; б – конфигурации хромосом ($25^{II}+1^I$); в – лист; г – цветок; д – лепесток; е – прицветники; ж – тычиночная колонка; з, и – зеленые коробочки; к – коробочка с плодоножкой; л – раскрывшаяся коробочка.

При изучении гибридов, полученных от скрещиваний восьми моносомных линий хлопчатника (Мо7, Мо38, Мо58, Мо59, Мо60, Мо69, Мо71 и Мо81) с одной из двух транслокационных линий – ТТ4L-19R или ТТ4R-15L, была обнаружена гомологичность унивалентов указанных восьми линий с одной из транслоцированных хромосом, поскольку у моносомных транслокационных гибридов в метафазе I мейоза наблюдалось 24 бивалента плюс один тривалент (см. табл. 1, рис. 1). У тестерной линии ТТ4L-19R в транслокацию вовлечены хромосомы 4 и 19, а у линии ТТ4R-15L – хромосомы 4 и 15. Одна из этих трех хромосом гомологична унивалентной хромосоме у моносомных линий Мо7, Мо38, Мо58, Мо59, Мо60, Мо69, Мо71 и Мо81. Можно предположить, что унивалентные хромосомы у линий Мо7, Мо38, Мо58, Мо59, Мо60, Мо69, Мо71 и Мо81 представлены общей для них хромосомой 4 субгена A_1 хлопчатника, а моносомные линии являются дубликатами. Окончательное цитологическое подтверждение будет получено после изучения гибридов от скрещиваний перечисленных восьми моносомных линий уже с другой (не рассмотренной здесь) транслокационной линией, вовлекшей хромосому 4. Однако локализация хромосом-специфичных SSR-маркеров на гибридах F_1 с участием линий Мо7, Мо38, Мо58, Мо59, Мо60, Мо69, Мо71 и Мо81 подтвердила эти данные (Санамьян и др., 2016).

К сожалению, третья транслокационная линия тестерного набора – ТТ4L-5 – не могла быть использована в

исследовании по идентификации унивалентных хромосом вследствие обнаруженных нами сразу двух квадривалентов в «критических клетках», по-видимому из-за гомозиготности одновременно по двум транслокациям. Ранее M. Brown (1980) сообщала, что две или более цитологические aberrации присутствовали у исходных растений десяти из 62 транслокационных линий хлопчатника *G. hirsutum*, однако в дальнейшем у этих линий была получена только одна транслокация в гомозиготном состоянии.

Исходные растения шести моносомных линий хлопчатника (Мо7, Мо31, Мо38, Мо75, Мо76, Мо81) с нехваткой по хромосоме 4 были получены в результате опыления облученной пылью в дозе 10–25 Гр, тогда как исходные растения девяти моносомных линий (Мо58, Мо59, Мо60, Мо69, Мо70, Мо71, Мо72, Мо73, Мо89) обнаружены в потомствах десинаптических растений. Все вышеперечисленные линии характеризовались средним размером унивалентов, высоким мейотическим индексом (от 90.50 ± 0.72 до 98.46 ± 0.20), небольшим числом тетрад с микроядрами (до 2.07 ± 0.14 %) и высокой фертильностью пыльцы (от 90.67 ± 0.88 до 97.53 ± 0.35 %), а также сниженной частотой воспроизводства моносомного состояния в потомстве (от 16.67 до 42.86 %), что приводило к снижению частоты передачи гапло-дефицитных гамет.

Моносомные линии по хромосоме 4 имели схожие фенотипические отличия, резко выделяющие их среди других моносомных линий (рис. 3, см. табл. 2). Также они отличались более высокой завязываемостью семян

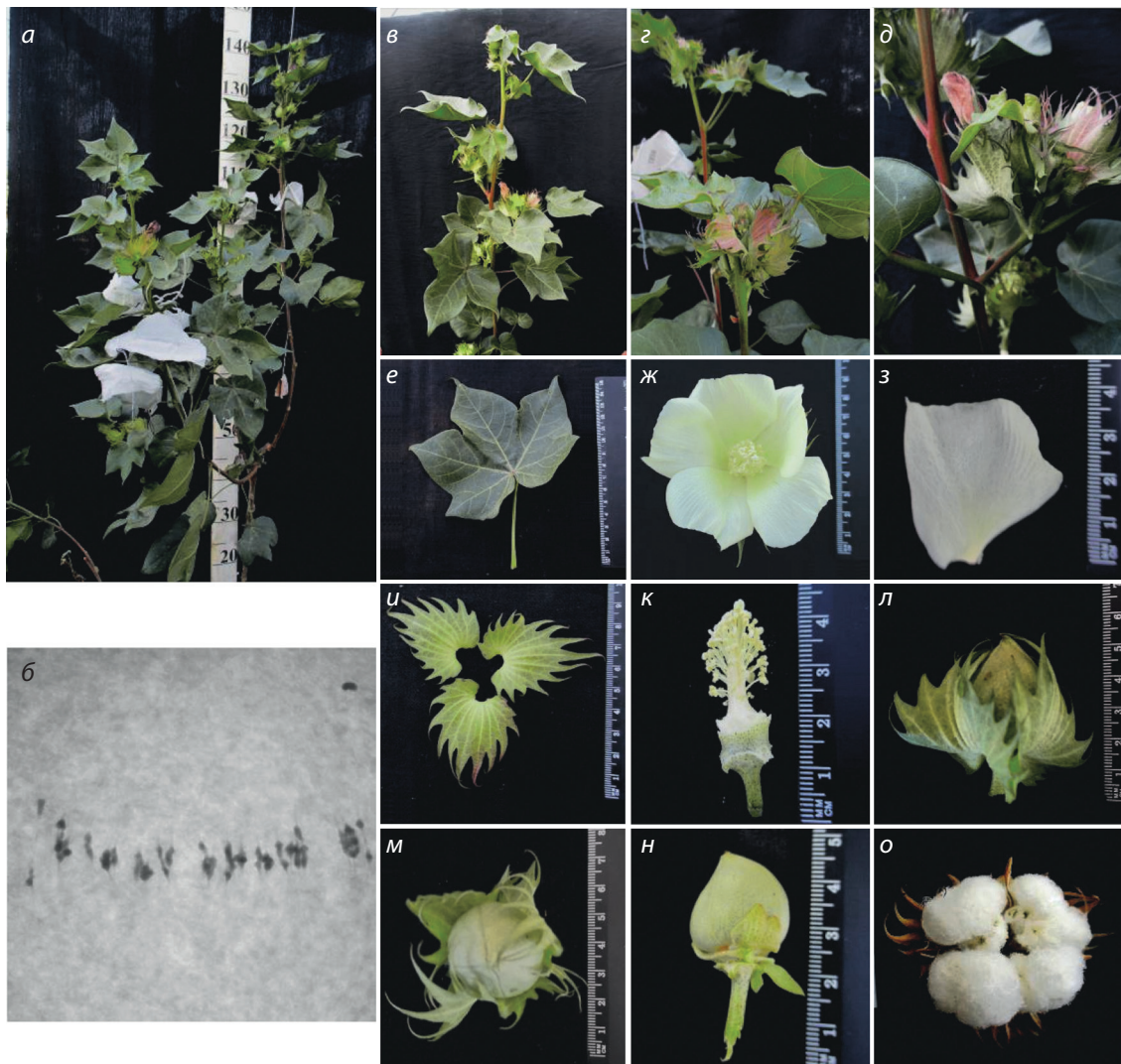


Рис. 4. Особенности моносомных линий хлопчатника по chromosome 6:

а – куст; б – конфигурации хромосом ($25^{II} + 1^I$); в–д – части стебля; е – лист; ж – цветок; з – лепесток; и – прицветники; к – тычиночная колонка; л, м – зеленые коробочки; н – коробочка с плодоножкой; о – раскрывшаяся коробочка.

(до 72.22 %), за исключением моносомной линии Мо76 (32.61 %).

При исследовании четырех моносомных линий хлопчатника (Мо13, Мо34, Мо67, Мо95) с помощью транслокационных линий ТТ3L-6L, ТТ6L-7L, ТТ6L-10R, ТТ6L-14L была установлена гомологичность унивалентных хромосом у моносомных линий и одной из транслоцированных хромосом в вышеперечисленных транслокациях, поскольку у моносомных транслокационных гибридов в метафазе I мейоза наблюдалось 24 бивалента и один тривалент (см. табл. 1, рис. 1). В четырех транслокационных линиях участвует одна общая хромосома 6, поэтому унивалентные хромосомы у моносомных линий Мо13, Мо34, Мо67, Мо95 являются хромосомой 6 субгенома A_1 хлопчатника, а сами моносомные линии – дубликатами. Молекулярно-генетический анализ межвидовых гибридов F_1 с участием моносомных линий Мо13, Мо34, Мо67, Мо95 подтвердил эти данные (Санамьян и др., 2016).

Исходные растения трех моносомных линий хлопчатника (Мо13, Мо34, Мо95) с нехваткой по chromosome 6 были

получены в результате опыления облученной пылью в дозе 20–25 Гр, тогда как исходное растение моносомной линии Мо67 обнаружено в потомстве растения, гетерозиготного по транслокации с десинаптическим эффектом. Все эти линии отличались крупным размером унивалента, высоким мейотическим индексом (от 94.13 ± 0.38 до 96.82 ± 0.49), небольшим числом тетрад с микроядрами (до 2.07 ± 0.23 %), сниженной фертильностью пыльцы (от 88.46 ± 1.28 до 94.34 ± 0.51 %) и низкой частотой воспроизводства моносомного состояния в потомстве (от 9.38 до 14.29 %), что значительно снижало частоту передачи гапло-дефицитных гамет.

Моносомные линии с нехваткой хромосомы 6 характеризовались целым комплексом морфологических признаков, ассоциированных с моносомией по этой хромосоме (рис. 4, см. табл. 2), а также более низкой завязываемостью семян (от 38.78 до 57.45 %) по сравнению с линией Л-458.

При исследовании моносомной линии Мо27 в четырех вариантах скрещиваний – Мо27 × ТТ1L-7L, Мо27 × ТТ7L-12R, Мо27 × ТТ7R-11R и Мо27 × ТТ7R-21R – была

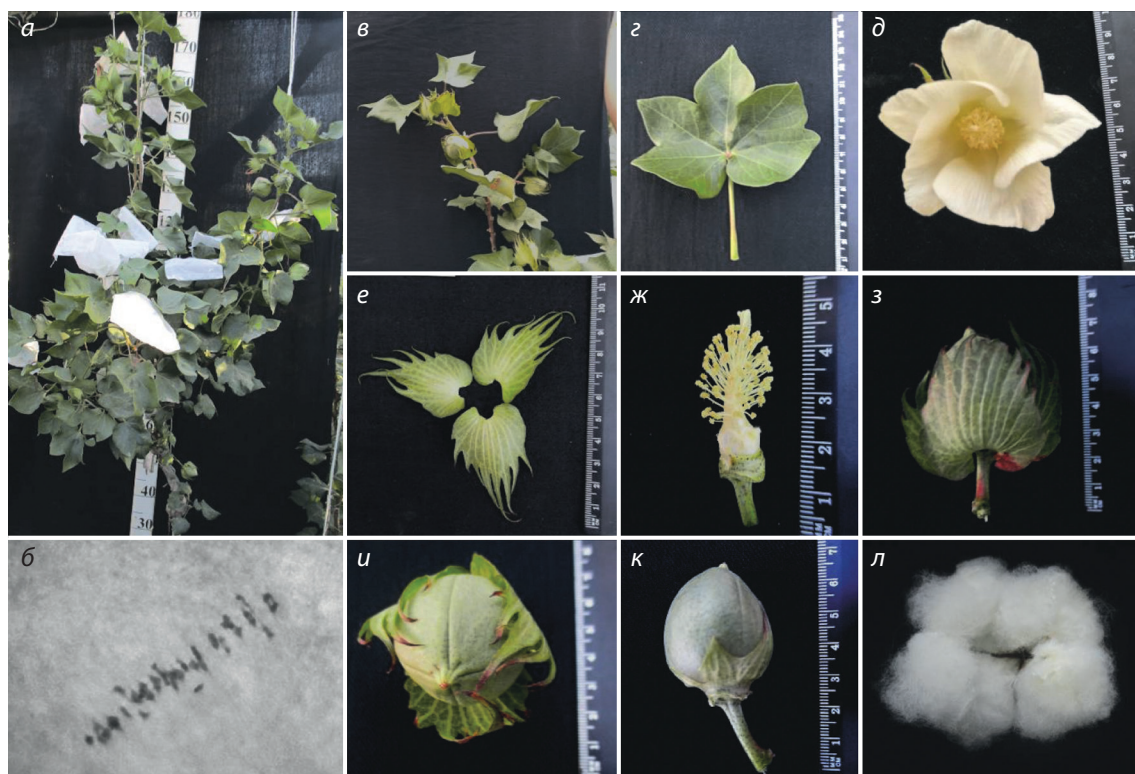


Рис. 5. Особенности моносомной линии хлопчатника по хромосоме 7:

а – куст; б – конфигурация хромосом ($25n + 1$); в – часть стебля; г – лист; д – цветок; е – прицветники; ж – тычиночная колонка; з, и – зеленые коробочки; к – коробочка с плодоножкой; л – раскрывшаяся коробочка.

обнаружена гомологичность унивалентной хромосомы Мо27 и одной из транслоцированных хромосом, поскольку у моносомных гибридов в метафазе I мейоза наблюдалась конъюгация хромосом в виде 24 бивалентов и одного тривалента (см. рис. 1). У тестерной линии ТТ1L-7L в транслокацию вовлечены хромосомы 1 и 7, у ТТ7L-12R – хромосомы 7 и 12, у ТТ7R-11R – хромосомы 7 и 11, а у линии ТТ7R-21R – хромосомы 7 и 21. Одна из этих хромосом гомологична унивалентной хромосоме у моносомной линии Мо27. Поскольку общая для четырех транслокационных линий – это хромосома 7, то унивалентная хромосома у моносомной линии Мо27 является хромосомой 7 субгенома A_1 хлопчатника.

Исходное растение моносомной линии хлопчатника Мо27 с нехваткой по хромосоме 7 было получено в результате опыления облученной пылью в дозе 20 Гр. Эта линия характеризовалась средним размером унивалента, высоким мейотическим индексом (95.81 ± 0.38), небольшим числом тетрад с микроядрами ($1.77 \pm 0.25\%$), сниженной фертильностью пыльцы ($89.88 \pm 0.83\%$) и низкой частотой воспроизводства моносомного состояния в потомстве (22.23%), что значительно снижало частоту передачи гапло-дефицитных гамет. Моносомная линия с нехваткой хромосомы 7 тоже отличалась комплексом морфологических признаков, ассоциированных с моносомией (рис. 5, см. табл. 2), и более низкой по сравнению с линией Л-458 завязываемостью семян (65.10%).

При исследовании моносомной линии Мо48 в варианте скрещивания с транслокационной линией ТТ7L-18R в

метафазе I мейоза были обнаружены 24 бивалента плюс один тривалент (см. рис. 1), который свидетельствовал о гомологичности унивалентной хромосомы у Мо48 и одной из транслоцированных хромосом у транслокационной линии Мо48. Поскольку в транслокацию тестерной линии ТТ7L-18R вовлечены хромосомы 7 и 18, можно предположить, что унивалентная хромосома моносомной линии Мо48 гомологична одной из двух хромосом. К сожалению, в тестерном наборе линий с идентифицированными хромосомами отсутствует вторая транслокационная линия, вовлекающая хромосому 18. Чтобы определить, какой из двух хромосом этой транслокации гомологична унивалентная хромосома моносомной линии Мо48, ранее мы использовали хромосом-специфичные микросателлитные SSR-маркеры, которые амплифицировали стандартным ПЦР-анализом. Молекулярно-генетический анализ моносомного межвидового гибрида F_1 (Мо48 \times Pima 3-79) выявил присутствие полиморфных аллелей только от вида *G. barbadense* L., что указало на локализацию хромосом-специфичного SSR-маркера – BNL3280 – у вышеназванного гибрида (Санамьян и др., 2016). Ранее этот маркер был локализован на хромосоме 18 субгенома D_1 хлопчатника, поэтому можно считать, что линия Мо48 коллекции НУУЗ имеет моносомию по хромосоме 18 субгенома D_1 .

Исходное растение моносомной линии хлопчатника Мо48 с нехваткой по хромосоме 18 было получено в результате опыления облученной пылью в дозе 25 Гр. Линия характеризовалась мелким размером унивалента, высоким мейотическим индексом (95.68 ± 0.50), неболь-

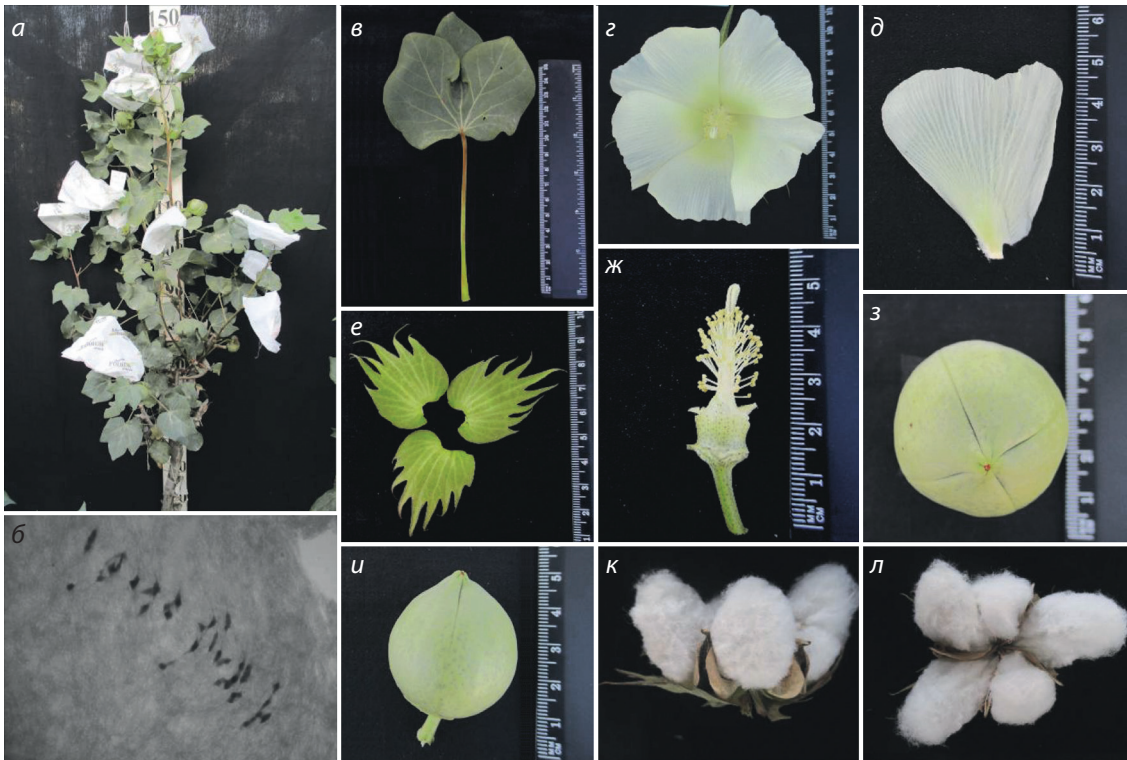


Рис. 6. Особенности моносомной линии хлопчатника по хромосоме 18:

а – куст; б – конфигурации хромосом ($25n+1$); в – лист; з – цветок; д – лепесток; е – прицветники; ж – тычиночная колонка; з – зеленая коробочка; и – коробочка с плодоножкой; к, л – раскрывшаяся коробочка.

шим числом тетрад с микроядрами (0.86 ± 0.26 %), высокой фертильностью пыльцы (95.23 ± 0.74 %) и низкой частотой воспроизводства моносомного состояния в потомстве (18.19 %), что значительно снижало частоту передачи гапло-дефицитных гамет. Моносомная линия с нехваткой хромосомы 18 имела набор морфологических признаков, ассоциированных с моносомией (рис. 6, см. табл. 2), а также отличалась высокой завязываемостью семян (85.64 %).

Заключение

Благодаря использованию транслокационных линий с идентифицированными хромосомами стало возможным привести нумерацию унивалентных хромосом у моносомных линий нашей коллекции в соответствие с общепризнанной номенклатурой. Цитогенетическая идентификация и нумерация унивалентных хромосом у 25 моносомных линий цитогенетической коллекции НУУЗ позволила установить, что четыре моносомные линии имеют унивалентные хромосомы по хромосоме 2, 15 линий – по хромосоме 4, четыре линии – по хромосоме 6, одна линия – по хромосоме 7 субгена A_1 и одна линия – по хромосоме 18 субгена D_1 хлопчатника. Большинство моносомных линий выявлено по наиболее часто регистрируемым моносомикам хлопчатника – хромосомам 2, 4 и 6.

При сравнительном анализе первых 20 идентифицированных моносомиков хлопчатника, полученных в США, обнаружены сходные тенденции, поскольку в результате исследования было выявлено семь моносомиков по хро-

мосоме 2, семь – по хромосоме 4, три – по хромосоме 6 и по одному – по хромосомам 1, 17 и 18 (Brown, Endrizzi, 1964). Сходство данных, полученных при исследовании разных коллекций, указывает, несмотря на различия в генотипической среде и методах получения моносомиков, на удивительное совпадение данных у хлопчатника по большей частоте появления моносомиков именно по хромосомам 2, 4 и 6, тогда как моносомики по другим хромосомам набора появляются с куда меньшей частотой, а по восьми негомологичным хромосомам (5, 8, 13 субгена A_1 и 14, 15, 19, 22 и 24 субгена D_1) вообще никогда не выявлялись (Saha et al., 2012). По-видимому, центромерные районы определенных хромосом подвержены более частой поломке и геном в целом остается толерантен к потере больших A_1 -субгеномных хромосом без явного эффекта на жизнеспособность и фертильность, тогда как хромосомы некоторых мелких D_1 -субгеномных хромосом вообще не подлежат каким-либо изменениям вследствие несовместимости с жизнеспособностью.

Сравнительный анализ цитогенетических особенностей моносомиков хлопчатника из двух коллекций не представляется возможным, поскольку в литературных источниках присутствуют лишь отрывочные сведения, касающиеся неправильного поперечного деления (misdivision) унивалентов и частоты воспроизводства моносомного состояния у некоторых моносомиков американской коллекции. Однако сложность создания серии моносомных линий у тетраплоидного хлопчатника и очевидность того, что определенные хромосомы субгена А чаще встречаются в моносомном состоянии, чем хромосомы субгена D,

не умаляют ценности проводимых работ ввиду необходимости дальнейшего развития молекулярно-генетических исследований и создания замещенных линий хлопчатника.

Список литературы / References

- Муравенко О.В., Зеленин А.В. Исследование хромосомной организации геномов мелкохромосомных растений. Генетика. 2009; 45(11):1516-1529.
[Muravenko O.V., Zelenin A.V. The study of the chromosome organization of the genomes of small chromosome plants. Russ. J. Genet. 2009;45(11):1516-1529. DOI 10.1134/S1022795409110088.]
- Санамьян М.Ф. Оценка влияния облученной пыльцы на изменчивость кариотипа растений *M₂* хлопчатника. Генетика. 2003; 39(8):1081-1090.
[Sanamyan M.F. Evaluation of the effect of pollen irradiation on karyotype variability in *M₂* cotton plants. Russ. J. Genet. 2003; 39(8):909-916. DOI 10.1023/A:1025330823281.]
- Санамьян М.Ф., Бобохужаев Ш.У., Макамов А.Х., Ачилов С.Г., Абдурахманов И.Ю. Создание новой серии анеуплоидных линий у хлопчатника (*Gossypium hirsutum*) с идентификацией отдельных хромосом с помощью транслокационных и SSR-маркеров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):545-554. DOI 10.18699/VJ16.186.
[Sanamyan M.F., Bobokhujayev Sh.U., Makamov A.X., Achilov S.G., Abdurakhmonov I.Y. The creation of new aneuploid lines of the cotton (*Gossypium hirsutum* L.) with identification of chromosomes by translocation and SSR-markers. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5): 643-652. DOI 10.18699/VJ16.186. (in Russian)]
- Турков В.Д., Шелепина Г.А., Шевчук Л.П., Кайседо П.Л. Кариологическое изучение хлопчатника *Gossypium herbaceum* L. методом монохромного и дифференциального окрашивания хромосом. Докл. АН СССР. 1980;4(255):992-995.
[Turkov V.D., Shelepina G.A., Shevchuk L.P., Kaysedo P.L. Karyological study of cotton *Gossypium herbaceum* L. by monochrome and differential staining of chromosomes. Doklady AN SSSR = Reports of the USSR Academy of Sciences. 1980;4(255):992-995. (in Russian)]
- Ashraf M., Bassett M.J. Cytogenetic analysis of translocation heterozygosity in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Can. J. Genet. Cytol. 1986;28(4):574-580.
- Brown M.S. Identification of the chromosomes of *Gossypium hirsutum* L. by means of translocations. J. Hered. 1980;71(4):266-274.
- Brown M.S., Endrizzi J.E. The origin, fertility and transmission of monosomic in *Gossypium*. Am. J. Bot. 1964;51(1):108-115.
- Burnham C.R. Tester set of translocations. Maise Genet. Coop. Newsl. 1954;28:59-60.
- Burnham C.R., White F.H., Livers R. Chromosomal interchanges in barley. Cytologia. 1954;19:191-202.
- Endrizzi J.E., Brown M.S. Identification of monosomes for six chromosomes in *Gossypium hirsutum*. Am. J. Bot. 1964;51(2):117-120.
- Endrizzi J.E., Turcotte E.L., Kohel R.J. Genetics, cytology and evolution of *Gossypium*. Adv. Genet. 1985;23:271-375.
- Escalant J.V., Schwendiman J. Tentative de "banding" des chromosomes du cotonnier. Cot. Fib. Trop. 1984;39(2):9-14.
- Gill B.S., Burnham C.R., Stringam G.R., Stout J.T., Weinheimer W.H. Cytogenetic analysis of chromosomal translocations in the tomato: preferential breakage in heterochromatin. Can. J. Genet. Cytol. 1980;22(3):333-341.
- Lamm R., Miravalle R.J. A translocation tester set in *Pisum*. Hereditas. 1959;45:417-440.
- Mahama A.A., Deaderick L.M., Sadanaga K., Newhouse K.E., Palmer R.G. Cytogenetic analysis of translocations in *Soybean*. J. Hered. 1999;90(6):648-653.
- Menzel M.Y., Brown M.S. Genetic lengths and break points in twelve chromosomes of *Gossypium hirsutum* involved in ten reciprocal translocations. Genetics. 1978;88(3):541-558.
- Muravenko O.V., Fedotov A.R., Punina E.O., Fedotova L.I., Grif V.G., Zelenin A.V. Comparison of chromosome BrdU-Hoechst-Giemsa banding patterns of the *A₁* and (*AD*)₂ genomes of cotton. Genome. 1998;41:616-625.
- Saha S., Raska D.A., Stelly D.M. Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) × Hawaiian cotton (*G. tomentosum* Nutt. ex Seem.) *F₁* hybrid hypoaneuploid chromosome substitution series. J. Cotton Sci. 2006;1:263-272.
- Saha S., Raska D.A., Stelly D.M., Manchali S., Gutierrez O.A. Hypoaneuploid chromosome substitution *F₁* hybrids of *Gossypium hirsutum* L. × *G. mustelinum* Miers ex Watt. J. Cotton Sci. 2013;17: 102-114.
- Saha S., Stelly D.M., Raska D.A., Wu J., Jenkins J.N., McCarty J.C., Makamov A., Gotmare V., Abdurakhmonov I.Y., Campbell B.T. Ch. 6. Chromosome substitutions lines: concept, development and utilization in the genetic improvement of Upland cotton. In: Abdurakhmonov I.Y. (Ed.) Plant Breeding. Croatia: In Tech, 2012:107-128.
- Saha S., Wu J., Jenkins J.N., McCarty J.C., Jr., Gutierrez O.A., Stelly D.M., Percy R.G., Raska D.A. Effect of chromosome substitutions from *Gossypium barbadense* L. 3-79 into *G. hirsutum* L. TM-1 on agronomic and fiber traits. J. Cotton Sci. 2004;8:162-169.
- Sanamyan M.F., Petlyakova J., Rakhmatullina E.M., Sharipova E. Ch. 10. Cytogenetic Collection of Uzbekistan. In: Abdurakhmonov I.Y. (Ed.) World Cotton Germplasm Resources. Croatia: In Tech, 2014:247-287. DOI 10.5772/58589.
- Sanamyan M.F., Petlyakova J.E., Sharipova E.A., Abdurakhmonov I.Y. Morphological characteristics and identification of new monosomic stocks for cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Adv. Biosci. Biotechnol. 2010;1:372-383.
- Sanamyan M.F., Rakhmatullina E.M. Cytogenetic analysis of translocations in cotton. Plant Breed. 2003;122:511-516.
- Sjödin J. Induced translocations in *Vicia faba* L. Hereditas. 1971;67: 155-180.
- Stelly D.M. Interfacing cytogenetics with the cotton genome mapping effort. In: Proc. of the Beltwide Cotton Conf. New Orleans, Louisiana, 10-14 January. 1993;1545-1550.
- Sybunga J., Wolters A.H.G. The classification of the chromosomes of rye (*Secale cereale* L.): a translocation tester set. Genetica. 1972; 43:453-464.
- Wang Y. A study on the Giemsa C-bands in the chromosomes of *Gossypium arboreum* L. Acta Genetica Sinica. 1985;12(4):285-288.

ORCID ID

M.F. Sanamyan orcid.org/0000-0003-1840-0240

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Комитета по науке и технологиям и Министерства инноваций Республики Узбекистан, гранты Ф-5-31 и ОТ-А-КХ-2018-379.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 31.05.2019. После доработки 21.08.2019. Принята к публикации 22.08.2019.

Пятая международная научная конференция PlantGen2019

Создание и характеристика линии мягкой пшеницы с центрической транслокацией T2DL.2RL

Ю.Н. Иванова¹✉, Л.А. Соловей², Д.Б. Логинова¹, Е.Е. Мирошникова³, Н.И. Дубовец², О.Г. Силкова^{1, 3}

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

³ Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: kabanenko@bionet.nsc.ru

Создание интрогрессивных форм мягкой пшеницы с чужеродным генетическим материалом от культурных и диких видов трибы *Triticeae* является эффективным методом для расширения генофонда пшеницы, необходимого для селекционных работ. К настоящему времени получены многочисленные коллекции линий с интрогрессиями в виде замещений и модификаций хромосом, однако создание и изучение форм пшеницы с новыми ценными признаками остаются актуальным направлением современных научных разработок. Рожь *Secale cereale* L., чьи хромосомы несут гены, контролируемые ценные экономические и биологические характеристики и свойства, широко используется для получения новых форм. В данной работе охарактеризована линия пшеницы с транслоцированной хромосомой, которая была получена при беккроссировании дисомно-замещенной пшенично-ржаной линии 2R(2D)₁ сортом Новосибирская 67. С использованием флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) и метода С-окрашивания изучен хромосомный состав кариотипов линий. Идентифицированы две центрические пшенично-ржаные транслоцированные хромосомы, образованные из двух длинных плеч хромосом 2D и 2R, T2DL.2RL. Остальные 40 хромосом пшеницы не подверглись структурным изменениям. Мейоз линий характеризовался стабильностью. Хромосомы T2DL.2RL формировали биваленты во всех мейоцитах, что подтверждает их гомологичность. По морфологическим признакам колоса линия T2DL.2RL не отличалась от сорта Новосибирская 67. Проведен сравнительный анализ показателей элементов продуктивности у линии с транслокацией T2DL.2RL и родительских форм, сорта Новосибирская 67 и дисомно-замещенной пшенично-ржаной линии 2R(2D)₁. По результатам сравнения, линия T2DL.2RL достоверно уступает сорту Новосибирская 67 по всем показателям с различной степенью достоверности. Показатели продуктивности линии 2R(2D)₁ превосходили либо не отличались от показателей линии с транслокацией T2DL.2RL, однако масса 1000 зерен была достоверно меньше. Обнаружено также влияние транслокации T2DL.2RL на признак «высота растения». Этот показатель был достоверно ниже, чем у Новосибирской 67, в условиях двух вегетаций. Следовательно, транслокация T2DL.2RL влияет на уменьшение высоты растений, а также вызывает отрицательный эффект на элементы продуктивности.

Ключевые слова: чужеродная интрогрессия; FISH; С-окрашивание; центрические транслокации; высота растений; продуктивность; рожь *Secale cereale* L.; мягкая пшеница *Triticum aestivum* L.

Для цитирования: Иванова Ю.Н., Соловей Л.А., Логинова Д.Б., Мирошникова Е.Е., Дубовец Н.И., Силкова О.Г. Создание и характеристика линии мягкой пшеницы с центрической транслокацией T2DL.2RL. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(7):846-855. DOI 10.18699/VJ19.558

The creation and characterization of the bread wheat line with a centric translocation T2DL.2RL

Yu.N. Ivanova¹✉, L.A. Solovey², D.B. Loginova¹, E.E. Miroshnikova³, N.I. Dubovets², O.G. Silkova^{1, 3}

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus, Minsk, Belarus

³ Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: kabanenko@bionet.nsc.ru

The development of bread wheat introgressions with alien genetic material from cultural and wild *Triticeae* species is an effective method for expanding the wheat gene pool necessary for breeding. To date, numerous collections of introgressions as substitutions and chromosome modifications have been obtained; however, the creation and study of wheat with new valuable traits still remain an important line of research. Rye *Secale cereale* L., whose chromosomes carry genes that control valuable economic and biological characteristics and properties, is widely used to produce new wheat forms. In this study, a wheat-rye translocation obtained by backcrossing the wheat-rye disomic-substitution line 2R(2D)₁ with the variety Novosibirskaya 67 was characterized. The chromosomal composition of karyotypes was studied using fluorescent *in situ* hybridization and C-banding. Two centric translocations,

derived from two long arms of chromosomes 2D and 2R, T2DL.2RL, were identified, the remaining 40 wheat chromosomes did not undergo modifications. Meiosis in the lines was stable. Chromosomes T2DL.2RL formed bivalents in all meiocytes, which confirmed their homology. The morphological characteristics of the spike in the T2DL.2RL line and Novosibirskaya 67 did not differ. A comparative analysis of productivity between the T2DL.2RL translocation line and the parental forms, Novosibirskaya 67 and the 2R(2D)₁ line, was carried out. The T2DL.2RL line is inferior to Novosibirskaya 67 in all characters with different confidence levels. The productivity characters of the 2R(2D)₁ line exceeded or did not differ from those of T2DL.2RL, however, the mass of 1000 grains was significantly lower. The results showed the effect of the T2DL.2RL translocation on the trait "plant height". This character was significantly lower than that of Novosibirskaya 67 in two vegetation periods. Consequently, the T2DL.2RL translocation reduces plant height and productivity.

Key words: alien introgression; FISH; C-banding; centric translocations; plant height; productivity; rye *Secale cereale* L.; bread wheat *Triticum aestivum* L.

For citation: Ivanova Yu.N., Solovey L.A., Loginova D.B., Miroshnikova E.E., Dubovets N.I., Silkova O.G. The creation and characterization of the bread wheat line with a centric translocation T2DL.2RL. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(7):846-855. DOI 10.18699/VJ19.558 (in Russian)

Введение

Мягкая пшеница *Triticum aestivum* L. – это стратегическая продовольственная культура мирового значения, возделываемая более чем на 200 млн га и обеспечивающая питанием треть населения земного шара (Rasheed et al., 2018). Значимым периодом в селекции пшеницы была «зеленая революция» (1967–1970 гг.), во время которой удалось достигнуть значительного прогресса в увеличении урожайности этой культуры в развивающихся странах. Успех «зеленой революции» стал возможен благодаря использованию генов карликовости, нечувствительности к фотопериоду и устойчивости к стеблевой ржавчине. Ее последствием было значительное сокращение генетического разнообразия в сортах мягкой пшеницы. Отсутствие аллельного разнообразия ограничивало улучшение таких признаков, как урожайность, качество зерна, а также сделало пшеницу более уязвимой к биологическим и экологическим стрессам. В связи с этим возникла необходимость в более эффективном использовании в селекционных программах уникального генетического разнообразия, собранного в коллекциях пшениц и ее родственных видов (Rasheed et al., 2018).

Дикие и культурные виды, а также местные сорта по-прежнему остаются неисчерпаемыми хранилищами генетического разнообразия, а отдаленная гибридизация является лучшим способом для передачи этого разнообразия (Jiang et al., 1994; Friebe et al., 1996; Feuillet et al., 2008; Mujeeb-Kazi et al., 2013). В качестве источника новых признаков широко применяют виды-доноры субгеномов мягкой пшеницы *Triticum monococcum*, *Aegilops tauschii* и *T. dicoccoides*, а также более отдаленные дикие виды родов *Triticum*, *Aegilops*, *Haynaldia*, *Thinopyrum* и вид культивируемой ржи *Secale cereale* L.

Использование форм пшеницы с интрогрессией чужеродного хроматина (амфидиплоиды, дополненные, замещенные и транслоцированные линии) для создания пребридингового материала имеет свои преимущества в сравнении с межвидовой и межродовой гибридизацией. Одно из них – это возможность объективно оценить эффект чужеродной интрогрессии в различных вариантах генотипической среды пшеницы (Jiang et al., 1994; Friebe et al., 1996; Rasheed et al., 2018). Известно, что негативные эффекты, наблюдаемые при интрогрессии генов, могут возникать не только в связи с присутствием фрагментов

чужеродного генома, но и в результате влияния генотипической среды сорта-реципиента (Леонова, 2018).

Линии пшеницы с интрогрессией чужеродного материала в виде фрагментов хромосом различной величины, включенных в хромосомы пшеницы (транслокации), были получены разными способами: путем воздействия радиоактивного излучения, индукцией гомеологичного спаривания с использованием системы *Ph* локуса, разделением унивалентов по центромере, а также спонтанно (Zhang et al., 2007). Таким образом в геном мягкой пшеницы был передан генетический материал видов *Aegilops*, *T. timopheevii*, *Thinopyrum*, *S. cereale* (Friebe et al., 1996; Fu et al., 2012; Liu et al., 2013; Timonova et al., 2013; Leonova, Budashkina, 2017). В обзоре (Friebe et al., 1996) описаны 57 транслокаций. Десять из них являются Робертсоновскими, у 45 транслокаций чужеродные сегменты хромосом расположены дистально на хромосомах пшеницы, и 2 транслокации имеют интеркалярные вставки. Для широкого использования форм пшеницы с транслокациями важно место локализации чужеродного фрагмента на хромосоме пшеницы, синтения хромосомы донора хромосоме реципиента, обеспечивающая хорошую компенсационную способность хромосомы донора, а также нормальная передача интрогрессированного материала потомству, желательно по законам Менделя. Несмотря на то что в генбанках мира в большом количестве созданы и хранятся линии пшеницы с транслокациями, лишь малая часть коллекции используется в качестве пребридингового материала (Friebe et al., 1996; Леонова, 2018). Во многих случаях это объясняется отсутствием компенсационной способности чужеродной интрогрессии. Одно из требований для линий с транслокациями – включение небольшого фрагмента чужеродного хроматина в хромосому пшеницы, что предполагает целевой перенос необходимого участка хромосомы. Однако спонтанные пшенично-ржаные транслокации 1BL.1RS and 1AL.1RS являются примером генетически сбалансированных Робертсоновских транслокаций, которые стали самыми успешными среди пшенично-чужеродных транслокаций, использованных в селекции пшеницы (Jiang et al., 1994; Rasheed et al., 2018). По-видимому, передача адаптивных сцепленных локусов в полиплоидный геном мягкой пшеницы может быть более подходящим способом, чем передача единичных генов. Пшенично-ржаная транслокация

1RS.1BL несет признаки устойчивости к мучнистой росе, бурой, желтой и стеблевой ржавчине, увеличивает урожайность и не ухудшает качество зерна в определенных сортовых генотипах (Friebe et al., 1996; Belan et al., 2015). Транслокация 1RS.1BL входит в геномы многих современных коммерческих сортов яровой и озимой мягкой пшеницы (Степочкин и др., 2012; Belan et al., 2015). Созданы аллоплазматические рекомбинантные линии (*H. vulgare*) – *T. aestivum* с транслокацией 1RS.1BL, которые показали преимущество по сравнению с сортами-стандартами по устойчивости к бурой и стеблевой ржавчине, урожайности, качеству зерна. На их основе получены сорта яровой мягкой пшеницы Сигма, Уралосибирская 2 и Ишимская 11 (Pershina et al., 2018).

Работы по передаче чужеродного генетического материала в геном пшеницы не теряют своей актуальности, формы пшеницы с новыми ценными признаками создаются во многих лабораториях мира, а потенциал генофонда ржи как источник хозяйственно ценных признаков далеко не исчерпан (An et al., 2013; Ren et al., 2017; Schlegel, 2019). В качестве источника важных признаков используются линии с пшенично-ржаным замещением хромосом 2R(2D)₁ и центрическими транслокациями, в структуру которых включено длинное плечо хромосомы ржи 2RL. Они характеризуются устойчивостью к гессенской мухе (Friebe et al., 1990), мучнистой росе, бурой, стеблевой и желтой ржавчинам (Heun, Friebe, 1990; McIntosh et al., 1995; Merker, Forsstrom, 2000; Hysing et al., 2007; Lei et al., 2011; Li et al., 2018). Присутствие 2RL увеличивает содержание арабиноксилана в зерне, который влияет на хлебопекарное и пищевое качество зерновых (Bogos et al., 2002). Хромосома 2R увеличивает эффективность использования воды и укоренения растений при выращивании их в засушливых условиях (Ehdaie et al., 2003).

Целью данной работы было изучить хромосомный состав, мейотическую стабильность у линий с интрогрессией хромосомы ржи 2R в сорте Новосибирская 67, а также описать морфобиологические признаки колоса и провести оценку элементов продуктивности растений.

Материал и методы

Растительный материал. В работе были использованы: линии сортов мягкой пшеницы *T. aestivum* L., Саратовская 29 (С29), Новосибирская 67 (Н67), пшенично-ржаная дисомно-замещенная линия 2R(2D)₁ ($2n = 42$) (Силкова и др., 2006). Ранее в ИЦиГ СО РАН получены дисомно-замещенные ($2n = 42$) пшенично-ржаные линии (Щапова, Кравцова, 1990). Все линии, кроме 2R(2D)₁, 2R(2D)₂, 2R(2D)₃, созданы на генетической основе сорта Саратовская 29 (Силкова и др., 2006). У линии 2R(2D)₁ процентное содержание локусов с аллелями, отличными от С29 и характерными для сорта Н67, составило 13.7% (Силкова и др., 2006). Для создания замещенной линии 2R(2D)₁ сортом Н67 проведено беккроссирование линии 2R(2D)₁ сортом Н67 (рис. 1). В потомстве BC₂ изучен хромосомный состав у 21 растения с помощью С-окрашивания, у трех растений 26-11, 26-12, 26-13 обнаружено по одной модифицированной хромосоме ржи, которая была идентифицирована как T2R.2DL (см. рис. 1) (Красилова и др., 2011). После последующего беккроссирования

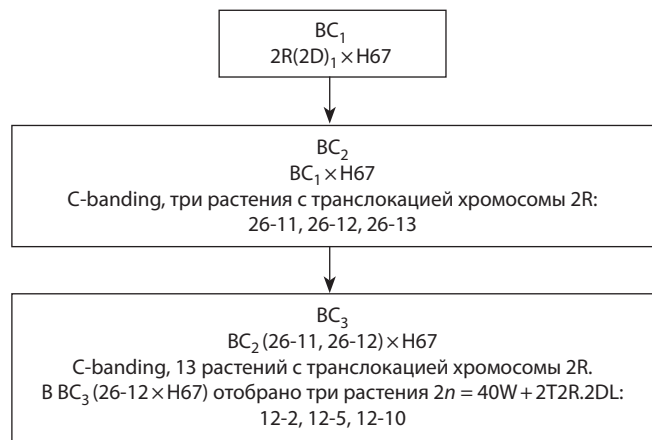


Рис. 1. Получение растений с транслокацией T2R.2DL.

Таблица 1. Изученный растительный материал

Номер растения		Номер делянки (число растений BC ₃ F ₂)		
BC ₂	BC ₃	BC ₃ F ₁ , осень–зима 2017 г.	Лето 2018 г.	Зима–весна 2019 г.
26-12	12-2	16-1	1 (20)	13 (26)
		16-2	2 (20)	14 (29)
		16-4	3 (20)	15 (29)
	12-5	17-3	4 (20)	16 (28)
		17-4	5 (20)	17 (25)
		17-5	6 (20)	18 (27)
	12-10	18-3	7 (20)	19 (29)
		18-6	8 (20)	20 (15)
		18-9	9 (20)	21 (28)

этих растений проведен анализ кариотипов у потомков. В потомстве BC₃ (26-12 × H67) выявлено три растения с двумя модифицированными хромосомами 2R (см. рис. 1). Потомство этих трех растений изучалось в настоящей работе (табл. 1).

Растения выращивали в условиях гидропонной теплицы вегетации осень–зима 2017 г., зима–весна 2019 г. (лаборатория искусственного выращивания растений ФИЦ ИЦиГ СО РАН), режим освещения день:ночь – 16:8, а также летом 2018 г. на экспериментальном поле Селекционно-генетического комплекса ФИЦ ИЦиГ СО РАН.

Флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH). Митотические и мейотические препараты для FISH готовили по описанной ранее методике (Silkova et al., 2018). Митотические препараты готовили из корешков вегетирующих растений BC₃F₁. Колосья для мейотического анализа фиксировали у растений BC₃F₂. Анализировали мейоциты на стадиях диакинеза, метафазы I, анафазы I и телофазы II. В работе использовали: пробу *Aegilops tauschii* pAet6-09, специфичную для центромерных повторов хромосом риса, пшеницы, ржи и ячменя (Zhang et al.,

2004); pAWRc, специфичную для центромерного повтора хромосом ржи (Fganski, 2001), и геномную ДНК ржи. Образцы ДНК повторов pAet6-09 и pAWRc любезно предоставлены д-ром А. Lukaszewski (Университет Риверсайд, Калифорния, США). Центромеро-специфичные пробы метили биотином 16-dUTP или дигоксигенином 11-dUTP при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). Суммарную ДНК ржи метили ник-трансферазой с биотином 16-dUTP или дигоксигенином 11-dUTP. Пробы использовали совместно в различных пропорциях и смешивали с блокирующей пшеничной ДНК. Препараты заключали в среду Vectashield antifade solution (Vector Laboratories), замедляющую выцветание флуоресценции, содержащую 1 мкг/мл DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol, Sigma-Aldrich, США) для окрашивания хроматина. Все препараты анализировали при помощи микроскопа Axio ImagerM1 (KarlZeiss, Германия). Изображения регистрировали камерой ProgRes MF (Meta Systems, Jenoptik) в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН и обрабатывали с использованием программного обеспечения Adobe Photoshop CS2.

С-дифференциальное окрашивание (C-banding) кариотипов BC_3F_2 проводили по ранее опубликованной методике (Badaeva et al., 1990). Митотические препараты готовили из корешков пророщенных зерновок. Препараты анализировали с помощью микроскопа Amplival (Karl Zeiss, Германия). Идентификацию индивидуальных хромосом геномов А, В, D и R осуществляли согласно обобщенной видовой идиограмме дифференциально окрашенных хромосом (Badaeva et al., 1990).

Анализ хозяйственно ценных признаков. Проанализированы следующие элементы продуктивности: высота растения, длина соломины, продуктивная кустистость, длина главного колоса, количество зерен главного колоса, масса зерен главного колоса, количество зерен с растения, масса зерен с растения, масса 1000 зерен. Статистический анализ проведен по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Молекулярно-цитогенетический анализ состава хромосом и мейотического деления у линий с транслоцированной хромосомой

Для идентификации модифицированной хромосомы и анализа хромосомного состава у линий проведено окрашивание хромосом с использованием FISH и C-banding. FISH-анализ кариотипов с зондом общей ДНК ржи и центромеро-специфичными повторами pAWRc и pAet6-09 выявил две транслоцированные хромосомы (рис. 2).

На одном плече хромосомы локализован зонд общей ДНК ржи (см. рис. 2, а, б), а в центромерном районе – повторы pAWRc (а) и pAet6-09 (б). Следовательно, одно плечо вместе с центромерным районом у этих хромосом принадлежит хромосоме ржи 2R (а). Таким образом, в результате разрывов хромосом 2R и 2D в прицентромерном районе и последующего слияния плеч хромосом ржи и пшеницы была образована центрическая транслокация T2DL.2R.

С помощью окрашивания хромосом у кариотипов растений BC_3F_2 (см. табл. 1) методом C-banding выявлен полный набор хромосом пшеницы, кроме хромосомы 2D. Изученные кариотипы оказались идентичными. Модифицированная хромосома идентифицирована как центрическая пшенично-ржаная транслокация, состоящая из двух длинных плеч хромосом 2D и 2R – T2DL.2RL (рис. 3).

Известно, что центрические или Робертсоновские транслокации часто образуются в потомстве двойных пшенично-ржаных моносомиков (Lukaszewski, 1993; Marais G.F., Marais A.S., 1994; Liu et al., 2013). Механизм формирования центрических транслокаций выявлен в мейозе двойных моносомиков 1A-1H¹ (мягкая пшеница – *Elymus trachycaulus*) (Friebe et al., 2005). Хромосомы 1A и 1H¹ не являются гомологами, поэтому в мейозе они не формировали бивалент и из-за аномального расхождения

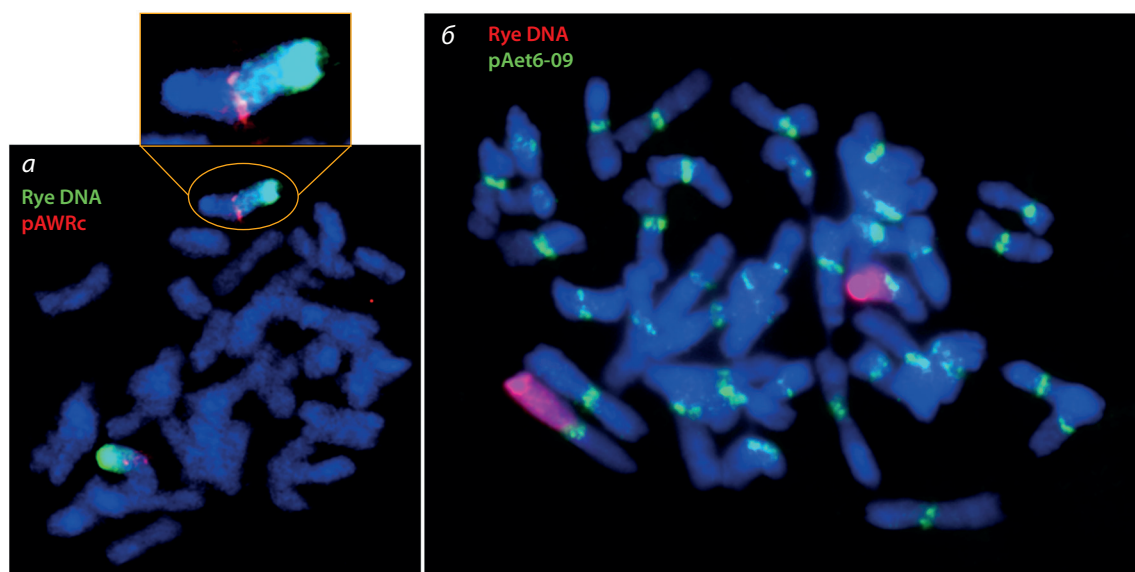


Рис. 2. Кариотипы растений с центрической пшенично-ржаной транслокацией 16-1 (а) и 17-4 (б). ДНК ржи окрашена зеленым (а) и красным (б), ДНК хромосом – синим (DAPI).

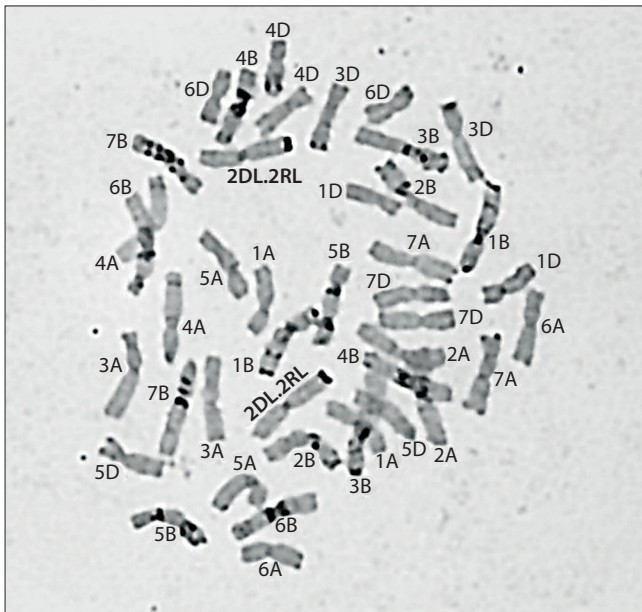


Рис. 3. С-окрашивание хромосом кариотипа линии с транслокацией T2DL.2RL.

в первом делении мейоза могли разрываться в центромерном районе. Объединение плеч хромосом происходило во время интеркинеза, так как уже во втором делении мейоза идентифицировалась транслокация T1A.1H^t. Хромосома 2R с измененной структурой в моносомном состоянии была обнаружена нами в кариотипах растений BC₂, которые были получены в результате беккрасса растений BC₁, являющихся двойными моносомиками 2R-2D. Анализ мейоза у двойных моносомиков 2R-2D с использованием геномной *in situ* гибридизации показал, что в результате разрыва в центромере хромосомы 2R телоцентрики могут образовываться не только во втором, но и в первом делении мейоза (Силкова и др., 2014). Следовательно, механизм формирования центрической транслокации T2DL.2RL может быть аналогичным описанному в работе (Friebe et al., 2005).

Исследования по передаче чужеродного материала в геном мягкой пшеницы показывают, что созданные формы и линии могут характеризоваться низкой фертильностью и потерей интрогрессий (Jiang et al., 1994). Одной из причин является мейотическая нестабильность из-за генетической несовместимости генома мягкой пшеницы с чужеродными интрогрессиями. В связи с этим нами изучено поведение хромосом в мейозе у линий с транслокацией. Для анализа поведения непосредственно транслоцированных хромосом использовался FISH с зондами общей ДНК ржи и центромеро-специфичного повтора рAet6-09. Основной характеристикой стабильности мейоза является формирование бивалентов на стадии метафазы I. По результатам анализа, во всех мейоцитах на стадиях диакинеза (рис. 4) и метафазы I (рис. 5, а, б) биваленты формируются как хромосомами пшеницы, так и транслоцированными хромосомами (табл. 2). Гомологичная природа хромосом T2DL.2RL подтверждается тем, что они формировали биваленты во всех мейоцитах.

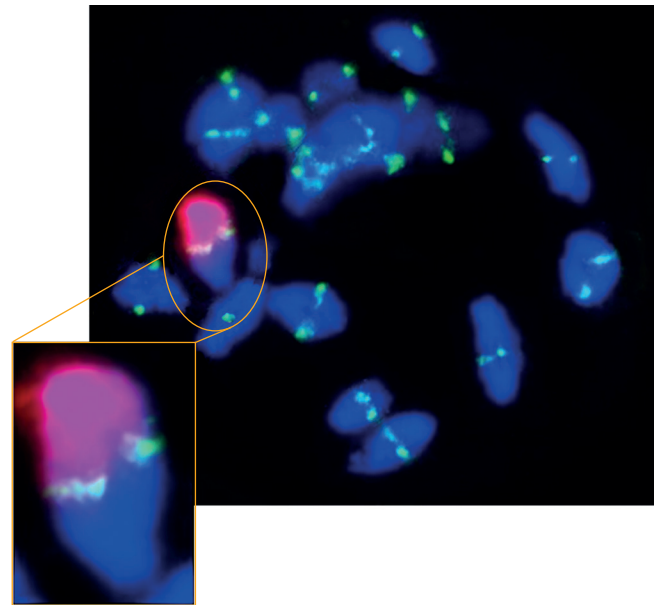


Рис. 4. Формирование закрытого (кольцевого) бивалента транслоцированными хромосомами на стадии диакинеза.

Здесь и на рис. 5: красным окрашены плечи хромосом ржи 2RL, синим – плечи хромосом пшеницы 2DL, зеленым – центромерные районы хромосом.

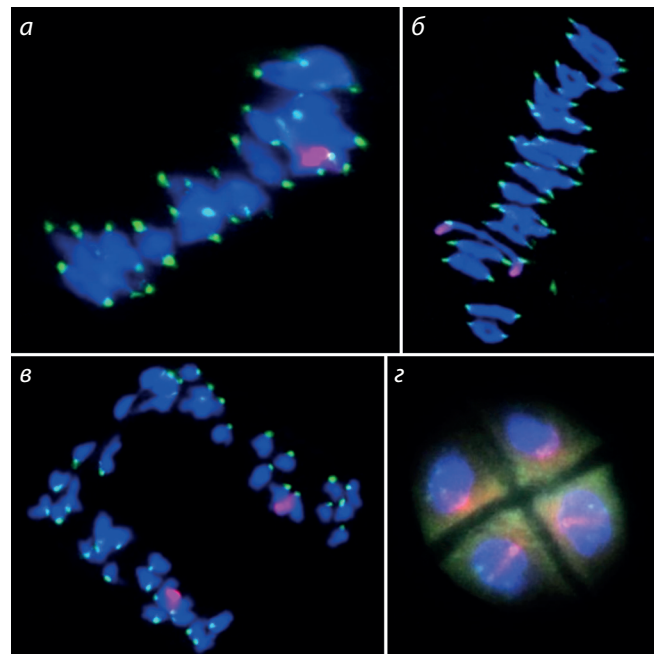


Рис. 5. Поведение транслоцированных хромосом в мейозе. Формирование закрытого (кольцевого) (а) и открытого (б) бивалента в метафазе I. Правильное расхождение транслоцированных хромосом в анафазе I (в). Транслоцированные хромосомы включены в каждую из четырех микроспор на стадии тетрады (з).

Хромосомы T2DL.2RL правильно распределялись между полюсами в первом делении (см. рис. 5, в), а в конце мейотического деления включались в микроспоры (см. рис. 5, з). Таким образом, линии характеризовались стабильностью.

Таблица 2. Частота формирования закрытых и открытых бивалентов транслоцированными хромосомами T2DL.2RL в мейозе линий

Номер растения, лето 2018 г.	Изученные мейоциты, шт.	Число бивалентов, %	
		закрытых	открытых
3-2	380	92.13	7.87
5-2	222	81.64	18.36
6-1	142	85.91	14.09
9-1	381	94.11	5.89
9-2	556	91.21	8.79



Рис. 6. Колосья сорта Новосибирская 67, линии с транслокацией T2DL.2RL и пшенично-ржаной замещенной линии 2R(2D)₁.

Морфологическая характеристика колоса растений линии T2DL.2RL

Колосья пшенично-ржаной замещенной линии 2R(2D)₁, сорта Н67 и линии с транслокацией T2DL.2RL имеют одинаковые морфологические признаки: колос веретеновидный, безостый, белый; плотность колоса средняя; колосковая чешуя яйцевидная, среднего размера, со слабой нервацией; зубец короткий, тупой, слегка клювовидный; плечо широкое, прямое, в верхней части приподнятое; киль широкий, хорошо выраженный. Особенностью колоса у линии 2R(2D)₁ было более плотное расположение колосков на вершине колоса, эти колоски характеризовались пониженной фертильностью (рис. 6).

Анализ элементов продуктивности

Родительские формы транслоцированных линий (BC₃) выращены в условиях гидропонной теплицы 2017 г., вегетация осень–зима. У растений были изучены элементы продуктивности: высота растения, длина главного колоса, продуктивная кустистость, количество зерен с растения,

масса зерен с растения, масса 1000 зерен (табл. 3). Растения характеризовались низкорослостью (высота варьировала от 85.5 до 93 см), хорошей продуктивной кустистостью (формировали от трех до семи стеблей с вызревшим зерном в колосьях), высокими значениями массы 1000 зерен (33.14–37.89 г).

Сравнение элементов продуктивности у линии T2DL.2RL и сортов Н67 и С29, выращенных в полевых условиях 2018 г., показало, что транслоцированная линия достоверно уступает сорту Н67 по всем показателям, но не отличается от сорта С29 (табл. 4). Показатели продуктивности у растений линии T2DL.2RL также оказались ниже, чем у родительских растений, выращенных в условиях гидропонной теплицы (см. табл. 3).

По таким признакам, как число колосьев и число колосков в главном колосе, достоверных различий между транслоцированной линией и сортом Н67 не выявлено. В большей степени различались значения по количеству зерен с главного колоса и с растения, а также по массе зерен с растения и массе 1000 зерен. Сравнительный анализ

Таблица 3. Характеристика родительских растений по элементам продуктивности (осень–зима 2017 г.)

Признак	Номер растения								
	16-1	16-2	16-4	17-3	17-4	17-5	18-3	18-6	18-9
Высота растения, см	89	87	93	85.5	91	93	90.5	87	91
Продуктивная кустистость, шт.	6	3	6	4	5	3	7	3	7
Длина главного колоса, см	6	7	6	8.5	6	8	7.5	7	8
Число зерен с растения, шт.	118	66	128	89	102	52	136	68	156
Масса зерен с растения, г	4.02	2.31	4.54	3.25	3.38	1.97	4.97	2.53	5.36
Масса 1000 зерен, г	34.07	35.00	35.47	36.52	33.14	37.89	36.54	37.21	34.36

Таблица 4. Сравнительный анализ линии T2DL.2RL с сортами Саратовская 29 и Новосибирская 67 по признакам продуктивности (лето 2018 г.)

Признак	T2DL.2RL	C29	H67
Высота растения, см	97.71 ± 2.37	126.30 ± 2.33***	121.36 ± 1.16***
Длина главного колоса, см	9.09 ± 0.35	9.10 ± 0.18	10.07 ± 0.24*
Число колосьев, шт.	4.60 ± 0.43	4.23 ± 0.34	4.73 ± 0.23
Число спелых колосьев, шт.	3.30 ± 0.35	3.03 ± 0.24	4.10 ± 0.23*
Число колосков в главном колосе, шт.	15.68 ± 0.50	14.73 ± 0.16	15.90 ± 0.29
Число зерен в главном колосе, шт.	23.16 ± 1.63	27.70 ± 1.37	37.23 ± 1.19***
Масса зерен главного колоса, г	0.69 ± 0.08	0.86 ± 0.07	1.32 ± 0.07***
Число зерен с растения, шт.	56.53 ± 6.56	58.23 ± 4.25	135.10 ± 9.01***
Масса зерен с растения, г	1.48 ± 0.20	1.53 ± 0.14	4.61 ± 0.34***
Масса 1000 зерен, г	24.65 ± 1.40	25.37 ± 1.14	33.71 ± 0.78***
Число растений (всего), шт.	173	30	30

* $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$.

элементов продуктивности линии T2DL.2RL с сортами H67 и C29, а также с замещенной линией 2R(2D)₁, проведенный в условиях гидропонной теплицы во время вегетации зима–весна 2019 г., показал, что линия T2DL.2RL достоверно уступает сорту H67 по всем показателям с различной степенью достоверности (см. табл. 4).

Наиболее достоверные отличия ($p \leq 0.001$) линии T2DL.2RL от сорта H67 получены для признаков «количество колосков на главном колосе», «число зерен с растения», «масса зерен с растения» (табл. 5). Растения сорта C29 достоверно ($p \leq 0.001$) превосходили растения линии T2DL.2RL только по четырем показателям: число зерен с главного колоса и с растения, масса зерен с главного колоса и с растения. Замещенная линия 2R(2D)₁ с высокой достоверностью превосходила линии с транслокацией T2DL.2RL по признакам «длина главного колоса», «плотность колоса», «количество колосков в главном колосе», «масса зерен с главного колоса», однако масса 1000 зерен была достоверно меньше (см. табл. 5).

Таким образом, линия T2DL.2RL по элементам продуктивности достоверно уступала сорту H67 в обеих вегетациях, а также сорту C29 при выращивании в гидропонной теплице. Особенно эти различия были выражены у растений, выращенных в полевых условиях. Одним из

факторов, отрицательно повлиявших на показатели продуктивности колоса (число и массу зерен), могут быть генетические особенности сортов H67 и C29, а также линии T2DL.2RL. Вероятно, в полевую вегетацию условия произрастания (температурный и водный режимы) растений на 8–11-м этапах органогенеза, когда происходит закладка генеративных органов, опыление, завязывание и налив зерновки (Батыгина, 2014), были неблагоприятными для сорта C29 и линии T2DL.2RL в сравнении с сортом H67. На продуктивность пшеницы может повлиять и реакция растений на длину светового дня (Шульгин и др., 2015). У сорта C29 обнаружен рецессивный ген *Ppd-D1b*, обуславливающий чувствительность к фотопериоду (Файт и др., 2014), а отсутствие плеча 2DS, на котором локализован ген *Ppd-D1*, могло повлиять на интенсивность процессов онтогенеза у линии T2DL.2RL, приведя к потере продуктивности. Растения пшеницы сорта H67, районированного в лесостепной зоне юга Западной Сибири, напротив, являются растениями длинного дня. Однако в условиях выращивания в гидропонной теплице с фиксированной продолжительностью светового дня, постоянной интенсивностью фотосинтетически активной радиации и одинаковым спектром излучения света достоверных различий по элементам продуктивности между сортами C29 и H67

Таблица 5. Сравнительный анализ линии T2DL.2RL с сортами Новосибирская 67, Саратовская 29 и замещенной линией 2R(2D)₁ по признакам продуктивности (зима–весна 2019 г.)

Признак	T2DL.2RL	H67	C29	2R(2D) ₁
Высота растения, см	106.03 ± 1.34	111.0 ± 1.31**	121.22 ± 1.51***	138.8 ± 1.38***
Продуктивная кустистость, шт.	4.75 ± 0.29	5.6 ± 0.34*	4.89 ± 0.3	4.8 ± 0.30
Длина главного колоса, см	8.42 ± 0.23	8.9 ± 0.15*	8.4 ± 0.11	9.5 ± 0.15***
Плотность главного колоса	2.01 ± 0.02	2.1 ± 0.04**	1.7 ± 0.02***	2.2 ± 0.03***
Число колосков главного колоса, шт.	16.8 ± 0.42	18.9 ± 0.25***	14.4 ± 0.12***	20.4 ± 0.32***
Число зерен главного колоса, шт.	27.1 ± 0.81	30.5 ± 1.23*	35.7 ± 0.98***	30.5 ± 0.66**
Масса зерен главного колоса, г	1.2 ± 0.04	1.4 ± 0.06**	1.8 ± 0.06***	1.3 ± 0.03**
Число зерен с растения, шт.	114.2 ± 5.38	163.6 ± 12.46***	154.0 ± 8.92***	133.3 ± 8.69
Масса зерен с растения, г	4.8 ± 0.25	7.2 ± 0.58***	6.8 ± 0.4***	5.2 ± 0.32
Масса 1000 зерен, г	42.2 ± 0.51	43.7 ± 0.42*	43.9 ± 0.6*	38.9 ± 0.62***
Число растений (всего), шт.	236	23	28	28

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

не было получено, но показатели продуктивности у линии T2DL.2RL также были достоверно ниже.

На основании полученных результатов сделан вывод об отрицательном влиянии транслокации T2DL.2RL на признаки продуктивности. В других работах показано, что на изменение/сохранение агрономических признаков у пшеницы влияют конкретные хромосомы, образующие транслокацию, и происхождение родительских форм транслоцированных линий (May, Appels, 1984; Hysing et al., 2007). Растения линий с транслокацией T2BS.2RL характеризуются схожими с родительской линией показателями продуктивности (Hysing et al., 2007), а транслокация T2RS.2BL вызывает летальность проростков в определенных генотипах доноров пшеницы (May, Appels, 1984).

Отличительной характеристикой линий с транслокацией T2DL.2RL стала низкорослость. В полевых условиях средняя высота растений была на 23.65 и 28.6 см ниже растений сорта H67 и C29 соответственно (см. табл. 4). В условиях выращивания в гидропонной теплице растения с транслокацией также имели достоверно более низкую высоту в сравнении с H67 и C29 и с замещенной линией 2R(2D)₁ (см. табл. 5). Высота растений линии 2R(2D)₁ была достоверно выше по сравнению с сортами. Эти данные предполагают иную регуляцию признака «высота растения» у линий T2DL.2RL и 2R(2D)₁, чем у сортов.

Признак короткостебельности у пшеницы и ржи контролируется генами карликовости. Наибольшее распространение в сортах пшеницы получили гены «зеленой революции» *Rht-B1b* (*Rht1*) и *Rht-D1b* (*Rht2*), локализованные на хромосомах 4В и 4D соответственно, а также ген *Rht8*, локализованный на хромосоме 2DS (Börner et al., 1996). Ген *Ppd-D1a*, обуславливающий нечувствительность растений к фотопериоду и локализованный тоже на 2DS, независимо от *Rht8* оказывает влияние на снижение высоты (Börner et al., 1993). Однако молекулярный анализ низкорослых образцов гексаплоидных тритикале с замещением хромосом 2R/2D не выявил амплификации праймеров к аллелям *Rht8c* и *Ppd-D1a*, на основании чего

был сделан вывод о влиянии хромосомы 2D на уменьшение высоты растений (Коршунова, 2015). Участие хромосомы 2D в регуляции высоты растений показано также в работе по анализу агрономических признаков у озимой гексаплоидной тритикале (Bazhenov et al., 2015). У линий с замещением хромосомы 2R хромосомой 2D обнаружен обратный эффект: снижение высоты растений (Bazhenov et al., 2015).

Заключение

Таким образом, увеличение высоты растений у линии 2R(2D)₁ может быть следствием замещения хромосом 2R/2D. В данном случае хромосома ржи 2R не компенсирует отсутствие хромосомы 2D, возможно потому, что на хромосоме 2R расположен рецессивный ген карликовости *dw2* (Börner et al., 1996). Снижение высоты растений у линии с транслокацией T2DL.2RL, вероятно, может быть вызвано другими неизвестными в настоящее время генами, находящимися на хромосомах 2DL и 2RL или других хромосомах пшеницы. Для выявления истинной причины необходимы дальнейшие исследования.

Список литературы / References

- Батыгина Т.Б. Биология развития растений. Симфония жизни. СПб.: Изд-во ДЕАН, 2014.
[Batygina T.B. Developmental Biology of Plants. Symphony of Life. St. Petersburg: DEAN Publ., 2014. (in Russian)]
- Коршунова А.Д. Влияние генов короткостебельности на хозяйственно ценные признаки яровой тритикале: Дис. ... канд. биол. наук. М., 2015.
[Korshunova A.D. The influence of short-stem genes on economically valuable traits of spring triticale. Cand. Sci. (Biol.) Diss. Moscow, 2015. (in Russian)]
- Красилова Н.М., Адонина И.Г., Силкова О.Г., Шумный В.К. Особенности передачи хромосомы ржи 2R при беккроссировании пшенично-ржаных замещенных линий 2R(2D) различными сортами мягкой пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2011;15(3):554-562.
[Krasilova N.M., Adonina I.G., Silkova O.G., Shumny V.K. Transmission of rye chromosome 2R in backcrosses of wheat-rye 2R(2D)

- substitution lines to various common wheat varieties. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektitsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2011;15(3):554-562. (in Russian)]
- Леонова И.Н. Влияние чужеродного генетического материала на проявление хозяйственно важных признаков мягкой пшеницы (*T. aestivum* L.). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(3):321-328. DOI 10.18699/VJ18.367.
- [Leonova I.N. Influence of alien genetic material on the manifestation of agronomically important traits of common wheat (*T. aestivum* L.). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektitsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(3):321-328. DOI 10.18699/VJ18.367. (in Russian)]
- Силкова О.Г., Добровольская О.Б., Дубовец Н.И., Адонина И.Г., Кравцова Л.А., Родер М.С., Салина Е.А., Щапова А.И., Шумный В.К. Создание пшенично-ржаных замещенных линий с идентификацией хромосомного состава кариотипов методами С-бэндинга, GISH и SSR-маркеров. Генетика. 2006;42(6):793-802.
- [Silkova O.G., Dobrovolskaya O.B., Dubovets N.I., Adonina I.G., Kravtsova L.A., Roder M.S., Salina E.A., Shchapova A.I., Shumny V.K. Production of wheat-rye substitution lines and identification of chromosome composition of karyotypes using C-banding, GISH, and SSR markers. Russ. J. Genet. 2006;42(6):645-653. DOI 10.1134/S1022795406060093.]
- Силкова О.Г., Кабаненко Ю.Н., Логинова Д.Б. Влияние пшенично-ржаного замещения на элиминацию хромосом: анализ поведения унивалентов в мейозе пшеницы с димносомией и тетрамономосомией. Генетика. 2014;50(3):282-290.
- [Silkova O.G., Kabanenko Yu.N., Loginova D.V. The effect of wheat-rye substitution on chromosome elimination: an analysis of univalents' behavior in wheat meiosis with dimonosomy and tetramonosomy. Russ. J. Genet. 2014;50(3):245-252. DOI 10.1134/S102279541402015X.]
- Степочкин П.И., Пономаренко В.И., Першина Л.А., Осадчая Т.С., Трубочеева Н.В. Использование отдаленной гибридизации для создания селекционного материала озимой пшеницы. Достижения науки и техники АПК. 2012;6:37-38.
- [Stepochkin P.I., Ponomarenko V.I., Pershina L.A., Osadchaya T.S., Trubacheeva N.V. Utilization of distant hybridization for development of breeding material of winter wheat. Dostizheniya Nauki i Tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC. 2012;6:37-38. (in Russian)]
- Файт В.И., Балашова И.А., Федорова В.Р., Бальвинская М.С. Идентификация генотипов *Ppd-1* сортов мягкой пшеницы методами генетического и STS-ПЦР анализа. Физиология растений и генетика. 2014;46:325-336.
- [Fayt V.I., Balashova I.A., Fedorova V.R., Balvinskaya M.S. Identification of bread wheat *Ppd*-genotypes by genetic and STS-PCR analysis. Fiziologiya Rasteniy i Genetika = Plant Physiology and Genetics. 2014;46:325-336. (in Russian)]
- Шульгин И.А., Вильфанд Р.М., Страшная А.И., Береза О.В. Энергобалансовая оценка урожайности яровых культур. Изв. ТСХА. 2015;5:61-80.
- [Shul'gin I.A., Vil'fand R.M., Strashnaya A.I., Bereza O.V. Energy-balance approach to evaluation of spring crops yield. Izvestiya Timiryazevskoy Selskokhozyaystvennoy Akademii = Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy. 2015;5:61-80. (in Russian)]
- Щапова А.И., Кравцова Л.А. Цитогенетика пшенично-ржаных гибридов. Новосибирск: Наука, 1990.
- [Shchapova A.I., Kravtsova L.A. Cytogenetic of Wheat-Rye Hybrids. Novosibirsk: Nauka Publ., 1990. (in Russian)]
- An D., Zheng Q., Zhou Y., Ma P., Lv Z., Li L., Li B., Luo Q., Xu H., Xu Y. Molecular cytogenetic characterization of a new wheat-rye 4R chromosome translocation line resistant to powdery mildew. Chromosome Res. 2013;21:419-432. DOI 10.1007/s10577-013-9366-8.
- Badaeva E.D., Sozinova L.F., Badaev N.S., Muravenko O.V., Zelenin A.V. "Chromosomal passport" of *Triticum aestivum* L. em Thell. cv. Chinese Spring and standartization of chromosomal analysis of cereals. Cereal Res. Commun. 1990;18:273-281. Available at: <https://www.jstor.org/stable/23783638>
- Bazhenov M.S., Divashuk M.G., Kroupin P.Yu., Pylnev V.V., Karlov G.I. The effect of 2D(2R) substitution on agronomical traits of triticale in early generations of two connected crosses. Cereal Res. Commun. 2015;43:504-514. DOI 10.1556/0806.43.2015.002.
- Belan I.A., Rosseeva L.P., Rosseev V.M., Badaeva E.D., Zelenskiy Y.I., Blokhina N.P., Shepelev S.S., Pershina L.A. Study of adaptive and agronomic characters in lines of common wheat Omskaya 37 carrying 1RS.1BL and 7DL-7Ai translocations. Russ. J. Genet.: Appl. Res. 2015;5(1):41-47. DOI 10.1134/S2079059715010037.
- Börner A., Plaschke J., Korzun V.A., Worland J. The relationships between the dwarfing genes of wheat and rye. Euphytica. 1996;89:69-75. DOI 10.1007/BF00015721.
- Börner A., Worland A.J., Plaschke J., Schumann E., Law C.N. Pleiotropic effects of genes for reduced height (*rht*) and day-length insensitivity (*ppd*) on yield and its components for wheat grown in middle Europe. Plant Breed. 1993;111:204-216. DOI 10.1111/j.1439-0523.1993.tb00631.x.
- Boros D., Lukaszewski A.J., Aniol A., Ochodzki P. Chromosome location of genes controlling the content of dietary fibre and arabinoxylans in rye. Euphytica. 2002;128:1-8. DOI 10.1023/A:1020639601959.
- Ehdaie B., Whitkus R.W., Waines J.G. Root biomass, water use efficiency, and performance of wheat-rye translocations of chromosomes 1 and 2 in spring bread wheat 'Pavon'. Crop Sci. 2003;43:710-717. DOI 10.2135/cropsci2003.0710.
- Feuillet C., Langridge P., Waugh R. Cereal breeding takes a walk on the wild side. Trends Genet. 2008;24:24-32. DOI 10.1016/j.tig.2007.11.001.
- Francki M.G. Identification of Bilby, a diverged centromeric T1-copia retrotransposon family from cereal rye (*Secale cereale* L.). Genome. 2001;44:266-274. DOI 10.1139/g00-112.
- Friebe B., Hatchett J.H., Sears R.G., Gill B.S. Transfer of Hessian fly resistance from Chaupon rye to hexaploid wheat via a 2BS/2RL wheat-rye chromosome translocation. Theor. Appl. Genet. 1990;79:385-389. DOI 10.1007/BF01186083.
- Friebe B., Jiang J., Raupp W.J., McIntosh R.A., Gill B.S. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. Euphytica. 1996;91:59-87. DOI 10.1007/BF00035277.
- Friebe B., Zhang P., Linc G., Gill B.S. Robertsonian translocations in wheat arise by centric misdivision of univalents at anaphase I and rejoining of broken centromeres during interkinesis of meiosis II. Cytogenet. Genome Res. 2005;109:293-297. DOI 10.1159/000082412.
- Fu S., Lv Z., Qi B., Guo X., Li J., Liu B., Han F. Molecular cytogenetic characterization of wheat - *Thinopyrum elongatum* addition, substitution and translocation lines with a novel source of resistance to wheat fusarium head blight. J. Genet. Genomics. 2012;39:103-110. DOI 10.1016/j.jgg.2011.11.008.
- Heun M., Friebe B. Introgression of powdery mildew resistance from rye into wheat. Phytopathology. 1990;80:242-245. DOI 10.1094/phyto-80-242.
- Hysing S.-C., Hsam S.L.K., Singh R.P., Huerta-Espino J., Boyd L.A., Koebner R.M.D., Cambron S., Johnson J.W., Bland D.E., Liljeroth E., Merker A. Agronomic performance and multiple disease resistance in T2BS.2RL wheat-rye translocation lines. Crop Sci. 2007;47:254-260. DOI 10.2135/cropsci2006.04.0269.
- Jiang J.M., Friebe B., Gill B.S. Recent advances in alien gene transfer in wheat. Euphytica. 1994;73:199-212. DOI 10.1007/BF00036700.
- Lei M., Li G., Zhang S., Liu C., Yang Z. Molecular cytogenetic characterization of a new wheat *Secale africanum* 2R^(a)(2D) substitution line for resistance to stripe rust. J. Genet. 2011;90:283-287. DOI 10.1007/s12041-011-0081-y.
- Leonova I.N., Budashkina E.B. The study of agronomical traits determining productivity of *Triticum aestivum*/*Triticum timopheevii* introgression lines with resistance to fungal diseases. Russ. J. Genet.: Appl. Res. 2017;7(3):299-307. DOI 10.1134/S2079059717030091.

- Li F., Li Y., Cao L., Liu P., Geng M., Zhang Q., Qiu L., Sun Q., Xie C. Simultaneous transfer of leaf rust and powdery mildew resistance genes from hexaploid Triticale cultivar Sorento into bread wheat. *Front. Plant Sci.* 2018;9:85. DOI 10.3389/fpls.2018.00085.
- Liu W., Danilova T.V., Rouse M.N., Bowden R.L., Friebe B., Gill B.S., Pumphrey M.O. Development and characterization of a compensating wheat-*Thinopyrum intermedium* Robertsonian translocation with *Sr44* resistance to stem rust (Ug99). *Theor. Appl. Genet.* 2013; 126:1167. DOI 10.1007/s00122-013-2044-6.
- Lukaszewski A.J. Reconstruction in wheat of complete chromosomes 1B and 1R from the 1RS.1BL translocation of "Kavkas" origin. *Genome.* 1993;36:821-824. DOI 10.1139/g93-109.
- Marais G.F., Marais A.S. The derivation of compensating translocations involving homoeologous group 3 chromosomes of wheat and rye. *Euphytica.* 1994;79:75-80. DOI 10.1007/BF00023578.
- May C.E., Appels R. Seedling lethality in wheat: a novel phenotype associated with a 2RS/2BL translocation chromosome. *Theor. Appl. Genet.* 1984;68:163-168. DOI 10.1007/BF00252333.
- McIntosh R.A., Friebe B., Jiang J., The D., Gill B.S. Cytogenetical studies in wheat XVI. Chromosome location of a new gene for resistance to leaf rust in a Japanese wheat-rye translocation line. *Euphytica.* 1995;82:141-147. DOI 10.1007/BF00027060.
- Merker A., Forsstrom P.O. Isolation of mildew resistant wheat-rye translocations from a double substitution line. *Euphytica.* 2000;115: 167-172. DOI 10.1023/A:1004018500970.
- Mujeeb-Kazi A., Kazi A.G., Dundas I., Rasheed A., Ogbonnaya F., Kishi M., Bonnett D., Wang R.R.-C., Xu S., Chen P., Mahmood T., Bux H., Farrakh S. Genetic diversity for wheat improvement as a conduit to food security. *Adv. Agron.* 2013;122:179-257. DOI 10.1016/B978-0-12-417187-9.00004-8.
- Pershina L.A., Belova L.I., Trubacheeva N.V., Osadchaya T.S., Shumny V.K., Belan I.A., Rosseeva L.P., Nemchenko V.V., Abakumov S.N. Alloplasmic recombinant lines (*H. vulgare*)-*T. aestivum* with 1RS.1BL translocation: initial genotypes for production of common wheat varieties. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2018;22(5):544-552. DOI 10.18699/VJ18.393.
- Rasheed A., Mujeeb-Kazi A., Ogbonnaya F.C., He Z., Rajaram S. Wheat genetic resources in the post-genomics era: promise and challenges. *Ann. Bot.* 2018;121:603-616. DOI 10.1093/aob/mcx148.
- Ren T., Tang Z., Fu S., Yan B., Tan F., Ren Z., Li Z. Molecular cytogenetic characterization of novel wheat-rye T1RS.1BL translocation lines with high resistance to diseases and great agronomic traits. *Front. Plant Sci.* 2017;8:799. DOI 10.3389/fpls.2017.00799.
- Schlegel R. Current List of Wheats with Rye and Alien Introgression. Version 08.19. 2019. Available at: <http://www.rye-gene-map.de/rye-introgression>
- Silkova O.G., Ivanova Y.N., Krivosheina E.A., Bondarevich E.B., Solovey L.A., Sycheva E.A., Dubovets N.I. Wheat chromosome instability in the selfed progeny of the double monosomics 1Rv-1A. *Biol. Plant.* 2018;62:241-249. DOI 10.1007/s10535-017-0757-0.
- Timonova E.M., Leonova I.N., Röder M.S., Salina E.A. Marker-assisted development and characterization of a set of *Triticum aestivum* lines carrying different introgressions from the *T. timopheevii* genome. *Mol. Breed.* 2013;31:123-136. DOI 10.1007/s11032-012-9776-x.
- Zhang P., Friebe B., Gill B., Park R.F. Cytogenetics in the age of molecular genetics. *Crop Pasture Sci.* 2007;58:498-506. DOI 10.1071/AR07054.
- Zhang P., Wanlong L., Fellers J., Friebe B., Gill B.S. BAC-FISH in wheat identifies chromosome landmarks consisting of different types of transposable elements. *Chromosoma.* 2004;112:288-299. DOI 10.1007/s00412-004-0273-9.

ORCID ID

Yu.N. Ivanova orcid.org/0000-0002-9655-4539
D.B. Loginova orcid.org/0000-0002-1207-1514

Благодарности. Работа в ЦКП Микроскопического анализа биологических объектов СО РАН и ЛИВР ИЦиГ СО РАН проведена при финансовой поддержке бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН № 0324-2018-0018. Анализ кариотипов и поведения хромосом в мейозе с помощью FISH выполнен при финансовой поддержке Российского научного фонда (РНФ), проект № 16-16-00011. Работа по C-banding митотических хромосом поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (БРФФИ В15СО-030).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 30.07.2019. После доработки 27.09.2019. Принята к публикации 30.09.2019.

Пятая международная научная конференция PlantGen2019

Влияние хозяин-специфичного токсина SnTOX3 патогена *Stagonospora nodorum* на сигнальный путь этилена и редокс-статус растений мягкой яровой пшеницы

С.В. Веселова , Г.Ф. Бурханова, Т.В. Нужная, С.Д. Румянцев, И.В. Максимов

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

 e-mail: veselova75@rambler.ru


Важнейший фактор вирулентности возбудителя септориоза пшеницы *Stagonospora nodorum* Berk. – многочисленные некротрофные эффекторы (НЭ) гриба (SnTox), взаимодействующие с продуктами генов восприимчивости хозяина (*Snn*). Взаимодействия SnTox-Snn осуществляются по типу ген-на-ген и ведут к развитию болезни. В настоящей работе изучено взаимодействие SnTox3-Snn3, результатом которого является развитие инфекции на листьях с образованием обширных зон поражения. Предположительно, механизм действия SnTox3 связан с регуляцией редокс-метаболизма и влиянием на синтез этилена у растений пшеницы, однако молекулярные механизмы до конца не раскрыты. Для характеристики взаимодействия SnTox3-Snn3 в работе были использованы изоляты *S. nodorum*, различающиеся по экспрессии гена *SnTox*: SnБ (Tox3⁺) и Sn4ВД (Tox3⁻), и два сорта мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), контрастные по устойчивости к возбудителю септориоза и различающиеся по аллельному составу локуса восприимчивости *Snn3-B1*: Казахстанская 10 (восприимчивая) и Омская 35 (устойчивая). Проведена сравнительная оценка характера транскрипционной активности генов биосинтеза (*TaACS1*, *TaACO*) и сигнального пути этилена (*TaEIL1*, *TaERF1*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени и оценен редокс-статус растений пшеницы, инфицированных различными изолятами *S. nodorum* с помощью спектрофотометрических методов. Показано, что индукция биосинтеза и сигнального пути этилена происходила в результате взаимодействия по типу ген-на-ген *Snn3-B1*-SnTox3. Результаты оценки редокс-статуса растений показали, что этилен подавлял накопление пероксида водорода в чувствительных к SnTox3 генотипах за счет регуляции работы различных ферментов про-/антиоксидантной системы на транскрипционном и посттрансляционном уровнях. Таким образом, полученные результаты предполагают, что НЭ SnTox3 влиял на биосинтез и сигнальный путь этилена с целью регуляции редокс-метаболизма инфицированных растений пшеницы для успешной колонизации хозяина на начальных этапах инфицирования, что впоследствии приводило к обширным зонам поражения за счет быстрого размножения патогена. Ключевые слова: *Stagonospora nodorum*; *Triticum aestivum*; полимеразная цепная реакция; полимеразная цепная реакция в реальном времени; некротрофный эффектор; этилен; редокс-метаболизм; взаимодействие ген-на-ген; неспецифическая устойчивость.

Для цитирования: Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Нужная Т.В., Румянцев С.Д., Максимов И.В. Влияние хозяин-специфичного токсина SnTOX3 патогена *Stagonospora nodorum* на сигнальный путь этилена и редокс-статус растений мягкой яровой пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(7):856-864. DOI 10.18699/VJ19.559

Effect of the host-specific toxin SnTOX3 from *Stagonospora nodorum* on ethylene signaling pathway regulation and redox-state in common wheat

S.V. Veselova , G.F. Burkhanova, T.V. Nuzhnaya, S.D. Rumyantsev, I.V. Maksimov

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre, RAS, Ufa, Russia

 e-mail: veselova75@rambler.ru

The fungus *Stagonospora nodorum* is the causative agent of Septoria nodorum blotch (SNB) of wheat. The most important factors of *Stagonospora nodorum* virulence include numerous fungal necrotrophic effectors (NEs) encoded by *SnTox* genes. They interact with the matching products of host susceptibility genes (*Snn*). SnTox-Snn interactions are mirror images of classical gene-for-gene interactions and lead to the development of disease. We have studied the SnTox3-Snn3 interaction, resulting in the development of infection on leaves and formation of extensive lesions. The mechanism of SnTox3 action is likely to be linked to the regulation of redox metabolism and the influence on ethylene synthesis in the wheat plants, although the molecular mechanisms are not fully unveiled. To characterize the SnTox3-Snn3 interaction, we used *S. nodorum* isolates differing in the expression of the NEs genes *SnTox3* (SnB

(Tox3⁺, Sn4VD (Tox3⁻)) and two soft spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars, contrasting in resistance to the SNB agent and differing in the allelic composition of the susceptibility locus *Snn3-B1*: Kazakhstanskaya 10 (susceptible) and Omskaya 35 (resistant). We carried out a comparative assessment of the transcriptional activity patterns of genes responsible for ethylene biosynthesis (*TaACS1*, *TaACO*) and signaling pathway (*TaEIL1*, *TaERF1*) by real-time PCR and estimated the redox state of wheat plants infected with different isolates of *S. nodorum* by spectrometry. The induction of ethylene biosynthesis and signaling has been shown to result from gene-for-gene interaction between *Snn3-B1* and SnTox3. The results of plant redox status estimation showed that ethylene inhibited accumulation of hydrogen peroxide in SnTox3-sensitive genotypes by regulating the operation of various pro-/antioxidant enzymes at the transcriptional and posttranslational levels. Our results suggest that NE SnTox3 influences ethylene biosynthesis and signaling, thereby regulating redox metabolism in infected wheat plants as necessary for successful host colonization at the initial phases of infection, which ultimately leads to extensive lesions due to fast pathogen reproduction. Key words: *Stagonospora nodorum*; *Triticum aestivum*; polymerase chain reaction; real-time polymerase chain reaction; necrotrophic effectors; ethylene; redox-metabolism; gene-for-gene interaction; nonspecific resistance.

For citation: Veselova S.V., Burkhanova G.F., Nuzhnaya T.V., Rummyantsev S.D., Maksimov I.V. Effect of the host-specific toxin SnTOX3 from *Stagonospora nodorum* on ethylene signaling pathway regulation and redox-state in common wheat. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(7):856-864. DOI 10.18699/VJ19.559 (in Russian)

Введение

Главная сельскохозяйственная культура – пшеница – в последние десятилетия стала подвергаться поражению возбудителями различного рода листовых пятнистостей, среди которых одно из первых мест занимают возбудители септориоза. *Stagonospora nodorum* Berk., возбудитель септориоза пшеницы, наносит значительный ущерб растениям и приводит к потерям урожая, которые могут достигать 30 % (Bertucci et al., 2014). Исследования септориоза интенсивно ведутся последние три десятилетия, но до сих пор нет четкого понимания механизмов, лежащих в основе устойчивости/восприимчивости пшеницы к инфекции, с одной стороны, и вирулентности патогена, с другой (Fraaije et al., 2002; Bertucci et al., 2014; Winterberg et al., 2014; Phan et al., 2016; Shi et al., 2016).

Недавно было показано, что важнейший фактор вирулентности *S. nodorum* – многочисленные некротрофные эффекторы (НЭ) гриба или токсины, специфические для хозяев (host-specific toxins) (Phan et al., 2016; McDonald, Solomon, 2018). Взаимодействие в патосистеме пшеница–*S. nodorum* осуществляется по типу ген-на-ген (McDonald, Solomon, 2018). Эти взаимоотношения выражаются в том, что продукты генов вирулентности патогена (=хозяин-специфичные токсины) (SnTox) при взаимодействии с продуктами генов восприимчивости растения-хозяина (*Snn*) вызывают совместимость, т.е. развитие болезни (Phan et al., 2016). Эффект каждого взаимодействия SnTox-*Snn* является неполным и дополняется другими взаимодействиями. В настоящее время описано восемь взаимодействий SnTox-*Snn*, при этом у патогена клонировано только три гена, кодирующих НЭ (SnToxA, SnTox1, SnTox3), а у пшеницы клонировано только два гена восприимчивости (*Tsn1*, *Snn1*) (Phan et al., 2016; Shi et al., 2016).

Генетика взаимоотношений пшеницы и *S. nodorum* очень сложная, расо-специфичная устойчивость объясняет только около 40 % фенотипических проявлений (Shi et al., 2016). Кроме того, относительно недавно, в последние четыре года, было показано, что некоторые из охарактеризованных взаимодействий SnTox-*Snn*, вызывающие восприимчивость, направлены на манипулирование неспецифическими путями защиты растения, связан-

ными с редокс-метаболизмом, вторичным метаболизмом и защитными белками (Winterberg et al., 2014; Phan et al., 2016; Shi et al., 2016).

Взаимодействие *Snn3-B1*-SnTox3 играет значительную роль в развитии септориоза (Shi et al., 2016; McDonald, Solomon, 2018). Предполагается, что в результате этого взаимодействия развивается инфекция на листьях с образованием обширных зон поражения, что связано с влиянием SnTox3 на генерацию активных форм кислорода (АФК), к сожалению, механизм действия эффектора неизвестен (Winterberg et al., 2014). Однако недавно было показано, что SnTox3 индуцирует накопление метионина и синтез этилена у растений пшеницы уже через 24 ч после инфицирования (Winterberg et al., 2014).

Известно, что одна из наиболее ранних ответных реакций растений на внедрение патогена – локальная генерация АФК, играющая важную роль в развитии системной устойчивости (Barna et al., 2012). В настоящее время механизмы регуляции синтеза апопластных АФК в иммунном ответе интенсивно изучаются, но до конца не раскрыты. Недавние исследования показали, что про-/антиоксидантный статус растений находится под строгим контролем фитогормонов, участвующих в формировании защитных реакций при стрессе (Barna et al., 2012). Среди них этилен, роль которого при биотическом стрессе неоднозначна и зависит от типа патогена и вида растения (Vleesschaever et al., 2010; Barna et al., 2012). Ранее нами была показана отрицательная роль этилена в развитии устойчивости растений пшеницы к *S. nodorum* (Веселова и др., 2016). К сожалению, механизмы воздействия фитогормонов, в том числе и этилена, на процессы генерации АФК при биотическом стрессе изучены недостаточно (Barna et al., 2012).

Целью нашей работы была сравнительная оценка характера транскрипционной активности генов биосинтеза и сигнального пути этилена и редокс-статуса растений пшеницы, инфицированных изолятами *S. nodorum*, отличающимися по экспрессии НЭ SnTox3.

Материалы и методы

Объектом исследования служили два сорта мягкой яровой пшеницы *Triticum aestivum* L., контрастные по устойчиво-

сти к *S. nodorum* Berk.: Казахстанская 10 (Каз10) (восприимчивый) и Омская 35 (Ом35) (устойчивый), а также два изолята гриба *S. nodorum*: Sn4ВД (Республика Беларусь) и SnБ (Республика Башкортостан). Грибы культивировали на картофельно-глюкозном агаре. Растения выращивали на водной культуре (10 % раствор питательной среды Хогланда–Арнона) в климатостате КС-200 СПУ (Россия) с условиями культивирования: температура 20/24 °С (ночь/день), 16 ч светопериод, интенсивность света 146 Вт/м² ФАР (лампы Osram L 36W/77) в течение 7 сут. Проростковую устойчивость сортов оценивали методом газончиков, как описано ранее (Веселова и др., 2016). Устойчивость/восприимчивость сорта определяли по площади поражения листа через семь дней после инокуляции изолятами *S. nodorum*. Развитие симптомов септориоза на листьях пшеницы фиксировали посредством фотоаппарата SP-800UZ Image Stabilization (Olympus, Индонезия), площадь зоны поражения измеряли с помощью компьютерной программы ImageJ (rsbweb.nih.gov/ij/download.html) и выражали в процентах от общей площади листа. Кроме того, оценку степени поражения проводили по международной шкале, которая также предусматривает учет степени пораженности различных органов растений: RR (0–5 %) – сорта с очень высокой и высокой устойчивостью; R (до 10–15 %) – устойчивые сорта; M (до 25 %) – слабовосприимчивые сорта; S (до 40–65 %) – восприимчивые сорта; SS (до 90–100 %) – сорта с очень высокой и высокой восприимчивостью.

Выделение ДНК из проростков пшеницы и семидневной культуры гриба выполняли с помощью фенольного детергентного метода (Маниатис и др., 1984). Идентификацию гена *SnTox3* (FJ823644) у изолятов *S. nodorum* осуществляли посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с геноспецифичными праймерами (5'→3'): F–CGAGCTGATATCCCGTTTGA; R–GGGACAGTGACAATAGGTAAGG (Winterberg et al., 2014), в качестве внутреннего контроля на присутствие грибной ДНК были праймеры на ген «домашнего хозяйства» тубулин (S56922) (Fraaije et al., 2002). Экспрессию гена *SnTox3* у разных изолятов *S. nodorum* во время инокуляции растений пшеницы анализировали с теми же праймерами методом полуколичественной ПЦР. Тотальную РНК из инфицированных изолятами *S. nodorum* растений пшеницы восприимчивого сорта Каз10 и устойчивого сорта Ом35, зафиксированных в жидком азоте, выделяли с использованием реагента Trizol, согласно протоколу фирмы-поставщика (Sigma, Германия). Для получения кДНК на основе РНК изучаемых образцов проводили реакцию обратной транскрипции с использованием обратной транскриптазы, согласно протоколу фирмы-поставщика (Синтол, Россия). На основе кДНК осуществляли ПЦР в амплификаторе типа ТП4-ПЦР-01-Терцик (ДНК-Технология, Россия).

Аллельное состояние локуса *Snn3-B1* определяли в сортах методом ПЦР с праймерами к микросателлитным маркерам *Xcfd20* и *Xgwm234* (Bertucci et al., 2014). Состав праймеров *Xcfd20* (5'→3'): F–TGATGGGAAGGTAATGGGAG; R–ATCCAGTTCTCGTCCAAAGC; состав праймеров *Xgwm234* (5'→3'): F–GAGTCCTGATGTGAAGCTGTTG; R–СТСАТТGGGGTGTGTACGTG (Bertucci et al., 2014). Продукты ПЦР во всех случаях разделяли в 7 % ПААГ,

окрашенном бромистым этидием, с использованием маркерной ДНК Gene Ruler DNA Ladder (Fermentas). Гели фотографировали с помощью документирующей системы GelDoc XR (Bio-Rad).

Для выявления влияния *SnTox3* на биосинтез и сигнальный путь этилена часть проростков пшеницы за 24 ч до инокуляции различными изолятами *S. nodorum* обрабатывали 1.5 мМ раствором этефона – ЭТ, 2-хлорэтилфосфоновой кислотой, химическим предшественником этилена (Sigma, Германия) (Веселова и др., 2016), а часть – 50 мкМ раствором аминоксиквонил глицина – ингибитора синтеза этилена (АВГ) (Sigma). После обработки сосуды закрывали и помещали в темноту. Содержание перекиси водорода (H₂O₂) и активности ферментов пероксидазы (ПО), оксалакксидазы (ОО) и каталазы (КАТ) через 24 и 72 ч после инфицирования изолятами *S. nodorum* измеряли, как описано ранее (Веселова и др., 2018).

Выделение тотальной РНК из контрольных и опытных листьев пшеницы, зафиксированных в жидком азоте, через 24 ч после инфицирования *S. nodorum* проводили с помощью реагента Trizol, согласно протоколу фирмы-поставщика (Sigma, Германия). Экспрессию генов оксидоредуктаз и генов биосинтеза и сигнального пути этилена анализировали методом количественной ПЦР в режиме реального времени на приборе iCycler iQ5 Real-Time PCR Detection System (BioRad, США) с применением интеркалирующего красителя SYBR Green I (Синтол, Россия). Для нормирования результатов экспрессии исследуемых генов использовали праймеры к гену конститутивно экспрессирующегося белка ингибитора РНКаз (RNase L inhibitor-like) *RLI* (AY059462) (Gimenez et al., 2011). Изменения в экспрессии интересующего гена определяли по вычислению уровня нормализованной экспрессии генов с помощью программного обеспечения iCycler iQ5 Real-Time Detection System Software (BioRad, США). ПЦР в режиме реального времени проводили с помощью праймеров к генам, кодирующим НАДФН-оксидазу (*TaRboh*, AY561153) (Giovannini et al., 2006), супероксид-дисмутазу (СОД) (*TaSod*, JX398977.1) (Giovannini et al., 2006), анионную пероксидазу (*TaPrx*, TC151917) (Максимов и др., 2014), аминоклопропанкарбоксилатсинтазу (АЦК-синтазу – *TaACS1*, U35779) (Subramaniam et al., 1996), аминоклопропанкарбоксилатоксидазу (АЦК-оксидазу – *TaACO*, KF900072) состав праймеров (5'→3'): F–TGTCATCGCCTCCTTCTA; R–CGAACA CGAACCTTGGGTAT; транскрипционный фактор этиленового сигнального пути EIN3-LIKE1 (ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 (EIL1) – *TaEIL1*, KU030837, ортолог гена арабидопсиса *AtEIN3*) (Liu et al., 2016) и транскрипционный фактор первичного ответа на этилен ERF1 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 – *TaERF1*, EF583940) (Dong et al., 2010).

Все эксперименты повторяли три раза и выполняли в трех биологических и трех аналитических повторностях (общее $n = 9$). Средние арифметические значения и их доверительные интервалы, рассчитанные по стандартным ошибкам, приведены на рис. 1–3 и в табл. 1–3. Достоверность различий между вариантами опыта оценивали по t -критерию Стьюдента при доверительном уровне $p \leq 0.05$.

Результаты

Ген *SnTox3* и локус восприимчивости *Snn3-B1*. Два изолята *S. nodorum* тестировали на наличие/отсутствие гена *SnTox3* методом ПЦР. Ген *SnTox3* обнаружен у обоих изолятов, SnБ и Sn4ВД (рис. 1, а).

Анализ транскрипционной активности этого гена НЭ показал отсутствие экспрессии у авирулентного изолята Sn4ВД и накопление транскриптов гена *SnTox3* после инокуляции как восприимчивого сорта Каз10, так и устойчивого сорта Ом35 вирулентным изолятом SnБ (см. рис. 1, б). Проведена ПЦР-диагностика аллельного состояния локуса *Snn3-B1* у двух сортов мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.): Каз10 и Ом35. Для этого были использованы специфичные праймеры к двум микросателлитным маркерам, *Xcfd20* и *Xgwm234*, фланкирующим локус *Snn3-B1* (Bertucci et al., 2014; Shi et al., 2016). Нуль-аллель у этих сортов не обнаружен. Однако сорта различались по аллельному составу *Snn3-B1* локуса (см. рис. 1, в). Так, маркер *Xcfd20* был представлен двумя аллелями у обоих сортов, а маркер *Xgwm234* у устойчивого сорта Ом35 – одним аллелем, а у восприимчивого сорта Каз10 – двумя аллелями (см. рис. 1, в).

Комбинации сорт/изолят. Ранее было показано, что из нескольких сортов мягкой яровой пшеницы наибольшую устойчивость к гембиотрофному грибу *S. nodorum* имела пшеница сорта Омская 35, а наименьшую – пшеница сорта Казахстанская 10 (Веселова и др., 2016). Эти работы выполнены с применением изолята SnБ. Были изучены следующие комбинации сорт/изолят: Каз10/SnБ (S/Tox3⁺), Каз10/Sn4ВД (S/Tox3⁻), Ом35/SnБ (I/Tox3⁺), Ом35/Sn4ВД (I/Tox3⁻), где S – чувствительный к Tox3 сорт, I – нечувствительный к Tox3 сорт, Tox3⁺ – изолят, экспрессирующий ген токсина, Tox3⁻ – изолят, не экспрессирующий ген токсина.

В комбинации сорт/изолят S/Tox3⁺ (Каз10/SnБ) проявлялась полная реакция совместимости, инфицирование патогеном приводило к образованию больших зон поражения, до 80 % от общей площади листа (табл. 3). В остальных комбинациях сорт/изолят (Ом35/SnБ, Каз10/Sn4ВД, Ом35/Sn4ВД) была реакция устойчивости (см. табл. 1). Предварительная обработка ЭТ растений, как чувствительных к Tox3 (Каз10), так и не чувствительных к Tox3 (Ом35), увеличивала их восприимчивость только

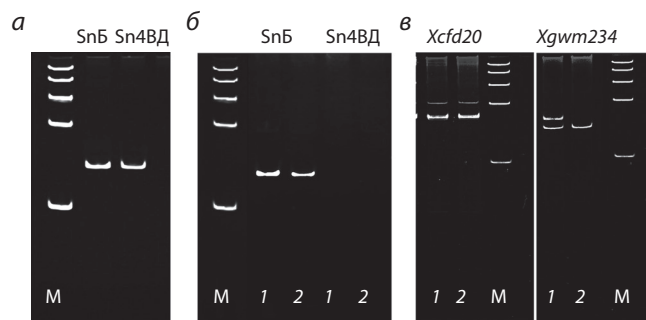


Рис. 1. Идентификация гена *SnTox3* у двух изолятов *S. nodorum*: SnБ и Sn4ВД (а); анализ транскрипционной активности гена *SnTox3* при инфицировании двух сортов мягкой яровой пшеницы (б), идентификация аллелей локуса *Snn3-B1* у этих сортов с помощью праймеров к SSR-маркерам (*Xcfd20* и *Xgwm234*) методом ПЦР (в).

1 – Казахстанская 10; 2 – Омская 35. М – ДНК-маркеры, 100–1000 п.н.

к изоляту SnБ (Tox3⁺) и не влияла на восприимчивость к изоляту Sn4ВД (Tox3⁻) (см. табл. 1). Предварительная обработка растений, не чувствительных к Tox3 (Ом35), АВГ, не воздействовала на их реакцию устойчивости, независимо от изолята, которым инокулировали растения: SnБ (Tox3⁺) или Sn4ВД (Tox3⁻) (см. табл. 1). Обработка чувствительных к Tox3 (Каз10) растений ингибитором синтеза этилена АВГ увеличивала их устойчивость к изоляту SnБ и не изменяла устойчивость к изоляту Sn4ВД (см. табл. 1).

Биосинтез и сигнальный путь этилена в инфицированных растениях. Анализ транскрипционной активности генов биосинтеза (АЦК-синтазы – *TaACS* и АЦК-оксидазы – *TaACO*) и сигнального пути этилена (*TaEIL1*, *TaERF1*) показал повышение содержания мРНК этих генов в реакции совместимости, развивавшейся у восприимчивых растений (Каз10/SnБ) и растений, обработанных ЭТ (Каз10/SnБ+ЭТ, Ом35/SnБ+ЭТ) (табл. 2). У чувствительных к Tox3 растений (Каз10) содержание транскриптов генов биосинтеза этилена и гена транскрипционного фактора первичного ответа на этилен *TaERF1* повышалось примерно в 3–4 раза, а содержание транскриптов гена главного регуляторного фактора этиленового сигнального пути *TaEIL1* – в 14–18 раз через 24 ч после инфицирования

Таблица 1. Реакция на инокуляцию изолятами *S. nodorum* SnБ (Tox3⁺) и Sn4ВД (Tox3⁻) двух сортов пшеницы с различным аллельным состоянием локуса *Snn3-B1*

Казахстанская 10			Омская 35		
Сорт/изолят	Зона поражения, %	Группа*	Сорт/изолят	Зона поражения, %	Группа*
Каз10/SnБ	80.0 ± 3.0	SS	Ом35/SnБ	10.9 ± 2.5	R
Каз10/SnБ+ЭТ**	94.9 ± 2.3	SS	Ом35/SnБ+ЭТ	57.2 ± 2.6	S
Каз10/SnБ+АВГ**	18.6 ± 2.2	M	Ом35/SnБ+АВГ	9.1 ± 1.9	R
Каз10/Sn4ВД	8.4 ± 2.2	R	Ом35/Sn4ВД	1.6 ± 0.5	RR
Каз10/Sn4ВД+ЭТ	8.1 ± 1.8	R	Ом35/Sn4ВД+ЭТ	1.9 ± 1.1	RR
Каз10/Sn4ВД+АВГ	6.5 ± 2.6	R	Ом35/Sn4ВД+АВГ	1.6 ± 0.5	RR

* RR (0–5 %) – сорта с очень высокой и высокой устойчивостью; R (до 10–15 %) – устойчивые сорта; M (до 25 %) – слабовосприимчивые сорта; S (до 40–65 %) – восприимчивые сорта; SS (до 90–100 %) – сорта с очень высокой и высокой восприимчивостью.

** За 24 ч до инокуляции *S. nodorum* растения пшеницы были обработаны или этефоном (ЭТ), или ингибитором синтеза этилена (АВГ).

Таблица 2. Результаты транскрипционного анализа генов биосинтеза и сигнального пути этилена у двух контрастных по устойчивости сортов пшеницы, Казахстанская 10 и Омская 35, через 24 ч после инфицирования изолятами *S. nodorum*

Вариант обработки	Ген			
	<i>TaACS</i>	<i>TaACO</i>	<i>TaEIL1</i>	<i>TaERF1</i>
Казахстанская 10				
Каз10	100	100	100	100
Каз10/SnБ	311 ± 60	237 ± 30	1400 ± 200	356 ± 70
Каз10/SnБ + АВГ	143 ± 23	77 ± 3	389 ± 0	100 ± 20
Каз10/SnБ + ЭТ	350 ± 34	223 ± 10	1810 ± 270	450 ± 34
Каз10/Sn4ВД	128 ± 28	110 ± 10	322 ± 10	102 ± 10
Каз10/Sn4ВД + АВГ	117 ± 9	63 ± 15	390 ± 60	146 ± 10
Каз10/Sn4ВД + ЭТ	121 ± 10	65 ± 6	375 ± 20	107 ± 7
Омская 35				
Ом35	100	100	100	100
Ом35/SnБ	86 ± 10	47 ± 10	77 ± 6	92 ± 10
Ом35/SnБ + ЭТ	169 ± 8	190 ± 15	325 ± 54	262 ± 35
Ом35/SnБ + АВГ	102 ± 20	54 ± 10	115 ± 20	178 ± 40
Ом35/Sn4ВД	97 ± 10	143 ± 10	133 ± 20	54 ± 2
Ом35/Sn4ВД + ЭТ	125 ± 6	95 ± 7	156 ± 10	199 ± 2
Ом35/Sn4ВД + АВГ	108 ± 20	206 ± 20	129 ± 20	134 ± 5

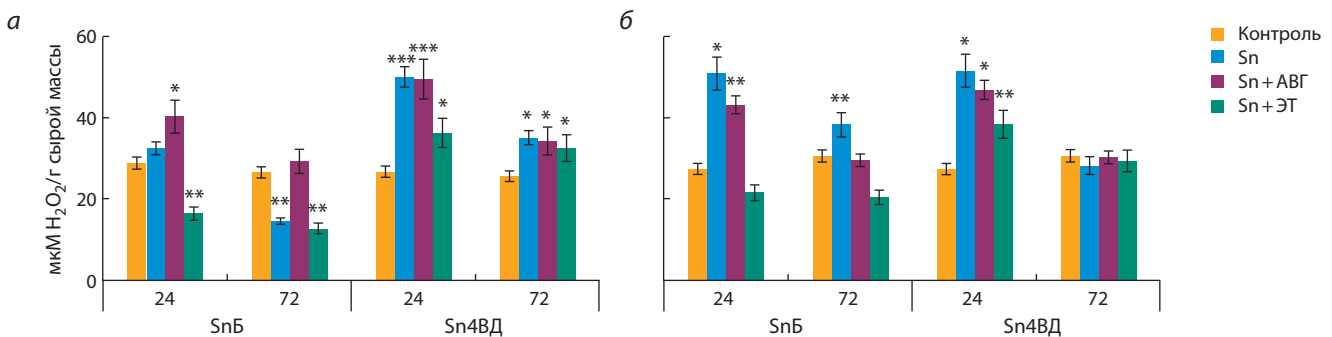


Рис. 2. Содержание перекиси водорода в листьях двух сортов, Казахстанская 10 (а) и Омская 35 (б), через 24 и 72 ч после инокуляции изолятами *S. nodorum* SnБ (Tox3⁺) и Sn4ВД (Tox3⁻).

Контроль – неинфицированные растения; Sn – инфицирование изолятами *S. nodorum*; Sn + АВГ – инфицирование + обработка АВГ; Sn + ЭТ – инфицирование + обработка ЭТ. Звездочки показывают статистически достоверные отличия от контрольной группы, разное количество звездочек – статистически достоверные различия между вариантами при $p \leq 0.05$.

(см. табл. 2). Однако у нечувствительных к Tox3 растений в комбинации сорт/изолят Ом35/SnБ+ЭТ накопление мРНК генов биосинтеза и сигнального пути этилена было ниже, чем в остальных комбинациях сорт/изолят, приводивших к реакции совместимости (см. табл. 2).

При развитии реакции несовместимости у нечувствительных к Tox3 растений в комбинациях сорт/изолят Ом35/SnБ, Ом35/Sn4ВД, независимо от обработок ЭТ и АВГ, обнаружено подавление или отсутствие накопления транскриптов генов биосинтеза и сигнального пути этилена (см. табл. 2). У чувствительных к Tox3 растений при развитии реакции несовместимости как при инокуляции изолятом Sn4ВД (Tox3⁻) (Каз10/Sn4ВД, Каз10/Sn4ВД+АВГ, Каз10/Sn4ВД+ЭТ), так и при инокуляции изолятом SnБ (Tox3⁺) (Каз10/SnБ+АВГ) обнаружено

отсутствие накопления мРНК генов *ACS*, *ACO*, *ERF1* и небольшое накопление мРНК гена *TaEIL1* по сравнению с контрольными растениями (см. табл. 2).

Редокс-статус инфицированных растений. С целью определения роли SnTox3 в регуляции редокс-метаболизма растения-хозяина с помощью влияния на биосинтез и сигнальный путь этилена при подавлении защитных реакций в инфицированных растениях были изучены компоненты про-/антиоксидантной системы. Реакция совместимости как у восприимчивых растений (Каз10/SnБ), так и у растений, обработанных ЭТ (Каз10/SnБ+ЭТ, Ом35/SnБ+ЭТ), характеризовалась снижением содержания H₂O₂ (рис. 2, а, б) за счет повышения активности каталазы (КАТ) (рис. 3, д, е), снижения активности ПО (см. рис. 3, а, б) и ОО (см. рис. 3, в, з) и отсутствия на-

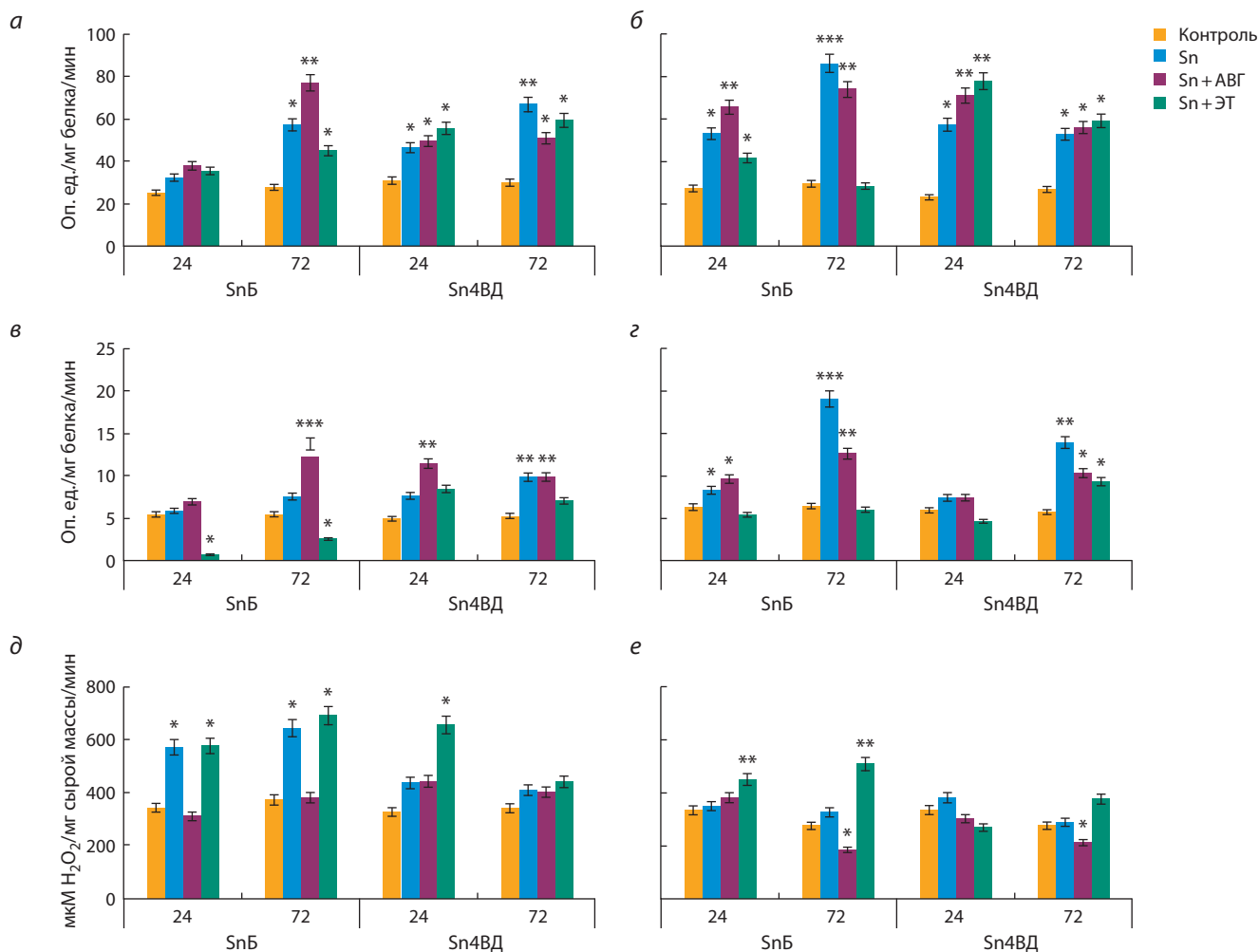


Рис. 3. Активность пероксидазы (а, б); оксалатоксидазы (в, з) и каталазы (д, е) в листьях двух сортов, Казахстанская 10 (а, в, д) и Омская 35 (б, з, е), через 24 и 72 ч после инокуляции изолятами *S. nodorum* SnБ (Tox3⁺) и Sn4ВД (Tox3⁻).

Обозначения см. на рис. 2.

Таблица 3. Результаты транскрипционного анализа генов оксидоредуктаз у двух контрастных по устойчивости сортов пшеницы, Казахстанская 10 и Омская 35, через 24 ч после инфицирования изолятами *S. nodorum*

Вариант обработки*	Изолят патогена					
	SnБ (Tox3 ⁺)			Sn4ВД (Tox3 ⁻)		
	Ген					
	<i>TaRboh</i>	<i>TaSod</i>	<i>TaPrx</i>	<i>TaRboh</i>	<i>TaSod</i>	<i>TaPrx</i>
Казахстанская 10						
Контроль	100	100	100	100	100	100
Sn	78 ± 3	88 ± 10	71 ± 3	160 ± 21	144 ± 8	223 ± 20
Sn + АВГ	111 ± 20	169 ± 20	163 ± 30	145 ± 40	110 ± 3	210 ± 50
Sn + ЭТ	15 ± 1	81 ± 7	104 ± 20	152 ± 37	114 ± 2	251 ± 50
Омская 35						
Контроль	100	100	100	100	100	100
Sn	126 ± 10	264 ± 20	365 ± 26	160 ± 20	196 ± 9	264 ± 20
Sn + АВГ	136 ± 20	242 ± 40	311 ± 31	129 ± 10	178 ± 18	170 ± 20
Sn + ЭТ	83 ± 10	118 ± 9	136 ± 15	132 ± 30	159 ± 10	181 ± 34

* Обозначения вариантов обработок см. на рис. 2.

копления транскриптов генов, кодирующих оксидоредуктазы НАДФН-оксидазу (*TaRbohF*), СОД (*TaSod*) и ПО (*TaPrx*) (табл. 3). Однако у нечувствительных к Tox3 растений в комбинации сорт/изолят Ом35/SnБ+ЭТ реакция подавления окислительного взрыва была выражена слабее, чем в остальных комбинациях, приводивших к совместимости (см. рис. 2, 3, табл. 3).

Для реакции несовместимости в комбинациях сорт/изолят Ом35/SnБ, Ом35/Sn4ВД, Каз10/Sn4ВД, а также растений, обработанных АВГ, во всех комбинациях было характерно повышение генерации H_2O_2 (см. рис. 2, а, б) за счет снижения или отсутствия повышения активности КАТ, а также резкого увеличения активности ПО и ОО (см. рис. 3) и накопления транскриптов генов *TaRbohF*, *TaSod* и *TaPrx* на раннем этапе инфицирования (24 ч) (см. табл. 3), что приводило к развитию СВЧ-реакции и остановке роста патогена (см. табл. 1). Обработка ЭТ не влияла на характер ответной реакции как чувствительных, так и нечувствительных к Tox3 растений, инокулированных изолятом Sn4ВД (Tox3⁻) (см. рис. 2, 3, табл. 3).

Обсуждение

В настоящее время установлено, что грибок *S. nodorum* продуцирует восемь НЭ, отвечающих за вирулентность изолятов патогена (Phan et al., 2016; Shi et al., 2016). Токсины SnToxA, SnTox1, SnTox3 считаются основными НЭ, в большей степени определяющими вирулентность штаммов и изолятов патогена, что было показано в работах с мутантными штаммами *S. nodorum* и различными линиями пшеницы, чувствительными и не чувствительными к данным эффекторам (Phan et al., 2016; Shi et al., 2016).

В нашей работе у вирулентного изолята SnБ выявлена высокая транскрипционная активность гена *SnTox3* (см. рис. 1, б). У авирулентного изолята Sn4ВД обнаружено отсутствие экспрессии этого гена (см. рис. 1, б), что указывает на инактивацию НЭ SnTox3 у данного изолята (Tan, Oliver, 2017). Изучено два контрастных по устойчивости к *S. nodorum* сорта мягкой яровой пшеницы, отличавшихся аллельным составом *Snn3-B1* локуса (см. рис. 1, в), что может свидетельствовать об их чувствительности и нечувствительности к НЭ SnTox3 (Shi et al., 2016). В работе G. Shi с коллегами (2016) две линии пшеницы, BG220 и Sumai3, несущие различные аллели локуса *Snn3-B1*, показали различную степень чувствительности к НЭ SnTox3). Несмотря на то, что у сорта Ом35 нуль-аллель к *Snn3-B1* не был обнаружен, сорт был нечувствителен или слабочувствителен к SnTox3. Это может говорить о наличии большой делеции в локусе между маркерами *Xcfd20* и *Xgwm234*, что совпадает с литературными данными (Shi et al., 2016). Так, из 17 мутантов Sumai3, не чувствительных к SnTox3, только у 5 был обнаружен нуль-аллель *Snn3-B1*: у двух линий по трем микросателлитным маркерам: *Xgwm234*, *Xmag705* и *Xcfb306*, у трех линий по одному – *Xcfb306* (Shi et al., 2016). Таким образом, при использовании двух изолятов, *S. nodorum* SnБ (Tox3⁺) и Sn4ВД (Tox3⁻), и двух сортов мягкой яровой пшеницы с разными генотипами были подобраны четыре различные комбинации сорт/изолят для изучения роли SnTox3 в развитии инфекции.

С одной стороны, основной функцией НЭ SnTox3 считается образование зон поражения на листьях чувствительных генотипов пшеницы с помощью «захвата» неспецифических сигнальных путей защиты хозяина и манипулирования ими для своего роста и развития (Winterberg et al., 2014). С другой стороны, показано, что SnTox3 увеличивает синтез этилена в инфицированных растениях (Winterberg et al., 2014).

Для выявления роли SnTox3 в регуляции биосинтеза и сигнального пути этилена часть растений пшеницы двух сортов – Каз10 и Ом35 – была обработана химическим предшественником этилена ЭТ и ингибитором биосинтеза этилена АВГ. Наши результаты показали, что увеличение восприимчивости растений пшеницы к *S. nodorum* после обработки ЭТ и повышение устойчивости после обработки АВГ зависели от генотипа изолята патогена SnБ (Tox3⁺) или Sn4ВД (Tox3⁻) (см. табл. 1). Это предполагает, что НЭ SnTox3, действуя как фактор вирулентности, влиял на защитную систему растений посредством регуляции биосинтеза и сигнального пути этилена. Синтез этилена некоторыми патогенами тесно связан с их вирулентностью (Ma K.-W., Ma W., 2016). Например, эффектор патогенной бактерии *Xanthomonas euvesicatoria* XopD манипулирует этиленовым сигнальным путем, влияя на транскрипционный фактор ERF4 (Ma K.-W., Ma W., 2016), а некротрофный грибок *Cochliobolus miyabeanus* индуцирует сигнальный путь этилена в рисе, продуцируя и секретируя этилен как эффектор для ускорения инфекционного процесса (Shen et al., 2018).

Анализ транскрипционной активности генов биосинтеза и сигнального пути этилена в нашей работе также показал зависимость активации генов этого пути в инфицированных растениях от генотипа изолята патогена и чувствительности генотипа пшеницы к НЭ SnTox3 (см. табл. 2). Эти результаты предполагают, что индукция биосинтеза и сигнального пути этилена происходит в результате взаимодействия по типу ген-на-ген *Snn3-B1*-SnTox3.

Интересно, что у нечувствительных к SnTox3 растений в комбинации сорт/изолят Ом35/SnБ+ЭТ обработка ЭТ увеличивала чувствительность растений к этому НЭ (см. табл. 3). Такая реакция могла быть результатом мутации в генах, регулируемых взаимодействием *Snn3-B1*-SnTox3 (Shi et al., 2016). Однако активация генов биосинтеза и сигнального пути этилена в комбинации Ом35/SnБ+ЭТ была слабее, чем при совместимом взаимодействии чувствительных к SnTox3 растений (Каз10/SnБ, Каз10/SnБ+ЭТ) (см. табл. 2). Это предполагает, что у устойчивых растений имеется механизм активного подавления биосинтеза и сигнального пути этилена для индукции защитных реакций, которые ингибируют этилен. Например, этилен ингибировал биосинтез салициловой кислоты (СК) и подавлял экспрессию маркерных генов СК-сигнального пути, *PR-1* и *PR-2*, в растениях арабидопсиса, инфицированных *Pseudomonas syringae* (Chen et al., 2009), так же, как в растениях пшеницы, инфицированных *S. nodorum* (Веселова и др., 2016). А кремний блокировал продукцию этилена патогеном *C. miyabeanus*, что приводило к повышению устойчивости растений риса (Shen et al., 2018). Таким образом, полученные результаты доказывают влияние SnTox3 на биосинтез и сигнальный путь этилена

при взаимодействии по типу ген-на-ген *Snn3-B1-SnTox3* с целью подавления защитных реакций и успешной колонизации растений пшеницы.

Ранее были сообщения, что этилен обеспечивал благоприятные условия для проникновения и развития *S. nodorum* в тканях растений пшеницы на начальном этапе инфицирования за счет регуляции редокс-метаболизма и снижения генерации H₂O₂ (Веселова и др., 2016, 2018). Напротив, накопление АФК в растениях пшеницы на начальной стадии инфицирования патогеном *S. nodorum* определяло устойчивость сорта, индуцируя экспрессию генов защитных белков (Веселова и др., 2016, 2018). Изменение редокс-статуса инфицированных растений пшеницы в наших экспериментах полностью зависело от активации или ингибирования биосинтеза и сигнального пути этилена, причем это влияние было обусловлено взаимодействием ген-на-ген *Snn3-B1-SnTox3* (см. рис. 2, 3). Наши результаты показали, что этилен подавлял накопление H₂O₂ в чувствительных к SnTox3 растениях за счет повышения активности КАТ, снижения активности ПО и ОО и уменьшения содержания транскриптов генов, кодирующих оксидоредуктазы, НАДФН-оксидазу и СОД, что совпадает с данными литературы (Golemić et al., 2014; Ma et al., 2017) и результатами, полученными нами ранее (Веселова и др., 2018).

Показано, что НЭ SnTox3 регулирует гены, связанные с редокс-метаболизмом, и принимает участие в образовании некрозов (Winterberg et al., 2014), однако вопрос о механизмах влияния SnTox3 на генерацию АФК остается открытым для изучения. Из литературы известно, что специфические эффекторы патогенов могут индуцировать СВЧ-реакцию в клетках растений, а также подавлять окислительный взрыв растений различными способами во время инфекционного процесса (Jwa, Hwang, 2017). Например, два цитоплазматических эффектора *Phytophthora sojae* взаимодействуют с каталазами для регуляции концентрации H₂O₂. Эффектор *U. maydis* Pep1 связывается с пероксидазой кукурузы POX12 *in vivo* и подавляет ранние иммунные ответы кукурузы (Hemetsberger et al., 2012).

Заключение

Результаты нашей работы предполагают, что эффектор патогена SnTox3 влияет на биосинтез и сигнальный путь этилена с целью регуляции редокс-метаболизма инфицированных растений пшеницы для успешной колонизации хозяина на начальных этапах инфицирования, что впоследствии приводит к обширным зонам поражения за счет быстрого размножения патогена.

Список литературы / References

Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Нужная Т.В., Максимов И.В. Роль этилена и цитокининов в развитии защитных реакций в растениях *Triticum aestivum*, инфицированных *Septoria nodorum*. Физиол. раст. 2016;63(5):649-660. [Veselova S.V., Burkhanova G.F., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. Roles of ethylene and cytokinins in development of defense responses in *Triticum aestivum* plants infected with *Septoria nodorum*. Russ. J. Plant Physiol. 2016;63(5):609-619. DOI 10.1134/S1021443716050150.]
Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Нужная Т.В., Румянцев С.Д., Максимов И.В. Влияние этилена и активных форм кислорода на

развитие патогена *Stagonospora nodorum* Berk. в тканях растений пшеницы. Биомика. 2018;10(4):387-399. [Veselova S.V., Burkhanova G.F., Nuzhnaya T.V., Rumyantsev S.D., Maksimov I.V. Influence of ethylene and reactive oxygen species on the growth of the pathogen *Stagonospora nodorum* Berk. in wheat plant tissue. Biomika = Biomics. 2018;10(4):387-399. DOI 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-50. (in Russian)]
Максимов И.В., Валеев А.Ш., Черепанова Е.А., Бурханова Г.Ф. Влияние хитоолигосахаридов различной степени ацетилирования на активность патоген-индуцируемой анионной пероксидазы пшеницы. Прикл. биохимия и микробиология. 2014;50(1):95-100. [Maksimov I.V., Valeev A.Sh., Cherepanova E.A., Burkhanova G.F. Effect of chitoooligosaccharides with different degrees of acetylation on the activity of wheat pathogen-inducible anionic peroxidase. Appl. Biochem. Microbiol. 2014;50(1):82-87. DOI 10.1134/S0003683813060124.]
Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М., 1984. [Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. (Russ. ed.: Maniatis T., Frich E., Sembruk Dzh. Molekulyarnoe Klonirovanie. Moscow, 1984.)]
Barna B., Fodor J., Harrach B.D., Pogány M., Király Z. The Janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens. Plant Physiol. Biochem. 2012;59:37-43. DOI 10.1016/j.plaphy.2012.01.014.
Bertucci M., Brown-Guedira G., Murphy J.P., Cowger C. Genes conferring sensitivity to *Stagonospora nodorum* necrotrophic effectors in *Stagonospora nodorum* blotch-susceptible U.S. wheat cultivars. Plant Dis. 2014;98(6):746-753. DOI 10.1094/PDIS-08-13-0820-RE.
Chen H., Xue L., Chintamanani S., Germain H., Lin H., Cui H., Cai R., Zuo J., Tang X., Li X., Guo H., Zhou J.M. ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 repress SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2 expression to negatively regulate plant innate immunity in *Arabidopsis*. Plant Cell. 2009;21:2527-2540. DOI 10.1105/tpc.108.065193.
Dong N., Liu X., Lu Y., Du L., Xu H., Liu H., Xin Z., Zhang Z. Overexpression of *TaPIE1*, a pathogen-induced ERF gene of wheat, confers host-enhanced resistance to fungal pathogen *Bipolaris sorokiniana*. Funct. Integr. Genomics. 2010;10(2):215-226. DOI 10.1007/s10142-009-0157-4.
Fraaije B.A., Lovell D.J., Baldwin S. Septoria epidemics on wheat: combined use of visual assessment and PCR-based diagnostics of identify mechanisms of disease escape. Plant Protect. Sci. 2002;38(2):421-424.
Gimenez M.J., Piston F., Atienza S.G. Identification of suitable reference genes for normalization of qPCR data in comparative transcriptomics analyses in the Triticeae. Planta. 2011;233:163-173. DOI 10.1007/s00425-010-1290-y.
Giovannini M.P., Puthoff D.P., Nemacheck J.A., Mittapalli O., Saltzman K.D., Ohm H.W., Shukle R.H., Williams C.E. Gene-for-gene defense of wheat against the Hessian fly lacks a classical oxidative burst. Mol. Plant-Microbe Interact. 2006;19(9):1023-1033. DOI 10.1094/MPMI-19-1023.
Golemić E., Tokarz K., Wielanek M., Niewiadomska E. A dissection of the effects of ethylene, H₂O₂ and high irradiance on anti-oxidants and several genes associated with stress and senescence in tobacco leaves. J. Plant Physiol. 2014;171:269-275. DOI 10.1016/j.jplph.2013.08.007.
Hemetsberger C., Herrberger C., Zechmann B., Hillmer M., Doehlemann G. The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. PLoS Pathog. 2012;8(5):e1002684. DOI 10.1371/journal.ppat.1002684.
Jwa N.-S., Hwang B.K. Convergent evolution of pathogen effectors toward reactive oxygen species signaling networks in plants. Front. Plant Sci. 2017;8:1687. DOI 10.3389/fpls.2017.01687.

- Liu J., Zhang T., Jia J., Sun J. The wheat mediator subunit TaMED25 interacts with the transcription factor TaEIL1 to negatively regulate disease resistance against powdery mildew. *Plant Physiol.* 2016; 170(3):1799-1816. DOI 10.1104/pp.15.01784.
- Liu Y., Shen Q., Naqvi N.I. Fungal effectors at the crossroads of phytohormone signaling. *Curr. Opin. Microbiol.* 2018;46:1-6. DOI 10.1016/j.mib.2018.01.006.
- Ma K.-W., Ma W. Phytohormone pathways as targets of pathogens to facilitate infection. *Plant Mol. Biol.* 2016;91:713-725. DOI 10.1007/s11103-016-0452-0.
- Ma Y., Yang M., Wang J., Jiang C.-Zh., Wang Q. Application of exogenous ethylene inhibits postharvest peel browning of 'Huangguan' pear. *Front. Plant Sci.* 2017;7:e.2029. DOI 10.3389/fpls.2016.02029.
- McDonald M.C., Solomon P.S. Just the surface: advances in the discovery and characterization of necrotrophic wheat effectors. *Curr. Opin. Microbiol.* 2018;46:14-18. DOI 10.1016/j.mib.2018.01.019.
- Phan H.T.T., Rybak K., Furuki E., Breen S., Solomon P.S., Oliver R.P., Tan K.-C. Differential effector gene expression underpins epistasis in a plant fungal disease. *Plant J.* 2016;87:343-354. DOI 10.1111/tpl.13203.
- Shen Q., Liu Y., Naqvi N.I. Fungal effectors at the crossroads of phytohormone signaling. *Curr. Opin. Microbiol.* 2018;46:1-6. DOI 10.1016/j.mib.2018.01.006.
- Shi G., Zhang Z., Friesen T.L., Bansal U., Cloutier S., Wicker T., Rasmussen J.B., Faris J.D. Marker development, saturation mapping, and high-resolution mapping of the *Septoria nodorum* blotch susceptibility gene *Snn3-B1* in wheat. *Mol. Genet. Genomics.* 2016;291:107-119. DOI 10.1007/s00438-015-1091-x.
- Subramaniam K., Abbo S., Ueng P.P. Isolation of two differentially expressed wheat ACC synthase cDNAs and the characterization of one of their genes with root-predominant expression. *Plant Mol. Biol.* 1996;31(5):1009-1020. DOI 10.1007/BF00040719.
- Tan K.-C., Oliver R.P. Regulation of proteinaceous effector expression in phytopathogenic fungi. *PLoS Pathog.* 2017;13(4):e1006241. DOI 10.1371/journal.ppat.1006241.
- Vleesschaever D.D., Yinong Y., Casiana V.C., Monica H. Abscisic acid-induced resistance against the brown spot pathogen *Colliobolus miyabeanus* in rice involves MAP kinase-mediated repression of ethylene signaling. *Plant Physiol.* 2010;152:2036-2052. DOI 10.1094/MPMI-10-13-0313-IA.
- Winterberg B., Du Fall L.A., Song X.M., Pascovici D., Care N., Molloy M., Ohms S., Solomon P.S. The necrotrophic effector protein SnTox3 re-programs metabolism and elicits a strong defence response in susceptible wheat leaves. *BMC Plant Biol.* 2014;14:215. DOI 10.1186/s12870-014-0215-5.

ORCID ID

S.V. Veselova orcid.org/0000-0002-1219-2383
G.F. Burkhanova orcid.org/0000-0003-2346-3502
S.D. Romyantsev orcid.org/0000-0002-5331-448X
I.V. Maksimov orcid.org/0000-0002-5707-3265


Благодарности. Работа выполнена по теме госзадания, № АААА-А16-116020350027-7, а также при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-04-00978 с использованием оборудования ЦКП «Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии, Региональный центр коллективного пользования «Агидель») и уникальной научной установки «КОДИНК».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.


Поступила в редакцию 01.06.2019. После доработки 08.07.2019. Принята к публикации 22.07.2019.

Пятая международная научная конференция PlantGen2019

Индукцированная устойчивость представителей рода *Triticum* к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum* Rond.

С.Д. Румянцев , С.В. Веселова, Г.Ф. Бурханова, И.В. Максимов

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия


 e-mail: Rumyantsev-Serg@mail.ru

Обыкновенная злаковая тля *Schizaphis graminum* Rond. наносит значительный ущерб посевам зерновых культур, поэтому повышение устойчивости растений к тлям – одна из первоочередных задач. Проблема создания устойчивых сортов к насекомым, питающимся флоэмным соком, стоит достаточно остро, так как механизмы, характеризующие устойчивость растений к насекомым, до конца не изучены. Тем не менее в современной литературе описывают механизмы, связанные с изменением редокс-статуса растений, заселенных тлей. Кроме того, в последнее время все большее внимание уделяется изучению механизмов индуцируемой устойчивости пшеницы к тлям, регулируемой гормональными сигнальными системами. Для обнаружения связи между редокс-статусом, показателями устойчивости растений пшеницы (антибиозом и выносливостью) к вредителю и индукцией жасмонат (ЖАК)- и салицилат (СК)-сигнальных путей у представителей трех видов растений пшеницы, *Triticum aestivum* L., *T. monococcum* L. и *T. timopheevii* Zhuk., заселенных обыкновенной злаковой тлей *S. graminum*, были проведены исследования с помощью физиологических, биохимических и молекулярно-генетических методов. Тесты на антибиоз и выносливость показали, что устойчивыми по отношению к *S. graminum* были образцы *T. timopheevii* – к-58666 и *T. monococcum* – к-39471, последний из которых оказался наиболее выносливым. Устойчивые образцы отличались высоким содержанием перекиси водорода и повышенной активностью пероксидазы. В нашей работе исследована экспрессия генов, кодирующих PR-белки, маркеры и регуляторы СК- (*TaRboh*, *TaPAL*, *TaPr1*, *TaPrx*) и ЖАК-сигнальных путей (*TaPI*, *TaLOX*, *TaPrx*). При ранних ответных реакциях после заселения тлей у восприимчивого сорта Салават Юлаев (*T. aestivum*) активировалась экспрессия только ЖАК-зависимых генов, что отражало реакцию растений на повреждение. У устойчивого образца *T. timopheevii* к-58666 повышалась транскрипционная активность СК-зависимых генов, при этом тля практически не размножалась. У устойчивого образца *T. monococcum* к-39471, проявившего наибольшую выносливость, увеличивалась экспрессия как СК-, так и ЖАК-зависимых генов. Мы предполагаем, что окислительный взрыв у устойчивых форм пшеницы индуцировался благодаря запуску СК-сигнального пути, что имело решающее значение в дальнейшем каскаде химических реакций, ведущих к развитию устойчивости.


Ключевые слова: *Schizaphis graminum* Rond.; *Triticum aestivum* L.; *T. monococcum* L.; *T. timopheevii* Zhuk.; полимерная цепная реакция; фитоиммунитет; редокс-метаболизм; гормональные сигнальные системы; экспрессия генов.

Для цитирования: Румянцев С.Д., Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Максимов И.В. Индуцированная устойчивость представителей рода *Triticum* к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum* Rond. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(7):865-872. DOI 10.18699/VJ19.560

Induced resistance to the greenbug aphid *Schizaphis graminum* Rond. in species of the genus *Triticum*

S.D. Rumyantsev , S.V. Veselova, G.F. Burkhanova, I.V. Maksimov

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre, RAS, Ufa, Russia

 e-mail: Rumyantsev-Serg@mail.ru

The greenbug aphid *Schizaphis graminum* Rond. causes a significant loss of the grain harvest. Therefore, to improve plant resistance to aphids is one of the topical tasks. The problem of creating varieties resistant to phloem-feeding insects is quite urgent, since the mechanisms procuring the resistance of plants to insects are not fully understood. Nevertheless, modern literature describes some mechanisms associated with changes in the redox state of colonized plants. Besides, attention is being increasingly focused on the study of mechanisms that underlie inducible resistance to aphids in wheat and are regulated by hormonal signaling systems. To detect connections among the redox status, indicators of resistance (antibiosis and endurance) of wheat plants to the pest, and induction of the jasmonate (JA) and salicylate (SA) signaling pathways, we studied accessions of three species of wheat plants – *Triticum aestivum* L., *T. monococcum*, and *T. timopheevii* Zhuk. – infested with *S. graminum* greenbugs by physiological, biochemical, and molecular methods. Analysis of antibiosis and endurance showed that *T. timopheevii* k-58666 and *T. monococcum* k-39471 were resistant to *S. graminum*, the latter accession being the most enduring. High hydrogen peroxide contents and high peroxidase activities were detected in the resistant plants. We investigated the expression of genes encoding PR

proteins, including markers and regulators of the salicylate (*TaRboh*, *TaPAL*, *Tapr1*, *TaPrx*) and jasmonate (*TaPI*, *TaLOX*, *TaPrx*) signaling pathways. At the early stage of infestation in the susceptible *T. aestivum* variety Salavat Yulaev, the expression of only jasmonate-dependent genes was activated in response to plant damage. In the resistant *T. timopheevii* accession k-58666, expression of only salicylate-dependent genes was activated, while the aphid reproduction was practically absent. In the resistant *T. monococcum* accession k-39471, expression was activated in both the salicylate-dependent and jasmonate-dependent gene groups. We assume that the oxidative burst in the resistant forms of wheat was induced via the activation of the SA signaling pathway, which was of crucial importance in the further cascade of chemical reactions leading to the development of resistance.

Key words: *Schizaphis graminum* Rond.; *Triticum aestivum* L.; *T. monococcum* L.; *T. timopheevii* Zhuk.; polymerase chain reaction; plant immunity; redox metabolism; hormonal signaling systems; gene expression.

For citation: Rumyantsev S.D., Veselova S.V., Burkhanova G.F., Maksimov I.V. Induced resistance to the greenbug aphid *Schizaphis graminum* Rond. in species of the genus *Triticum*. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(7):865-872. DOI 10.18699/VJ19.560 (in Russian)

Введение

Значительный ущерб посевам пшеницы среди насекомых-вредителей наносит злаковая тля (*Schizaphis graminum*) (Morkunas et al., 2011; Радченко, 2012). На сегодняшний день повышение устойчивости зерновых культур к тлям является одной из первостепенных задач как науки, так и практики. Один из подходов решения этой проблемы – селекция устойчивых генотипов растений. Однако генофонд *Triticum aestivum* L. относительно беден устойчивыми формами, поэтому возникает необходимость изучать дикорастущие виды пшеницы. Показано, что большинство образцов *T. monococcum* L. и *T. timopheevii* Zhuk. обладает комплексной устойчивостью к целому ряду вредителей и болезней (Радченко, 2012). Но для создания устойчивого сорта необходимо знание молекулярных механизмов устойчивости.

Защита растений от насекомых, питающихся флоэмным соком, обеспечивается за счет механизмов как специфической устойчивости по типу ген-на-ген, так и неспецифической резистентности, связанной с гормональными сигнальными системами растений (Morkunas et al., 2011; Радченко, 2012). В последнее время все большее внимание уделяется изучению механизмов индуцируемой (активной, по Н.И. Вавилову) устойчивости пшеницы к тлям. Индуцируемая неспецифическая устойчивость растений, развивающаяся против насекомых-фитофагов, регулируется гормональными сигнальными путями, включая жасмонат (ЖАК)-, этилен- и салицилат (СК)-сигнальные пути, что ведет к изменению экспрессии генов, синтезу защитных белков, различным ферментов, изменению редокс-метаболизма растений, повышению активности пероксидаз в апопласте, укреплению клеточных стенок растений и др. (War et al., 2012). Гормональные сигнальные пути не функционируют независимо друг от друга, но образуют сложную сеть взаимодействий, что играет важную роль в регуляции тонких механизмов защитных реакций растений (Morkunas et al., 2011). Показано, что заселение тлями запускало в растениях как ЖАК-, так и СК-зависимые защитные ответы (Morkunas et al., 2011; Kerchev et al., 2012). К сожалению, тонкие механизмы взаимодействия этих сигнальных путей при ответе растений на поражение тлями до конца не изучены. Активацию ЖАК-защитного пути наблюдали как у восприимчивых, так и у устойчивых растений, а индукция СК-защитного пути происходила быстрее и сильнее только у устойчивых генотипов (Morkunas et al., 2011).

Вместе с тем было продемонстрировано, что как ЖАК-, так и СК-сигнальный путь вызывали накопление активных форм кислорода (АФК), в частности пероксида водорода (H_2O_2) в растениях, заселенных тлей (Morkunas et al., 2011). Известно, что АФК являются главным сигналом растения на стрессовые факторы окружающей среды, а редокс-статус растения, заселенного тлей, – один из важных показателей устойчивости сорта (Morkunas et al., 2011; Koch et al., 2016). Окислительный взрыв при заселении тлями считается типичной реакцией формирования устойчивости растений к вредителю (Koch et al., 2016). Показано вовлечение АФК в ранний сигнальный ответ и регуляцию защитного ответа как по ЖАК-, так и по СК-сигнальному пути, но молекулярный механизм, лежащий в основе этих процессов, неизвестен (Kerchev et al., 2012).

Цель настоящей работы – обнаружение связи между редокс-статусом, показателями устойчивости растений пшеницы (антибиозом и выносливостью) к вредителю и индукцией ЖАК- и СК-сигнальных путей у представителей трех видов пшеницы, *Triticum aestivum*, *T. monococcum* и *T. timopheevii*, заселенных обыкновенной злаковой тлей (*Schizaphis graminum* Rond.).

Материалы и методы

Объекты исследования. Обыкновенную злаковую тлю (*Schizaphis graminum* Rond.) для экспериментов размножали на молодых проростках мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Салават Юлаев, выращенных в изолированных сосудах с прожаренной при 180 °С почвой в климатической камере КС-200 СПУ (Смоленский СКТЬ СПУ, Россия) с 16-часовым световым периодом при температуре 20/24 °С (ночь/день), интенсивность света 146 Вт/м² (лампы Osram L 36W/77). В экспериментах использовали восприимчивый сорт мягкой яровой пшеницы *T. aestivum* – Салават Юлаев (СЮ), а также один образец *T. monococcum* к-39471 и один образец *T. timopheevii* к-58666, из Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (Санкт-Петербург).

Биохимические параметры. Для экспериментов трехсуточные проростки пшеницы, выращенные в изолированных пластиковых сосудах на водной культуре (10 % раствор Хогланда–Арнона) в условиях, описанных выше, заселяли тлями. Для этого одинаковое количество тлей разных возрастов стряхивали в каждый сосуд с растениями так, чтобы нагрузка на одно растение составляла 10 особей тлей (Радченко, 2008). Затем сосуды накрывали

пластиковыми изоляторами, затянутыми пористым нетканым материалом. Измерение генерации пероксида водорода (H_2O_2) и активность фермента пероксидазы (ПО) через 1, 3 и 10 сут после заселения проростков пшеницы *S. graminum* выполняли, как описано ранее (Веселова и др., 2016).

Тест на антибиоз. На трехсуточные всходы под изоляторы подсаживали личинок первого возраста из расчета одна особь на растение. Через 14 дней подсчитывали абсолютное количество живых тлей, а также число погибших взрослых особей и личинок (Радченко, 2008). Смертность выражали в процентах от общего количества тлей. Коэффициент размножения рассчитывали по формуле: $K = (\text{средняя плодовитость самки за время опыта}) / (\text{продолжительность опыта в днях})$ (Радченко, 2008).

Тест на выносливость растений. В возрасте трех суток измеряли длину проростков от уровня плотика до кончика листа, а затем каждое растение заселяли 20 бескрылыми самками и изолировали. Постоянную численность тлей поддерживали путем удаления через каждые 48 ч отрождающихся личинок в течение двух недель. В конце эксперимента повторно измеряли высоту первого и второго листьев растений, не заселенных и заселенных тлями, и результаты сравнивали с первоначальным измерением (Радченко, 2008). Выносливость выражали в виде процентов ингибирования роста листа по сравнению с незаселенным тлей контролем.

Транскрипционная активность генов. Выделение тотальной РНК из контрольных и опытных растений пшеницы, зафиксированных в жидком азоте, через 3 и 10 сут после заселения тлями, осуществляли с помощью реагента Trizol, согласно протоколу фирмы-поставщика (Sigma, Германия). Концентрацию нуклеиновых кислот измеряли при A260/A280 на спектрофотометре Smart Spec Plus (Bio-Rad, США). Для синтеза кДНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью M-MuLV обратной транскриптазы (Синтол, Россия). На основе кДНК выполняли ПЦР с праймерами, фланкирующими консервативные участки генов изучаемых PR-белков, в амплификаторе типа ТП4-ПЦР-01-«Тердик» (ДНК-Технология, Россия). В работе применяли праймеры к генам, кодирующим PR1-белок (*TaPr1*, AF384143) (Веселова и др., 2016), ингибиторы протеиназ (*TaPI*, EU293132.1), анионную пероксидазу (*TaPrx*, TC151917), НАДФН-оксидазу (*TaRboh*, HE674332) (Веселова и др., 2019), фенилаланин-амиаклиазу (*TaPAL*, X99725) (Ding et al., 2011), липоксигиназу (*TaLOX*, VJ223744) (Diallo et al., 2014). Для вычисления уровня нормализованной экспрессии генов использовали праймеры к гену конститутивно экспрессирующегося белка ингибитора РНКаз (RNase L inhibitor-like) (*TaRLI*, AY059462) (Веселова и др., 2016). Праймеры к этим генам были подобраны к *T. aestivum* L. В предварительных опытах с использованием данных праймеров получены гомологичные гены у *T. monococcum* и *T. timopheevii*. Известно, что у представителей первичного (например, *T. monococcum*, *Ae. tauschii* Coss., *T. spelta* L., *T. compactum* Host., *T. durum* Desf., *T. dicoccum* (Schrank.) Schuebl.) и вторичного (*T. timopheevii*, *T. araraticum* Jakubz., *Ae. speltoides* Tausch., *Ae. sharonensis* Eig, *Ae. longissima* Schw. et Musch.) генофондов содержатся геномы с высокой или частич-

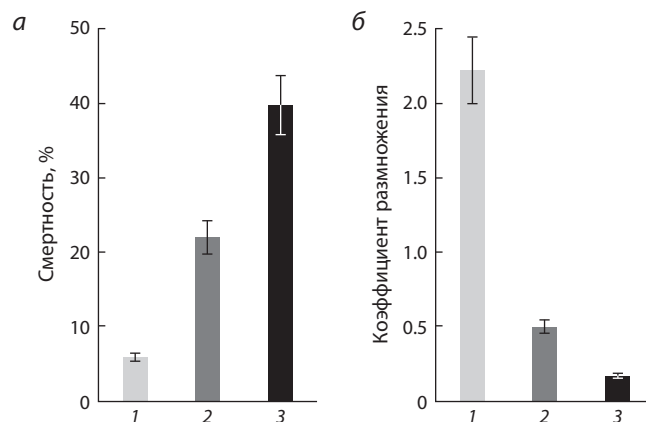


Рис. 1. Показатели смертности (а) и размножения (б) обыкновенной злаковой тли *S. graminum* на разных видах пшеницы.

1 - *Triticum aestivum* сорт Салават Юлаев; 2 - образец *T. timopheevii* к-58666; 3 - образец *T. monococcum* к-39471.

ной гомологией с геномами А, В и D мягкой пшеницы *T. aestivum* (Chaudhary et al., 2014).

Статическая обработка. Все эксперименты повторяли три раза и проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях (общее $n = 9$), кроме тестов на антибиоз и выносливость, где эксперименты включали не менее 10 биологических повторов (общее $n = 30$). Средние арифметические значения и их доверительные интервалы, рассчитанные по стандартным ошибкам, представлены на рис. 1–4 и в табл. 1–2. Достоверность различий между вариантами опыта оценивали по t -критерию Стьюдента при доверительном уровне $p \leq 0.05$.

Результаты

Показатели толерантности вида или сорта. Исследовано два типа устойчивости растений к тлям – антибиоз и выносливость. Тест на антибиоз показал, что тли, кормившиеся на сорте СЮ, проявляли наименьшую смертность и самый высокий коэффициент размножения (рис. 1, а, б), т.е. этот сорт был восприимчив к обыкновенной злаковой тле. Смертность тлей на образце *T. timopheevii* к-58666 была примерно в 3–4 раза выше, а коэффициент размножения – в 4–5 раз ниже, чем у тлей, кормившихся на восприимчивом сорте (см. рис. 1, а, б). Однако больше всего на жизнеспособность тлей повлиял образец *T. monococcum* к-39471, так как у заселенных на нем тлей были обнаружены самая высокая смертность и самый низкий коэффициент размножения (см. рис. 1, а, б). *T. monococcum* к-39471 оказался самым устойчивым среди изученных образцов.

В наших экспериментах установлена низкая выносливость сорта СЮ по отношению к *S. graminum*, проявившаяся в сильном ингибировании роста 1-го и 2-го листьев (табл. 1). Образец *T. timopheevii* к-58666 показал среднюю выносливость к обыкновенной злаковой тле (см. табл. 1). Наиболее толерантным оказался образец *T. monococcum* к-39471, так как заселение тлями не ингибировало рост 1-го листа, торможение роста 2-го листа было минимальным (см. табл. 1).

Таблица 1. Показатели выносливости растений пшеницы разных видов *Triticum* spp., заселенных обыкновенной злаковой тлей *S. graminum*

Вид пшеницы	Ингибирование роста, %	
	1-го листа	2-го листа
<i>Triticum aestivum</i> – СЮ	25.8 ± 6.1	45.0 ± 3.7
<i>T. timopheevii</i> – к-58666	12.3 ± 6.6	22.6 ± 4.2
<i>T. monococtum</i> – к-39471	0.1 ± 2.4	7.6 ± 2.8

Таблица 2. Влияние обыкновенной злаковой тли *S. graminum* на содержание H₂O₂ и активность пероксидазы в листьях трех видов пшеницы *Triticum* spp. на разных стадиях кормления

Вариант опыта	Время после заселения, сут		
	1	3	10
Содержание H ₂ O ₂ , мкМ H ₂ O ₂ /г сырой массы			
СЮ	25.2 ± 5.6	26.8 ± 1.7	26.3 ± 2.7
СЮ + <i>S. graminum</i>	12.6 ± 1.3	19.0 ± 2.4	27.0 ± 1.1
к-58666	27.8 ± 5.3	28.9 ± 2.8	22.9 ± 1.7
к-58666 + <i>S. graminum</i>	58.7 ± 5.5	48.6 ± 4.5	28.0 ± 3.3
к-39471	28.2 ± 3.6	28.7 ± 3.1	28.8 ± 1.1
к-39471 + <i>S. graminum</i>	53.7 ± 5.3	20.4 ± 3.0	12.0 ± 1.2
Активность пероксидазы, оп. ед./мг белка мин			
СЮ	30.4 ± 0.7	29.0 ± 0.4	30.3 ± 1.8
СЮ + <i>S. graminum</i>	26.1 ± 1.0	25.8 ± 0.6	28.8 ± 1.2
к-58666	29.6 ± 0.4	31.4 ± 0.8	28.7 ± 1.7
к-58666 + <i>S. graminum</i>	35.7 ± 1.2	36.0 ± 0.3	57.1 ± 2.2
к-39471	23.6 ± 0.5	32.1 ± 1.1	30.2 ± 1.2
к-39471 + <i>S. graminum</i>	43.2 ± 1.4	60.5 ± 2.6	90.7 ± 3.4

Редокс-статус заселенных тлей растений. Заселение восприимчивого сорта СЮ тлями приводило к уменьшению содержания H₂O₂ на начальных этапах кормления – первые и третьи сутки (табл. 2). Напротив, у устойчивых растений пшеницы *T. timopheevii* к-58666 обнаружено повышение содержания H₂O₂ во время ранних ответных реакций после заселения тлей (см. табл. 2). У толерантного к *S. graminum* образца *T. monococtum* к-39471 наблюдали резкое накопление H₂O₂ к 1-м суткам после заселения тлей и снижение генерации H₂O₂ к 3-м суткам кормления (см. табл. 2). На 10-е сутки после заселения тлей содержание H₂O₂ оставалось на уровне контрольных растений у восприимчивого сорта СЮ и образца *T. timopheevii* к-58666 и достаточно сильно снижалось у устойчивого образца *T. monococtum* к-39471 (см. табл. 2).

Во время ранних ответных реакций после заселения тлей (1-е–3-и сутки) у устойчивых к *S. graminum* образцов *T. timopheevii* к-58666 и *T. monococtum* к-39471 на фоне повышенной генерации H₂O₂ обнаружено увеличение активности ПО (см. табл. 2). Через 10 сут после заселения тлей активность ПО у устойчивых генотипов продолжала повышаться, особенно у образца *T. monococtum* к-39471 (см. табл. 2). Напротив, у восприимчивого сорта пшеницы СЮ как в начальный период кормления, так и через 10 сут после заселения тлей на фоне пониженного содержания H₂O₂ не обнаружено увеличения активности ПО (см. табл. 2).

Транскрипционная активность генов, связанных с редокс-метаболизмом. Во время ранних ответных реакций после заселения тлей (3 сут) содержание мРНК гена *Rboh* повышалось у устойчивых образцов *T. timopheevii* к-58666 и *T. monococtum* к-39471, но не увеличивалось у восприимчивого сорта СЮ (рис. 2, а). Во время долгосрочных ответных реакций после заселения тлей (10 сут), напротив, содержание транскриптов гена *Rboh* возрастало только у восприимчивого сорта СЮ, а у устойчивых образцов снижалось примерно в два раза (см. рис. 2, а). Содержание мРНК гена *Prx* у восприимчивого сорта СЮ

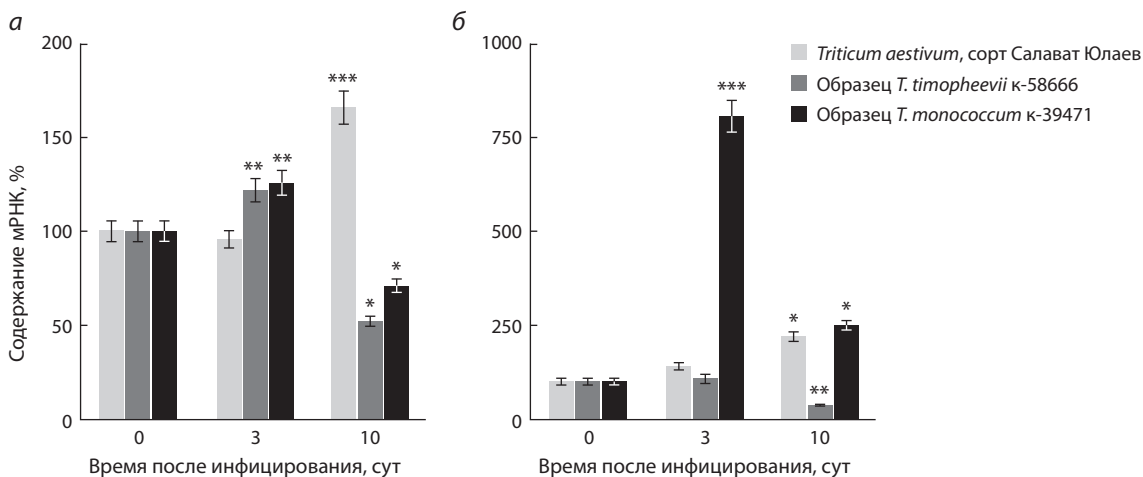


Рис. 2. Влияние обыкновенной злаковой тли *S. graminum* на содержание мРНК генов *Rboh* (а) и *Prx* (б) в листьях трех видов пшеницы *Triticum* spp. на разных стадиях кормления.

Звездочки показывают статистически достоверные отличия от контрольной группы; разное количество звездочек – статистически достоверные различия между вариантами при $p \leq 0.05$.

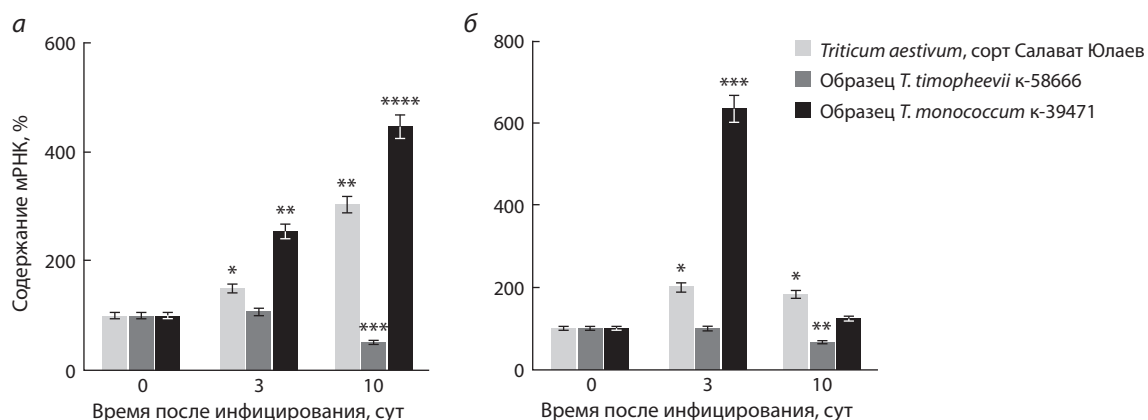


Рис. 3. Влияние обыкновенной злаковой тли *S. graminum* на содержание мРНК генов *LOX* (а) и *PI* (б) в листьях трех видов пшеницы *Triticum* spp. на разных стадиях кормления. Обозначения см. на рис. 2.

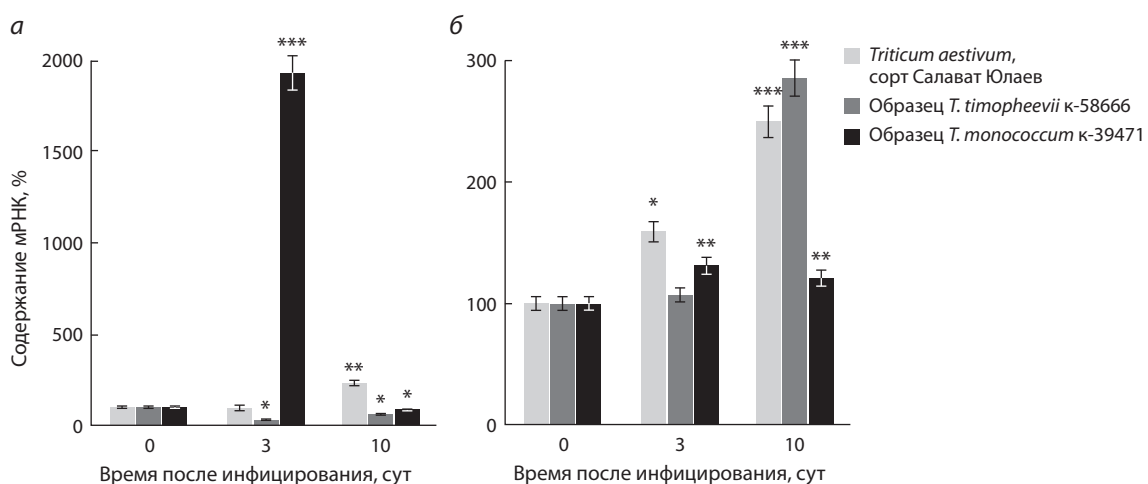


Рис. 4. Влияние обыкновенной злаковой тли *S. graminum* на содержание мРНК генов *Pr1* (а) и *PAL* (б) в листьях трех видов пшеницы *Triticum* spp. на разных стадиях кормления. Обозначения см. на рис. 2.

повышалось незначительно, а у образца *T. timopheevii* к-58666 снижалось в течение всего эксперимента (см. рис. 2, б). У образца *T. monosocum* к-39471 обнаружено значительное увеличение мРНК гена *Prx*: через 3 сут после заселения тлей – в 8 раз, а через 10 сут – в три раза (см. рис. 2, б).

Транскрипционная активность генов, регулируемых ЖАК-зависимым сигнальным каскадом. У восприимчивого сорта СЮ повышение содержания транскриптов генов *LOX*, *PI*, регулируемых ЖАК-сигнальным каскадом, наблюдали как через 3 сут, так и через 10 сут после заселения тлей (рис. 3, а, б). У устойчивого образца *T. timopheevii* к-58666 транскрипция изученных генов не повышалась, а к 10-м сут даже снижалась (см. рис. 3, а, б). У устойчивого образца *T. monosocum* к-39471 обнаружено значительное повышение мРНК генов ЖАК-сигнального пути (*LOX*, *PI*) уже через 3 сут после заселения тлей: гена *LOX* – в 2.5 раза, гена *PI* – в 6.4 раза (рис. 3, а, б). Через 10 сут инфицирования у данного образца обнаружено значительное накопление транскриптов только гена *LOX* – в 3.7 раза (рис. 3, а).

Транскрипционная активность генов, регулируемых СК-зависимым сигнальным каскадом. У восприимчивого сорта СЮ двукратное накопление транскриптов гена *Pr1* обнаружено только через 10 сут после заселения тлей (рис. 4, а). У устойчивого образца *T. timopheevii* к-58666 транскрипция главного гена СК-сигнального пути несколько снижалась в течение всего эксперимента (см. рис. 4, а). Напротив, у устойчивого образца *T. monosocum* к-39471, проявившего наибольшую выносливость, обнаружено значительное 20-кратное повышение мРНК гена *Pr1* уже через 3 сут после заселения тлей (см. рис. 4, а). Характер изменения содержания транскриптов гена *PAL* у восприимчивого сорта СЮ и устойчивого образца *T. timopheevii* к-58666 был одинаковым: повышение содержания мРНК на 20–50 % на 3-и сутки инфицирования и почти трехкратное увеличение транскриптов через 10 сут кормления тлей (см. рис. 4, б). У устойчивого образца *T. monosocum* к-39471 обнаружено небольшое повышение транскрипции изученного гена на 20–30 % по сравнению с незаселенным контролем в течение всего эксперимента (см. рис. 4, б).

Обсуждение

При изучении механизмов формирования устойчивости растений к насекомым, питающимся флоэмным соком, важно различать быстрые ответы, обнаруживающиеся у растений в течение первых пяти дней, и долгосрочные ответы, проявляющиеся после десяти дней заселения вредителем (Koch et al., 2016). Быстрые ответы устойчивых растений характеризуются усилением генерации АФК и активацией базального иммунитета. При этом защитная роль повышенной генерации АФК в растениях в ответ на заселение тлями заключается как в их сигнальной функции, запускающей системную устойчивость (Morkunas et al., 2011), так и в прямом повреждающем действии высоких концентраций H_2O_2 на тлей, приводящем к подавлению выживаемости вредителя (Morkunas et al., 2011; War et al., 2012; Koch et al., 2016). При долгосрочных ответах индуцированные ранним ответом защитные системы растения запускают систему детоксикации АФК и восстановления роста (Koch et al., 2016).

Наши результаты показали, что *T. monosocum* к-39471 был самым устойчивым среди изученных образцов к обыкновенной злаковой тле *S. graminum*. Это совпадает с данными литературы о резистентности многочисленных образцов *T. monosocum* к разным видам тлей (Радченко, 2012). Образец *T. timopheevii* к-58666 обладал средней устойчивостью к вредителю. В литературе имеются противоречивые сведения о проявлениях этого показателя у пшениц вида *T. timopheevii* к различным видам злаковых тлей, однако в основном этот вид пшениц проявляет резистентность к вредителю и слабо заселяется тлями (Радченко, 2012).

У устойчивых образцов *T. timopheevii* к-58666 и *T. monosocum* к-39471 обнаружены повышения генерации H_2O_2 во время ранних ответных реакций после заселения вредителем и снижение данного показателя на позднем этапе заселения тлей (табл. 2), что приводило к высокой смертности тлей (см. рис. 1) и достаточно большой выносливости растений (см. табл. 1). У восприимчивых растений пшеницы сорта СЮ наблюдали подавление окислительного взрыва во время ранних ответных реакций после заселения вредителем и отсутствие снижения содержания H_2O_2 во время долгосрочных ответных реакций после заселения тлей (см. табл. 2), что обуславливало высокую плодовитость насекомого (см. рис. 1) и низкой выносливости растений (см. табл. 1). Так, на растениях ячменя, колонизированных ячменной тлей *Diuraphis plexis*, и на растениях арабидопсиса, заселенных персиковой тлей *Myzus persicae*, окислительный взрыв был обнаружен только у устойчивых, а не у восприимчивых форм растений (Lei, Zhu-Salzman, 2015).

Повышение генерации H_2O_2 у устойчивых форм пшеницы в наших экспериментах, скорее всего, обеспечивалось за счет увеличения транскрипционной активности генов *Rboh* и *Prx* (см. рис. 2), что было показано ранее на примере патосистемы пшеница–*Staganospora nodorum* (Веселова и др., 2018). Кроме того, с помощью мутантных растений арабидопсиса, лишенных гена *RbohD*, было показано, что НАДФН-оксидаза играла ключевую роль в генерации АФК при повреждении растений тлями (Kerchev et al., 2012).

Окислительный взрыв индуцирует иммунный ответ растения, однако излишнее количество АФК ингибирует фотосинтез, тормозит ростовые процессы и может привести к повреждениям в клетке, поэтому у толерантных растений запускается механизм детоксикации АФК, в котором участвуют антиоксидантные ферменты, такие как ПО и др. (Koch et al., 2016). В наших экспериментах у устойчивых образцов *T. timopheevii* к-58666 и *T. monosocum* к-39471 активность ПО начала повышаться уже во время ранних ответных реакций после заселения тлей, на фоне повышенного содержания H_2O_2 , и продолжала повышаться во время долгосрочных ответных реакций (см. табл. 2). Эти результаты могут говорить о вовлечении H_2O_2 и ПО в синтез токсичных фенольных соединений и реорганизацию клеточных стенок растений за счет лигнификации, что может быть причиной снижения жизнеспособности вредителя (Morkunas et al., 2011; War et al., 2012; Koch et al., 2016), которое было выявлено у устойчивых образцов в наших экспериментах (см. рис. 1). У восприимчивого сорта СЮ не обнаружено повышения активности ПО как при ранних ответных реакциях, так и во время долгосрочных ответных реакций после заселения тлей (см. табл. 2).

Таким образом, активация пероксидаз может играть решающую роль в развитии устойчивости растений к тлям за счет детоксикации больших количеств АФК (War et al., 2012; Koch et al., 2016). Кроме того, молекула H_2O_2 при защите растений от тлей выполняет также сигнальную функцию, активируя и регулируя гормональные сигнальные пути при развитии системной устойчивости (Kerchev et al., 2012). Первичным фактором, индуцирующим защитный ответ растений на заселение тлями, считается механическое поранение, включающее ЖАК-зависимую активацию ингибиторов протеиназ и липоксигеназ (Morkunas et al., 2011). Затем растение отвечает на химические детерминанты, содержащиеся в слюне тлей, и индуцирует защитный ответ, схожий с реакцией растений на биотрофные фитопатогены, при этом запускается СК-зависимый сигнальный каскад (Morkunas et al., 2011). Из изученных в нашей работе генов защитных белков гены *Pr1* и *PAL* индуцировались СК-зависимым сигнальным каскадом (Van Loon et al., 2006). Нужно отметить, что ген *Rboh* также регулировался СК-зависимым сигнальным каскадом (Kerchev et al., 2012). Гены *PI* и *LOX* запускались ЖАК-зависимым сигнальным каскадом (Van Loon et al., 2006). Ген *Prx*, кодирующий анионную ПО, запускался и при формировании ЖАК- и СК-зависимых защитных реакций (Van Loon et al., 2006).

В нашей работе у устойчивого образца *T. timopheevii* к-58666 как на раннем, так и на позднем этапе кормления повышалось содержание транскриптов генов *Rboh* и *PAL*, регулируемых только СК-зависимым сигнальным путем (см. рис. 2, а, 3, б), на фоне повышенной генерации H_2O_2 во время ранних ответных реакций и высокой активности ПО (см. табл. 2). Эти результаты предполагают вовлечение фермента фенилаланин-аммиак-лиазы (ген *PAL*), основного фермента фенилпропаноидного пути, в синтез лигнина и фенольных соединений, в том числе СК. Следует отметить, что лигнификация клеточных стенок растений осуществляется только при активации апопластных пероксидаз на фоне высокого содержания H_2O_2 (Herrero

et al., 2013). Помимо этого, запуск СК-сигнального пути, вероятно, является совместным механизмом антибиоза и отпугивания тлей у устойчивых форм растений (Morkunas et al., 2011).

У устойчивого образца *T. monococtum* к-39471 уже во время ранних ответных реакций после заселения тлей значительно увеличивалась концентрация мРНК всех изученных генов, регулируемых как СК-, так и ЖАК-зависимым сигнальным каскадом (см. рис. 2–4). Во время долгосрочных ответных реакций после заселения тлей содержание транскриптов некоторых генов уменьшалось, однако концентрация мРНК гена *LOX* продолжала повышаться (см. рис. 2–4). Наиболее важная функция липоксигеназы в защите растений от вредителей – окисление линоленовой кислоты с последующим синтезом ЖАК и активацией работы ЖАК-сигнальной системы, что приводит к синтезу ингибиторов протеаз и ферментов синтеза лигнина, суберина и кутина, а также генерации летучих органических соединений, действующих на насекомых как репелленты (Wasternack, Strnad, 2018). Ингибиторы протеиназы связываются с пищеварительными ферментами в кишечнике насекомых и ингибируют их активность, тем самым уменьшая переваривание белка, приводя к нехватке аминокислот, медленному развитию и голоду насекомых (War et al., 2018). Однако именно индукция генов СК-зависимого сигнального пути (*Pr1*, *PAL*, *Rboh* и *Prx*) обеспечивала окислительный взрыв во время ранних ответных реакций после заселения тлей, запускающий каскад последующих защитных ответов растений против тлей. Скорее всего, это происходило за счет направленного снижения активности каталазы вследствие связывания СК с каталазой и ингибирования ее активности (Mohase, van der Westhuizen, 2002). Известно, что некоторые виды тлей повышают активность этого фермента для уменьшения окислительного взрыва и обеспечения благоприятных условий для своей жизнедеятельности (Lei, Zhu-Salzman, 2015). Кроме того, ранее нами было показано, что высокое содержание H_2O_2 у устойчивых образцов *T. timopheevii* к-58666 и *T. monococtum* к-39471 обеспечивалось, в том числе за счет пониженной активности каталазы (Румянцев и др., 2018).

У восприимчивого сорта Сю во время ранних ответных реакций после заселения тлей на фоне пониженного содержания H_2O_2 не обнаружено какого-либо значительного повышения содержания транскриптов генов, регулируемых СК-зависимым сигнальным каскадом, кроме небольшого повышения содержания мРНК гена *PAL* (см. рис. 2, 3). Однако обнаружено повышение содержания транскриптов генов *LOX* и *PI*, регулируемых ЖАК-сигнальным каскадом (см. рис. 4), что, скорее всего, отражало реакцию растения на повреждение (Morkunas et al., 2011). Во время долгосрочных ответных реакций после заселения тлей у восприимчивого сорта активировались гены как ЖАК-, так и СК-сигнального пути, однако отсутствие окислительного взрыва, по-видимому, не позволило запустить каскад защитных реакций.

Заключение

Таким образом, индукция окислительного взрыва у устойчивых форм пшеницы происходила благодаря запуску

СК-сигнального пути, что имело решающее значение в дальнейшем каскаде химических реакций, ведущих к развитию устойчивости. Немаловажным в развитии защитных реакций и взаимодействии гормональных сигнальных систем СК и ЖАК оказался временной фактор. Индукция только ЖАК-сигнального пути не обуславливала развитие устойчивости, тогда как запуск СК-защитного пути отдельно или вместе с ЖАК-сигнальным каскадом приводил к развитию устойчивости у образцов *T. timopheevii* к-58666 и *T. monococtum* к-39471 соответственно.

Список литературы / References

- Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Нужная Т.В., Максимов И.В. Роль этилена и цитокининов в развитии защитных реакций в растениях *Triticum aestivum*, инфицированных *Septoria nodorum*. Физиол. раст. 2016;63(5):649-660.
- [Veselova S.V., Burkhanova G.F., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. Roles of ethylene and cytokinins in development of defense responses in *Triticum aestivum* plants infected with *Septoria nodorum*. Russ. J. Plant Physiol. 2016;63(5):609-619. DOI 10.1134/S1021443716050150.]
- Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Нужная Т.В., Максимов И.В. Роль НАДФН-оксидазного сигнального каскада в развитии устойчивости мягкой яровой пшеницы к возбудителю септориоза *Stagonospora nodorum* Berk. Изв. Уфимского научного центра РАН. 2018;3(1):66-74. DOI 10.31040/2222-8349-2018-1-3-66-74.
- [Veselova S.V., Burkhanova G.F., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. Effect of NADPH oxidases cascade on mechanisms regulating defense common wheat reactions under the disease *Stagonospora nodorum* Blotch. Izvestiya Ufmskogo Nauchnogo Tsentra RAN = Proceedings of the RAS Ufa Scientific Centre. 2018;3(1):66-74. DOI 10.31040/2222-8349-2018-1-3-66-74. (in Russian)]
- Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Румянцев С.Д., Благова Д.К., Максимов И.В. Бактерии рода *Bacillus* в регуляции устойчивости пшеницы к *Schizaphis graminum*. Прикл. биохимия и микробиология. 2019;55(1):56-63. DOI 10.1134/S0555109919010185.
- [Veselova S.V., Burkhanova G.F., Rumyantsev S.D., Blagova D.K., Maksimov I.V. Strain of *Bacillus* spp. regulate wheat resistance to greenbug aphid *Schizaphis graminum* Rond. Appl. Biochem. Microbiol. 2019;55(1):41-47. DOI 10.1134/S0003683819010186.]
- Радченко Е.Е. Злаковые тли. Изучение генетических ресурсов зерновых культур по устойчивости к вредным организмам. М.: Россельхозакадемия, 2008;214-257.
- [Radchenko E.E. Cereal aphids. In: The Study of the Genetic Resources of Cereal Crops for Pest Resistance. Moscow: Rossel'khozakademiy Publ., 2008;214-257. (in Russian)]
- Радченко Е.Е. Учение Н.И. Вавилова о естественном иммунитете растений к вредным организмам и селекция зерновых культур на устойчивость к тлям. С.-х. биология. 2012;47(5):54-63.
- [Radchenko E.E. N.I. Vavilov's theory on natural immunity of plants to harmful organisms and breeding of cereal crops for aphid resistance. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2012;47(5):54-63. DOI 10.15389/agrobiology.2012.5.54rus. (in Russian)]
- Румянцев С.Д., Веселова С.В., Черепанова Е.А., Максимов И.В. Устойчивость различных видов пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum* Rond. Изв. Уфимского научного центра РАН. 2018;3(5):18-24. DOI 10.31040/2222-8349-2018-5-3-18-24.
- [Rumyantsev S.D., Veselova S.V., Cherepanova E.A., Maksimov I.V. The resistance of different wheat species to greenbug aphid *Schizaphis graminum* Rond. Izvestiya Ufmskogo Nauchnogo Tsentra RAN = Proceedings of the RAS Ufa Scientific Centre. 2018;3(5):18-24. DOI 10.31040/2222-8349-2018-5-3-18-24. (in Russian)]
- Chaudhary H.K., Kaila V., Rather S.A., Badiyal A., Hussain W., Jamalwal N.S., Mahato A. Wheat. In: Pratap A., Kumar J. (Eds.). Alien

- Gene Transfer in Crop Plants. Vol. 2. Achievements and Impacts. New York: Springer-Verlag, 2014;1-27. DOI 10.1007/978-1-46149572-7_1.
- Diallo A.O., Agharbaoui Z., Badawi M.A., Ali-Benali M.A., Moheb A., Houde M., Sarhan F. Transcriptome analysis of an mvp mutant reveals important changes in global gene expression and a role for methyl jasmonate in vernalization and flowering in wheat. *J. Exp. Bot.* 2014;65(9):2271-2286. DOI 10.1093/jxb/eru102.
- Ding L., Xu H., Yu H., Yang L., Kong Z., Zhang L., Xue S., Jia H., Ma Z. Resistance to hemi-biotrophic *F. graminearum* infection is associated with coordinated and ordered expression of diverse defense signaling pathways. *PLoS One.* 2011;6(4):e19008. DOI 10.1371/journal.pone.0019008.
- Herrero J., Esteban-Carrasco A., Zapata J.M. Looking for *Arabidopsis thaliana* peroxidases involved in lignin biosynthesis. *Plant Physiol. Biochem.* 2013;67:77-86. DOI 10.1016/j.plaphy.2013.02.019.
- Kerchev P.I., Fenton B., Foyer C.H., Hancock R.D. Plant responses to insect herbivory: interactions between photosynthesis, reactive oxygen species and hormonal signalling pathways. *Plant Cell Environ.* 2012;35(2):441-453. DOI 10.1111/j.1365-3040.2011.02399.x.
- Koch K.G., Chapman K., Louis J., Heng-Moss T., Sarath G. Plant tolerance: a unique approach to control hemipteran pests. *Front. Plant Sci.* 2016;7:1363. DOI 10.3389/fpls.2016.01363.
- Lei J., Zhu-Salzman K. Enhanced aphid detoxification when confronted by a host with elevated ROS production. *Plant Signal. Behav.* 2015;10(4):e1010936. DOI 10.1080/15592324.2015.1010936.
- Mohase L., van der Westhuizen A.J. Salicylic acid is involved in resistance responses in the Russian wheat aphid – wheat interaction. *J. Plant Physiol.* 2002;159(6):585-590. DOI 10.1078/0176-1617-0633.
- Morkunas I., Mai V.C., Gabrys B. Phytohormonal signaling in plant responses to aphid feeding. *Acta Physiol. Plant.* 2011;33(6):2057-2073. DOI 10.1007/s11738-011-0751-7.
- van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006;44:135-162. DOI 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425.
- War A.R., Paulraj M.G., Ahmad T., Buhroo A.A., Hussain B., Ignaci-muthu S., Sharma H.C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal. Behav.* 2012;7(10):1306-1320. DOI 10.4161/psb.21663.
- War A.R., Taggar G.K., Hussain B., Taggar M.S., Nair R.M., Sharma H.C. Plant defence against herbivory and insect adaptations. *AoB Plants.* 2018;10:ply037. DOI 10.1093/aobpla/ply037.
- Wasternack C., Strnad M. Jasmonates: news on occurrence, biosynthesis, metabolism and action of an ancient group of signaling compounds. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(9):pii: E2539. DOI 10.3390/ijms19092539.

ORCID ID

S.D. Rumyantsev orcid.org/0000-0002-5331-448X
S.V. Veselova orcid.org/0000-0002-1219-2383
G.F. Burkhanova orcid.org/0000-0003-2346-3502
I.V. Maksimov orcid.org/0000-0002-5707-3265

Благодарности. Работа выполнена в рамках госзадания по теме № AAAA-A16-116020350027-7 и частично – по теме № AAAA-A19-119021190011-0 с использованием оборудования ЦКП «Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии, Региональный центр коллективного пользования «Агидель») и уникальной научной установки «КОДИНК».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.


Поступила в редакцию 01.06.2019. После доработки 26.07.2019. Принята к публикации 29.07.2019.

Пятая международная научная конференция PlantGen2019

Эндофитные бактерии *Bacillus* spp. с РНКазной активностью и устойчивость картофеля к вирусам

Г.Ф. Бурханова , А.В. Сорокань, Е.А. Черепанова, Е.Р. Сарварова, Р.М. Хайруллин, И.В. Максимов

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

 e-mail: guzel_mur@mail.ru

Вирусные заболевания ежегодно вызывают существенные потери урожая и заметно снижают качество продукции, в том числе важнейшей сельскохозяйственной культуры – картофеля. Антивирусных препаратов для растениеводства, которые были бы безопасны для человека и животных, не существует, и в этих условиях перспективным методом защиты растений является использование биопрепаратов на основе эндофитных микроорганизмов, продуцирующих РНКазы. В работе проанализирована способность ряда эндофитных штаммов *Bacillus* spp. продуцировать РНКазы и влиять на пораженность растений вирусом М, широко распространенным в средней полосе России, и урожайность раннеспелого сорта картофеля Удача в полевых условиях. Обнаружено, что обработка штаммами бактерий *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* снижала степень инфицированности растений вирусом М с 60 % в контроле до 18–30 % на участках, обработанных микроорганизмами. Аналогичным образом снизился индекс развития вирусной инфекции: с 14 % в контроле до 1–7 % у инокулированных растений. Кроме того, бактерии с высокой РНКазной активностью вызывали прибавку урожая картофеля до 40 %. Предполагается, что изученные бактерии способны не только повышать рост и урожайность картофеля, но и, благодаря своей РНКазной активности, подавлять распространение вируса М. Дальнейшее изучение молекулярных механизмов, связанных с индукцией эндофитными бактериями защитных реакций растений в ответ на вирусные инфекции, приведет к лучшему пониманию фитоиммунитета растений. Более того, эндофитные штаммы *Bacillus* spp. с высокой РНКазной активностью могут стать основой для биопрепаратов комплексной защиты растений.


Ключевые слова: бактерии; РНКазы; вирусы; картофель.

Для цитирования: Бурханова Г.Ф., Сорокань А.В., Черепанова Е.А., Сарварова Е.Р., Хайруллин Р.М., Максимов И.В. Эндофитные бактерии *Bacillus* spp. с РНКазной активностью и устойчивость картофеля к вирусам. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(7):873-878. DOI 10.18699/VJ19.561

Endophytic *Bacillus* bacteria with RNase activity in the resistance of potato plants to viruses

G.F. Burkhanova , A.V. Sorokan, E.A. Cherepanova, E.R. Sarvarova, R.M. Khairullin, I.V. Maksimov

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre, RAS, Ufa, Russia

 e-mail: guzel_mur@mail.ru

Viral diseases annually cause significant crop losses and significantly reduce the quality of products, including potatoes, some of the most important crops. Currently, viruses cannot be controlled with chemical pesticides, since known antiviral compounds are teratogenic and hazardous to people's health. Biocontrol agents based on endophytic microorganisms may be an alternative to them. Many strains of *Bacillus* produce ribonucleases (RNases). Our laboratory possesses a collection of bacteria that produce various metabolites and have RNase activity. The results showed that the inoculation of potato with *B. subtilis* 26D and *B. thuringiensis* increased the grain yield by 32–43 %. In addition, the treatment of potato plants with *Bacillus* spp. significantly reduced the infection of potato plants with virus M. The prevalence of the disease in potato plants was significantly reduced from 60 % in the control to 18 % (*B. subtilis* 26D) and 25–33 % (*B. thuringiensis*) in the inoculated plants. Similarly, the infection index decreased from 14 in the control to 1 in the inoculated plants. The further study of molecular mechanisms related to bacterial induction of plant defense reactions in response to viral infections will lead to a better understanding of stress resistance problems. The endophytic microorganisms studied in this report may become the basis for the creation of biological agents for plant protection.

Key words: ribonuclease; phytopathogenic RNA-viruses; *Solanum tuberosum*.

For citation: Burkhanova G.F., Sorokan A.V., Cherepanova E.A., Sarvarova E.R., Khairullin R.M., Maksimov I.V. Endophytic *Bacillus* bacteria with RNase activity in the resistance of potato plants to viruses. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(7):873-878. DOI 10.18699/VJ19.561 (in Russian)

Введение

Существенные потери урожая (до 30 %) и заметное снижение качества продукции одной из важнейших продовольственных культур в мире, картофеля (*Solanum tubero-*

sum), связаны с вирусами. Известно более 40 видов вирусов, которые заражают картофель, многократно уменьшая продуктивность и ухудшая товарные свойства клубней, что описывается термином «вырождение сорта»

(Makarova et al., 2017). В числе главных магистральных путей борьбы с вирусной инфекцией остается селекция на вирусостойчивость. Однако источников генов иммунитета к важным вирусам с доминантным моногенным типом наследования не так много (Nicaise, 2017). Методически более эффективными в этих условиях оказались технологии редактирования геномов с использованием систем CRISPR/Cas9 (Romay, Bragard, 2017) и трансгеноза, когда в геном хозяйственно ценного сорта путем генетической трансформации вводятся определенные гены (Prins et al., 2008), например, кодирующие синтез потенциально антивирусных белков (интерферона, рибонуклеаз), белков, токсичных для насекомых (Cry и Vip из бактерии *B. thuringiensis*, ингибиторы протеиназ), или белков самого вируса (Сташевски, Ильинская, 2009; Chung et al., 2013).

Несмотря на достаточный объем практических разработок препаратов для защиты растений от болезней на основе ризосферных и эндофитных штаммов бактерий, в научной литературе мало сведений о проявлении ими антивирусной активности, их влиянии на распространение и накопление вирусов в растительных тканях. Бицидная активность бактерий рода *Bacillus*, придаваемая им специфическими инсектицидными белками (белки Cry и Vip из *B. thuringiensis*), бактериоцинами и липопептидами (Rodríguez et al., 2018), предполагает, что они способны опосредованно защищать растения от вирусов, воздействуя на их переносчиков, к которым относятся бактерии (фитопатогенные), простейшие, грибы, нематоды и насекомые-фитофаги. Соответственно, использование биопрепаратов-фунгицидов и инсектицидов на основе бактерий для борьбы с фитопатогенами и вредителями должно помочь и в снижении уровня размножения вирусов в растениях. Важно отметить, что в настоящее время наиболее перспективным считается поиск эндофитных микроорганизмов, которые, обитая во внутренних тканях растений, менее подвержены влиянию окружающей среды и в большей степени интегрированы в метаболизм растений, чем микроорганизмы ризо- и филлосферы.

Многие виды рода *Bacillus* проявляют свойства эндофитности (Burkhanova et al., 2017) и продуцируют ферменты с рибонуклеазной активностью (Ulyanova et al., 2016; Pinskaya et al., 2018). Так, 73 % выделенных из растений семейства Cucurbitaceae изолятов *Bacillus* продуцировали нуклеазы (Khalaf, Raizada, 2018). Синтез секретлируемых ферментов, включая РНКазы, которые участвуют в мобилизации фосфатов из органических соединений, является одним из способов адаптации бактерий к изменяющимся условиям обитания. В низких концентрациях они стимулируют рост и устойчивость растений и микроорганизмов к стрессам, а в высоких – обладают противовирусной активностью, разрушая вирусные РНК. Микробные РНКазы – это потенциальные терапевтические агенты, предложенные для терапии вирусных заболеваний человека (Mahmud et al., 2017). В связи с этим выявление биологических свойств эндофитных бактерий *Bacillus* spp. актуально для создания биопрепаратов с комплексной (антивирусной, иммунизирующей и рост-стимулирующей) активностью для экологически безопасной защиты растений картофеля от болезней и вредителей.

Целью данной работы была оценка РНКазной активности ряда штаммов эндофитных бактерий из коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики (ИБГ) УФИЦ (<http://ibg.anrb.ru/wp-content/uploads/2019/04/Katalog-endofit.doc>) и их влияния на устойчивость картофеля раннеспелого сорта Удача к фитопатогенным вирусам (вирусу картофеля М) в полевых условиях и урожайность.

Материалы и методы

При проведении экспериментов использованы штаммы бактерий *B. subtilis* 26Д, *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (B-5689), *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (B-5351), любезно предоставленные для исследований ООО НВП «Башинком». Изоляты *B. subtilis* Stl-7, *B. subtilis* Stk-18, *B. subtilis* Stk-22 выделены из поверхностно стерилизованных тканей листьев картофеля различных сортов, произрастающих на территории Иглинского района Республики Башкортостан. Все штаммы бактерий идентифицированы на основании секвенирования нуклеотидной последовательности 16S РНК. Бактерии культивировали на среде LB в термостате ES-20 (Biosan, Латвия) при 25–27 °С. В экспериментах по оценке эндофитности и влияния бактерий на антивирусную активность и урожайность картофеля использовали суточные культуры.

Количественную оценку внеклеточной активности РНКаз в среде культивирования бактерий определяли согласно методике (Hole et al., 2004). Для этого штаммы выращивали на среде LB с добавлением дрожжевой РНК (6 г/л) (Sigma, США) при 30 °С. Через 48 ч культивирования чашки Петри с выращенными на поверхности питательной среды колониями бактерий заливали 3 мл 1 М хлорной кислоты и выдерживали в течение 5 мин для осаждения РНК. При отсутствии РНКаз среда культивирования становилась молочно-белой, а при наличии фермента вокруг бактериальной колонии формировалось прозрачное гало. Внеклеточную РНКазную активность оценивали, измеряя расстояние от края колонии до соответствующей линии. Количественную оценку внеклеточной РНКазной активности проводили в культуральном фильтрате с использованием спектрофотометра UNICO 2800 (США) при длине волны 260 нм по методике (Маргулис и др., 2012). Скорость ферментативной реакции оценивали по тангенсу угла наклона прямолинейного восходящего участка кривой зависимости светопоглощения от времени и выражали в увеличении поглощения за 1 мин на 1 мг белка.

Для определения эндофитности бактерий использовали пробирочные стерильные растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Удача, культивируемые в течение 25 сут при 16-часовой освещенности 12–16 тыс. люкс (лампы Osram L 36W/77, Германия) в климатикамере КС200 (Смоленское СКТБ СПУ, Россия) на агаризованной среде Мурасиге–Скуга. Растения картофеля инокулировали экспериментальными штаммами микроорганизмов согласно методике, представленной в работе (Maksimov et al., 2015). Оценивали эндофитность путем определения числа колониеобразующих единиц (КОЕ) микроорганизмов в поверхностно стерилизованных тканях растений через 7 дней после инокуляции. Для этого навески по-

верхностно-стерилизованного растительного материала гомогенизировали в стерильных ступках. Затем их аликвоты распределяли по поверхности картофельно-глюкозного агара до полного высыхания. Чашки Петри инкубировали при температуре 28 °С в термостате ТС-1/20 СПУ (Смоленское СКТБ СПУ) в течение 24 ч. Подсчет КОЕ бактерий производили во втором и третьем разведении, их количество пересчитывали на 1 г сырой массы растений.

Полевые исследования выполнялись на опытных полях Уфимского федерального исследовательского центра (Бирская опытная станция, 55°24'27" с. ш., 55°36'39" в. д.). Подготовка почвы и технология выращивания картофеля общепринятые для региона. Растения изучаемого ранне-спелого сорта Удача, культивируемого на указанной территории, высажены в трех повторностях, по 30 растений в каждой. В эксперименте использованы три варианта обработки двухнедельных всходов картофеля суспензией бактерий *B. subtilis* 26Д, *B. thuringiensis* В-5689, *B. thuringiensis* В-5351 в отдельности (100 мл/растение, 10⁶ клеток/мл), а также контрольная обработка – опрыскивание водой. Опрыскивание повторяли после цветения таким же образом. На наличие вирусов растения оценивали с использованием иммуно-хроматографических наборов для экспрессного определения вирусов Х, Y, S, М и вируса скручивания листьев картофеля (ВСКЛК) по методике фирмы ООО «АгроДиагностика» (Москва). Фенологические наблюдения и диагностику вирусов осуществляли визуально до цветения растений, согласно (Методика..., 1995). Данные по урожайности обработаны методом дисперсионного анализа по Б.А. Доспехову (1985). Эксперименты проводили в трех биологических повторностях. Статистический анализ выполнен с использованием стандартных математических методов в компьютерной программе Microsoft Excel.

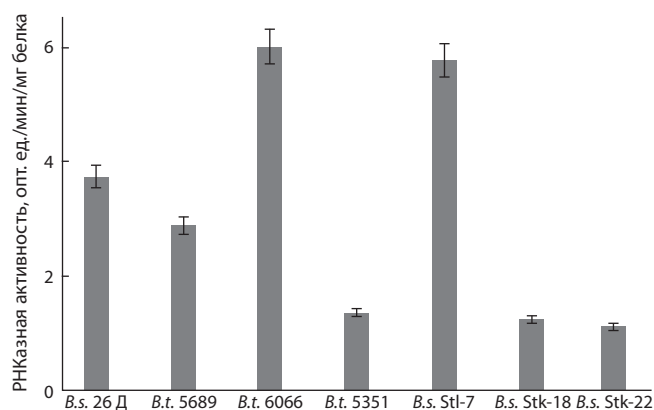
Результаты

Скрининг коллекционных штаммов и изолятов бактерий из лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН показал наличие у них РНКазной активности. РНКазная активность была оценена методом измерения ширины развития гало и спектрофотометрически (табл. 1, см. рисунок). Между штаммами и изолятами, взятыми на анализ, наблюдались определенные различия в изменении ширины гало (см. табл. 1). С одной стороны, все использованные в эксперименте штаммы бактерий рода *Bacillus* обладали РНКазной активностью, при этом максимально высокая активность отмечена у изолята *B. subtilis* Stl-7, а минимальная – у штамма *B. thuringiensis* var. *kurstaki* В-5351. Вместе с тем выделенные из кишечника колорадского жука изоляты, такие как *Enterobacter* spp., идентифицированные ранее с использованием специфических праймеров, не имели внеклеточных РНКаз при тех же условиях выращивания (см. табл. 1).

Наибольшая активность РНКаз наблюдалась у бактерий штаммов *B. thuringiensis* var. *kurstaki* В-6066, *B. subtilis* Stl-7, *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* В-5689, что подтверждает применимость метода гало для скрининговых исследований (см. рисунок). Действительно, в работе (Hole et al., 2004) показана прямая корреляция между диаметром гало вокруг бактериальной колонии и

Таблица 1. РНКазная активность коллекционных штаммов и изолятов

Штаммы, изоляты	Гало, мм
<i>B. subtilis</i> 26Д	4.5
<i>B. subtilis</i> Stl-7	6.5
<i>B. subtilis</i> Stk-18	3.0
<i>B. subtilis</i> Stk-22	4.5
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> В-6066	4.0
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i> В-5689	5.0
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> В-5351	2.0
<i>Enterobacter</i> sp. BeP	0
<i>Enterobacter</i> sp. m10	0
<i>Enterobacter</i> sp. m9	0



РНКазная активность штаммов *Bacillus* spp. в культуральном фильтрате.

концентрацией РНКазы, а также временем анализа. Следовательно, мы подтвердили, что по размеру гало можно судить об активности РНКаз, синтезируемых различными штаммами бактерий.

Штаммы *B. subtilis* 26Д, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* В-5351 и *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* В-5689 были оценены на эндофитность (табл. 2). Бактерии *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* var. *kurstaki* В-5351 обнаруживались в тканях растений картофеля в количестве порядка 10⁵ КОЕ/г сырой массы. Бактерий штамма *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* В-5689 в тканях растений было меньше, их количество составило не более 10³ КОЕ/г сырой массы. Таким образом, проанализированные штаммы *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* var. *kurstaki* В-5351 обладали большей способностью колонизировать внутренние ткани растений в сравнении со штаммом *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* В-5689.

Вероятно, применение бактерий, обладающих, с одной стороны, высокой РНКазной активностью, а с другой – способностью эффективно колонизировать ткани растений, может способствовать снижению степени развития вирусов на посадках картофеля. Для доказательства этого предположения штаммы бактерий *B. subtilis* 26Д,

Таблица 2. Оценка содержания КОЕ бактерий рода *Bacillus* во внутренних тканях растений картофеля и их влияние на пораженность картофеля сорта Удача вирусом М и его урожайность

Показатель	Контроль (H ₂ O)	<i>B. subtilis</i> 26Д	<i>B. thuringiensis</i>	
			var. <i>thuringiensis</i> B-5689	var. <i>kurstaki</i> B-5351
КОЕ/г сырой массы	0	5 · 10 ⁵	5 · 10 ³	1 · 10 ⁵
Растения, пораженные вирусом М, %	60	18	33	25
Среднее развитие вируса М, % пораженных листьев на растении	14	1	1	7
Урожайность, ц/га	182.45 ± 12.38	241.91 ± 22.67	261.03 ± 23.59	205.58 ± 15.60
Прибавка, % от контроля	–	32	43	12

B. thuringiensis var. *kurstaki* B-5351 и *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* B-5689 были испытаны в полевых условиях на посадках картофеля сорта Удача.

Предварительная оценка растений картофеля сорта Удача на наличие вирусов Х, Y, S и М и вируса скручивания листьев картофеля с использованием иммуно-хроматографических наборов фирмы ООО «Агродиагностика» показала высокий уровень инфицированности вирусом М (см. табл. 2). В полевых условиях на контрольных делянках почти 60 % растений картофеля сорта Удача были заражены вирусом М. Оценка степени развития болезни показала до 14 % визуально проявляемых симптомов.

В тех же условиях обработка растений картофеля экспериментальными штаммами бактерий заметно снижала как степень поражения, так и проявление вирусной инфекции. Наименьшее количество растений с симптомами вирусного заболевания наблюдалось на делянках, обработанных *B. subtilis* 26Д. Обработка картофеля штаммом бактерии *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* B-5689 (с низкой эндофитностью и высокой РНКазной активностью) двукратно снижала число растений с симптомами. Пораженность листьев на одном растении не превышала 1 %. Применение штамма бактерии *B. thuringiensis* var. *kurstaki* B-5351 (с низкой РНКазной активностью и высокой эндофитностью) препятствовало распространению вирусов. Однако пораженность растений в данном варианте была выше, чем при обработке штаммами с высокой активностью внеклеточного фермента. Вероятно, в последнем случае распространение инфекции было связано с инсектицидным эффектом *B. thuringiensis* var. *kurstaki* B-5351 (Сорокань и др., 2018).

Важно, что обработка бактериями *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* B-5689 значительно увеличивала урожайность картофеля, что могло быть обусловлено как их противовирусной активностью, так и рост-стимулирующим эффектом. При использовании *B. thuringiensis* var. *kurstaki* B-5351 прибавка урожая была менее значительной и составила 12 % от контроля.

Обсуждение

Известно, что многие бактерии, в особенности из рода *Bacillus*, обладают широким спектром ферментов с РНКазной активностью, а также нуклеаз и других белков, отвечающих за РНК-интерференцию (Aguilar-Pulido et al., 2016). Например, бактерии *B. amyloliquefaciens*, *B. in-*

termedius и *B. licheniformis* могут вырабатывать внеклеточные рибонуклеазы, названные барназами, биназами и балифазами соответственно (Ulyanova et al., 2011, 2016). Установлено, что *B. cereus* ZH14 продуцирует новый тип противовирусной рибонуклеазы, которая секретируется в среду и активна против вируса табачной мозаики (Zhou, Niu, 2009). Представители рода *Bacillus*, к которому принадлежат чаще всего используемые в защите растений штаммы *B. subtilis* и *B. thuringiensis*, также секретируют ферменты, проявляющие антивирусные и антираковые свойства (Ulyanova et al., 2011). Было показано, что введение гена бактериальной РНКазы в геном растений кукурузы (Zhang et al., 2001) и ячменя (Cao et al., 2013) подавляло развитие вирусной инфекции. Вероятно, с этим связана непосредственная способность РНКаз из *Pseudomonas putida* A3 разрушать частицы вируса табачной мозаики (BTM) в течение 30 мин в соке из инфицированных листьев табака (Guo et al., 2011; Yang et al., 2012). Согласно нашим данным, штаммы с высокой РНКазной активностью *in vitro* существенно снижали интенсивность развития симптомов вируса М на растениях картофеля сорта Удача в полевых условиях в сравнении со штаммами с низкой РНКазной активностью.

Многочисленное уменьшение степени поражения растений свеклы вирусом некротического пожелтения жилок (BNYVV) выявлено после их обработки бактерией *B. amylolequifaciens*, что коррелировало с уменьшением численности гриба *Polymyxa betae* и экспрессией растительных генов защитных белков (PR-8, NPR-1) (Desoignes et al., 2013). Обнаружено, что изолят *B. subtilis* BS3A25 и его культуральный фильтрат сдерживают развитие вируса мозаики огурца на томатах посредством угнетения переносчика этого заболевания – бахчевой тли *Aphis gossypii* (Sudhakar et al., 2011).

Поскольку большинство фитовирусов в качестве инфекционного начала содержат РНК, интерес представляет создание биопрепаратов на основе ризосферных и эндофитных бактерий с высокой РНКазной активностью или же грубого препарата самой РНКазы для защиты растений от вирусной инфекции (Sharipova et al., 2015), а также создание генно-модифицированных растений с внедренным в них геном нуклеаз (Trifonova et al., 2018). Известно, что некоторые ферменты-нуклеазы обладают противовирусной активностью, и высокая устойчивость к патогенам наблюдается в трансгенных растениях карто-

феля, экспрессирующих, например, бактериальную нуклеазу *Serratia marcescens* (Trifonova et al., 2018).

Использованные в нашей работе штаммы проявляли также инсектицидный эффект против колорадского жука (Сорокань и др., 2018) и злаковой тли (Veselova et al., 2019), которая служит переносчиком вирусных заболеваний и на долю которой приходится до 20 % из всех видов тлей, поражающих картофель (Екатеринская и др., 2016). Обнаружено, что сами бактериальные барназы, помимо способности формировать защиту от вирусной инфекции, могут участвовать в защите растений от других болезней, например табака от фитофтороза, что доказано на трансгенных растениях, продуцирующих барназу (Natsoulis, Voeke, 1991). По данным Х.Х. Али с соавторами (2010), возбудитель фитофтороза сохраняет и распространяет с помощью своих зооспор вирус картофеля X. Ранее нами было показано, что *B. subtilis* 26Д эффективно снижает пораженность растений грибом *Phytophthora infestans* (Maksimov et al., 2015), что также может способствовать снижению распространенности вирусов. Важно отметить, что для эффективного подавления вирусных заболеваний необходимо постоянное присутствие противовирусных соединений непосредственно в тканях растений, что делает эндофитные микроорганизмы, продуцирующие РНКазы, перспективными агентами биоконтроля вирусов. Эти данные хорошо согласуются с одним из подходов в защите растений от вирусной инфекции путем использования эндофитных бактерий *Bacillus* spp., «усиленных» РНКазой, в качестве основы противовирусных препаратов для защиты растений. Однако данных о применении такого подхода при создании биопрепаратов с комплексом защитных свойств в научных публикациях не встречается.

Заключение

Исходя из полученных нами данных, можно сказать, что использование биопрепаратов на основе бактерий рода *Bacillus* снижает естественный вирусный инфекционный фон, который зависит от эндофитности штаммов и способности бактерий продуцировать внеклеточные РНКазы. Соответственно, защита растений при помощи эндофитных бактерий рода *Bacillus*, продуцентов РНКаз, может играть важную роль в предотвращении распространения фитовирусной инфекции, что позволяет приступить к разработке биопрепаратов с комплексной (антивирусной, инсектицидной, фунгицидной, бактерицидной, иммунизирующей и рост-стимулирующей) активностью для экологически безопасной защиты растений от болезней и вредителей.

Список литературы / References

Али Х.Х., Келдыш М.А., Помазков Ю.И. Новый переносчик вируса X картофеля – гриб *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Вестник РУДН. Сер.: Агрономия и животноводство. 2010;3:18-23. [Ali X.X., Keldish M.A., Pomazkov U.I. New vector of the potato virus X – *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Vestnik Rossiyskogo Universiteta Druzby Narodov. Seriya: Agronomiya i Zhivotnovodstvo = Bulletin of the RUDN University. Ser.: Agronomy and Livestock. 2010; 3:18-23. (in Russian)]
Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. М., 1985.
[Dospheov B.A. Methodology of Field Experience. Moscow, 1985. (in Russian)]

Екатеринская Е.М., Тайков В.В., Карпова О.В. Особенности лета крылатых тлей на посадках оздоровленного картофеля, выращиваемого в Костанайском НИИСХ. Защита картофеля. 2016; 1:3-5.
[Ekaterinskaya E.M., Taykov V.V., Karpova O.V. Features of the flight of winged aphids on plantings of virus-free potato grown at the Kostanay Research Institute of Agriculture. Zashhita Kartofelya = Potato Protection. 2016;1:3-5. (in Russian)]
Маргулис А.Б., Сиадат О.В., Никитина Е.В., Колпаков А.И., Ильинская О.Н. Гомосеринлактон как регулятор индуцибельных и конститутивных ферментов микроорганизмов. Вестн. Казан. технол. ун-та. 2012;15(17):173-176.
[Margulis A.B., Ciadat O.V., Nikitina E.V., Kolpakov A.I., Il'inskaja O.N. Homoserine lactone as a regulator of inducible and constitutive enzymes of microorganisms. Vestnik Kazanskogo Tekhnologicheskogo Universita = Bulletin of the Kazan National Research Technological University. 2012;15(17):173-176. (in Russian)]
Методика исследований по защите картофеля от болезней, вредителей, сорняков и иммунитету. М.: ВНИИКХ, 1995.
[Methodology of Studies on Potato Protection from Diseases, Pests, and Weeds and on Potato Immunity. Moscow: VNIKH Publ., 1995. (in Russian)]
Сорокань А.В., Беньковская Г.В., Благова Д.К., Максимова Т.И., Максимов И.В. Реакция защитной системы и изменения в составе кишечных симбионтов колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* под влиянием эндофитных бактерий рода *Bacillus*. Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 2018;54(4):264-270.
[Sorokan A.V., Benkovskaja G.V., Blagova D.K., Maksimova T.I., Maksimov I.V. Defense responses and changes in symbiotic gut microflora in the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* under the effect of endophytic bacteria from the genus *Bacillus*. Zhurnal Evolyutsionnoy Biokhimii i Fiziologii = Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2018;54(4):264-270. (in Russian)]
Сташевски З., Ильинская О.Н. Вирусостойчивость трансгенных растений картофеля *Solanum tuberosum* L., несущих *PVY^{NTN}-CP* ген белка оболочки Y вируса картофеля. Экол. генетика. 2009; 7(4):41-50.
[Stasevski Z., Ilinskaja O.N. *PVY^{NTN}-CP* coat protein gene mediated virus resistance of transgenic potato plants. Ekologicheskaya Genetika = Ecological Genetics (St. Petersburg). 2009;7(4):41-50. (in Russian)]
Aguiar-Pulido V., Huang W., Suarez-Ulloa V., Cickovski T., Mathee K., Narasimhan G. Metagenomics, metatranscriptomics, and metabolomics approaches for microbiome analysis. Evol. Bioinform. 2016; 12(S1):5-16. DOI 10.4137/EBO.S36436.
Burkhanova G.F., Veselova S.V., Sorokan A.V., Blagova D.K., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. Strains of *Bacillus* ssp. regulate wheat resistance to *Septoria nodorum* Berk. Appl. Biochem. Microbiol. 2017;53(3):346-352. DOI 10.1134/S0003683817030048.
Cao X., Lu Y., Di D., Zhang Z., Liu H., Tian L., Zhang A., Zhang Y., Shi L., Guo B., Xu J., Duan X., Wang X., Han C., Miao H., Yu J., Li D. Enhanced virus resistance in transgenic maize expressing a dsRNA-specific endoribonuclease gene from *E. coli*. PLoS One. 2013;8(4):e60829. DOI 10.1371/journal.pone.0060829.
Chung B.N., Yoon J.Y., Palukaitis P. Engineered resistance in potato against potato leafroll virus, potato virus A and potato virus Y. Virus Genes. 2013;47:86-92. DOI 10.1007/s11262-013-0904-4.
Desoignes N., Schramme F., Ongena M., Legrève A. Systemic resistance induced by *Bacillus* lipopeptides in *Beta vulgaris* reduces infection by the rhizomania disease vector *Polymyxa betae*. Mol. Plant Pathol. 2013;14(4):416-421. DOI 10.1111/mpp.12008.
Guo M., Chen Y., Du Y., Dong Y., Guo W., Zhai S., Zhang H., Dong S., Zhang Z., Wang Y., Wang P., Zheng X. The bZIP transcription factor MoAP1 mediates the oxidative stress response and is critical for pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. PLoS Pathog. 2011;7(2):e1001302. DOI 10.1371/journal.ppat.1001302.

- Hole R.C., Singhal R.S., Melo J.S., D'Souza S.F. A rapid plate screening technique for extracellular ribonuclease producing strains. *BARC Newsletter*. 2004;249:91-97.
- Ilinskaya O., Ulyanova V., Lisevich I., Dudkina E., Zakharchenko N., Kusova A., Faizullin D., Zuev Y. The native monomer of *Bacillus pumilus* ribonuclease does not exist extracellularly. *BioMed Res. International*. 2018;4837623. DOI 10.1155/2018/4837623.
- Khalaf E.M., Raizada M.N. Bacterial seed endophytes of domesticated cucurbits antagonize fungal and oomycete pathogens including powdery mildew. *Front. Microbiol.* 2018;9:42. DOI 10.3389/fmicb.2018.00042.
- Mahmud S.R., Müller C., Romanova Y., Mostafa A., Ulyanova V., Pleschka S., Ilinskaya O. Ribonuclease from *Bacillus* acts as an antiviral agent against negative- and positive-sense single stranded human respiratory RNA viruses. *BioMed Res. International*. 2017; 5279065. DOI 10.1155/2017/5279065.
- Makarova S.S., Makarov V.V., Taliansky M.E., Kalinina N.O. Virus resistance in potato: current state and prospects. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2017;7(8):845-857. DOI 10.1134/S2079059717050148.
- Maksimov I.V., Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Sarvarova E.R., Khairullin R.M. Plant growth-promoting bacteria in regulation of plant resistance to stress factors. *Russ. J. Plant Physiol.* 2015;62(6):715-726. DOI 10.1134/S1021443715060114.
- Natsoulis G., Boeke J.D. New antiviral strategy using capsid-nuclease fusion proteins. *Nature*. 1991;352:632-635.
- Nicaise V. Boosting innate immunity to sustainably control diseases in crops. *Curr. Opin. Virol.* 2017;26:112-119. DOI 10.1016/j.coviro.2017.07.030.
- Prins M., Laimer M., Noris E., Schubert J., Wassenegger M., Tepfer M. Strategies for anti-viral resistance in transgenic plants. *Mol. Plant Pathol.* 2008;9(1):73-83. DOI 10.1111/j.1364-3703.2007.00447.x.
- Rodríguez M., Marín A., Torres M., Béjar V., Campos M., Sampedro I. Aphicidal Activity of Surfactants Produced by *Bacillus atrophaeus* L193. *Front. Microbiol.* 2018;9:3114. DOI 10.3389/fmicb.2018.03114.
- Romay G., Bragard C. Antiviral defenses in plants through genome editing. *Front. Microbiol.* 2017;8:47. DOI 10.3389/fmicb.2017.00047.
- Sharipova M., Rockstroh A., Balaban N., Mardanova A., Toymen-tseva A., Tikhonova A., Vologin S., Stashevsky Z. Antiviral effect of ribonuclease from *Bacillus pumilus* against phytopathogenic RNA-viruses. *Agric. Sci.* 2015;6:1357-1366. DOI 10.4236/as.2015.611130.
- Sudhakar N., Thajuddin N., Murugesana K. Plant growth-promoting rhizobacterial mediated protection of tomato in the field against cucumber mosaic virus and its vector *Aphis gossypii*. *Biocontrol Sci. Technol.* 2011;21(3):367-386. DOI 10.1080/09583157.2011.552969.
- Trifonova E.A., Ibragimova S.M., Volkova O.A., Shumny V.K., Kochetov A.V. Ribonuclease activity as a new prospective disease resistance marker in potato. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekt-sii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(8):987-991. DOI 10.18699/VJ18.441.
- Ulyanova V., Mahmud R.Sh., Dudkina E., Vershinina V., Domann E., Ilinskaya O. Phylogenetic distribution of extracellular guanyl-preferring ribonucleases renews taxonomic status of two *Bacillus* strains. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2016;62:181-188. DOI 10.2323/jgam.2016.02.005.
- Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O. Barnase and binase: twins with distinct fates. *FEBS J.* 2011;278(19):3633-3643. DOI 10.1111/j.1742-4658.2011.08294.
- Veselova S.V., Burkhanova G.F., Rummyantseva S.D., Blagova D.K., Maksimov I.V. Strains of *Bacillus* ssp. regulate wheat resistance to greenbug aphid *Schizaphis graminum* Rond. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2019;55:46-52. DOI 10.1134/S0003683819010186.
- Yang J., Guo C., Zhai X., Shen L., Qian Y., Wang F. Inactivation of Tobacco mosaic virus in soil by *Pseudomonas putida* A3-m strain to prevent virus mosaic disease. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2012;6:6300-6307. DOI 10.5897/AJMR12.1123.
- Zhang L., French R., Langenberg W.G., Mitra A. Accumulation of barley stripe mosaic virus is significantly reduced in transgenic wheat plants expressing a bacterial ribonuclease. *Transgenic Res.* 2001; 10(1):13-19.
- Zhou W.W., Niu T.G. Purification and some properties of an extracellular ribonuclease with antiviral activity against tobacco mosaic virus from *Bacillus cereus*. *Biotechnol. Lett.* 2009;1:101-105. DOI 10.1007/s10529-008-9831-1.

ORCID ID

G.F. Burkhanova orcid.org/0000-0003-2346-3502
A.V. Sorokan orcid.org/0000-0002-0443-7547
E.A. Cherepanova orcid.org/0000-0002-9976-0944
E.R. Sarvarova orcid.org/0000-0002-0599-7618
R.M. Khairullin orcid.org/0000-0001-86130786
I.V. Maksimov orcid.org/0000-0002-5707-3265

Благодарности. Работа выполнена в рамках совместного международного гранта РФФИ и Департамента науки и техники (DST) правительства Индии, № 19-46-02004.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 05.06.2019. После доработки 26.08.2019. Принята к публикации 26.08.2019.

The Fifth International Scientific Conference PlantGen2019

Phytopathological screening and molecular marker analysis of wheat germplasm from Kazakhstan and CIMMYT for resistance to tan spot

A.M. Kokhmetova^{1,2}✉, M.N. Atishova¹, M.T. Kumarbayeva^{1,2}, I.N. Leonova³¹ Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan² Kazakh National Agrarian University, Almaty, Kazakhstan³ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: gen_kalma@mail.ru

Tan spot caused by the fungus *Pyrenophora tritici-repentis* is an important leaf spot disease in wheat growing areas throughout the world. The study aims to identify wheat germplasm resistant to tan spot based on phytopathological screening and molecular marker analysis. A collection of 64 common wheat germplasms, including cultivars and breeding lines from Kazakhstan and CIMMYT, was assessed for tan spot resistance in greenhouse conditions and characterized using the *Xfcp623* molecular marker, diagnostic for the *Tsn1* gene. All wheat cultivars/lines varied in their reaction to tan spot isolate race 1, ranging from susceptible to resistant. Most accessions studied (53 %) were susceptible to Ptr race 1. Spring wheat cultivars were more susceptible to race 1 than winter wheat cultivars. As a result of genotyping, an insensitive reaction to Ptr ToxA was predicted in 41 wheat cultivars (64 %). The *tsn1* gene carriers identified included 27 Kazakhstani and 14 CIMMYT cultivars/lines, demonstrating insensitivity to Ptr ToxA. The majority of the *Tsn1* genotype were sensitive to race 1 and showed susceptibility to the pathogen in the field. Disease scores from seedling stage positively correlated with field disease ratings. Of particular interest are 27 wheat accessions that demonstrated resistance to spore inoculation by Ptr race 1, were characterized by insensitivity to ToxA and showed field resistance to the pathogen. The results of this study will contribute to wheat breeding programs for tan spot resistance with Marker Assisted Selection using the closely flanking markers.

Key words: wheat; molecular markers; *Pyrenophora tritici-repentis*; tan spot; *Tsn1*; ToxA.

For citation: Kokhmetova A.M., Atishova M.N., Kumarbayeva M.T., Leonova I.N. Phytopathological screening and molecular marker analysis of wheat germplasm from Kazakhstan and CIMMYT for resistance to tan spot. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(7):879-886. DOI 10.18699/VJ19.562

Фитопатологический скрининг и молекулярный анализ гермоплазмы пшеницы из Казахстана и CIMMYT на устойчивость к пиренофорозу

A.M. Кохметова^{1,2}✉, М.Н. Атишова¹, М.Т. Кумарбаева^{1,2}, И.Н. Леонова³¹ Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан² Казахский национальный аграрный университет, Алматы, Казахстан³ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: gen_kalma@mail.ru

Пиренофороз, возбудитель *Pyrenophora tritici-repentis*, является важным заболеванием листовых пятнистостей в регионах выращивания пшеницы по всему миру. Цель исследования – идентифицировать и отобрать гермоплазму пшеницы, устойчивую к пиренофорозу *P. tritici-repentis*, с использованием молекулярных маркеров. Коллекция из 64 образцов мягкой пшеницы, включающая зарегистрированные сорта и элитные селекционные линии пшеницы из Казахстана и CIMMYT, была подвергнута оценке устойчивости к *P. tritici-repentis* в теплице и охарактеризована с помощью молекулярного маркера *Xfcp623*, диагностического для гена *Tsn1*. Все сорта/линии пшеницы различались по реакции на изолят расы 1 Ptr, проявляя широкий спектр реакции – от восприимчивой до устойчивой. Большинство исследованных образцов (53 %) оказались восприимчивы к изоляту расы 1 Ptr. Сорта яровой пшеницы были более восприимчивы к расе 1, чем сорта озимой пшеницы. В результате генотипирования нечувствительная реакция к токсину Ptr ToxA была предсказана у 41 сорта пшеницы (64 %). Идентифицированные носители гена *tsn1* включали 27 казахстанских и 14 сортов/линий CIMMYT, демонстрировавших нечувствительность к Ptr ToxA. Большинство образцов с генотипом *Tsn1* были чувствительны к расе 1 и показали восприимчивость к патогену в полевых условиях. Оценки заболеваемости на стадии проростков положительно коррелировали с оценками в полевых условиях. Особый интерес представляют 27 образцов пшеницы, которые проявили устойчивость к инокуляции спор расы 1

P. tritici-repentis, характеризовались нечувствительностью к токсину ToxA и демонстрировали устойчивость к патогену в полевых условиях. Полученные результаты внесут вклад в программы селекции пшеницы на устойчивость к пиренофорозу на основе Marker Assisted Selection с использованием тесно фланкирующих маркеров.

Ключевые слова: пшеница; молекулярные маркеры; *Pyrenophora tritici-repentis*; пиренофороз; *Tsn1*; ToxA.

Introduction

Ensuring food security is the most important priority of Kazakhstan's economic strategy. Wheat production is limited to a number of biotic stresses, including leaf spot diseases. Tan spot, caused by the fungus *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler (anamorph), is an important foliar blight disease in temperate and warmer wheat growing areas throughout the world (Duveiller et al., 1998), including Kazakhstan (Koyshibayev, 2018). Under conditions favorable for tan spot development, yield losses can rise beyond 50 % (Rees et al., 1988). This pathogen infects leaf, stem and head tissue resulting in reduced photosynthetic area, increased transpiration and reduced accumulation of organic matter and causes considerable reduction in yield and quality of wheat. Modern industrial farming technologies contribute to the development of the disease: minimal tillage of the soil with the preservation of stubble on its surface, monoculture and cultivation of wheat cultivars with insufficient resistance to pathogen. The infected seeds, plant residues of the previous growing season, infected self-seeding plants and wild cereals susceptible to this disease could serve as a source of infection to winter wheat seedlings in autumn. Integrated disease control strategies, such as the cultivation of resistant varieties, combined with desired crop rotations and management practices, are the most effective, environmentally friendly and cost-effective tools to combat wheat tan spot (Mikhailova et al., 2012).

Inheritance to tan spot resistance has both quantitative and qualitative nature, while the toxins resistance genes and quantitative trait loci (QTL) are race specific and they control the processes that reduce the sensitivity to toxins (Mikhailova et al., 2012; Faris et al., 2013; Liu et al., 2017). To date according to Catalogue of Gene Symbols eight major resistance genes (*Tsr1*, *Tsr2*, *Tsr3*, *Tsr4*, *Tsr5*, *Tsr6*, *TsrHar*, *TsrAri*) located on chromosomes 2BS, 3A, 3BL, 3DS, and 5BL have been identified (McIntosh et al., 2013). Numerous genetic studies performing quantitative trait loci analysis, have reported resistance to tan spot as a polygenic trait however the major racespecific genes frequently underlines these QTLs. Additional QTLs have been identified and located on chromosome arms 1AL, 2AS, 3AS, 4AL, 5AL, 1BS, 2BL, 3BS, 2DS, 2DL, 6A, 7A, and 7DS (Chu et al., 2010; Singh et al., 2010, 2016; Xiao-Chun et al., 2010; Kalia et al., 2018). Recent studies using associative mapping allowed the detection of loci that determine resistance to different Ptr races (Gurung et al., 2011; Kollers et al., 2014; Juliana et al., 2018).

In order to increase effectiveness of wheat breeding subject to resistance to tan spot, it is essential to understand the genetic basis of resistance to the disease. *Pyrenophora tritici-repentis* induces on susceptible cultivars two different symptoms, necrosis and chlorosis. Genetically, both symptoms are under independent host control. Based on the ability to induce necrosis and chlorosis symptoms, 8 races of Ptr were identified (Lamari, Bernier, 1989a; Strelkov, Lamari, 2003). It has been found that the fungus produces a number of host-selective

toxins (HSTs) known as Ptr ToxA, Ptr ToxB and Ptr ToxC, etc., which interact directly or indirectly with the products of the dominant plant genes *Tsn1*, *Tsc2* and *Tsc1*, respectively (Ballance et al., 1989). Recent studies on cloning and characterization of the *Tsn1* gene have shown that the pathogen utilizes HST-toxins to weaken resistance mechanisms of the host and cause the disease. However, in addition to host-HST interactions, a wide range of QTLs responsible for race-non-specific resistance and recessively inherited genes of "qualitative" resistance have been identified (Faris, Friesen, 2005; Singh et al., 2016). Molecular markers for the HST resistance genes and for race non-specific QTLs intended for use in marker assisted selection (MAS) have been developed (Faris et al., 2012; <https://maswheat.ucdavis.edu/protocols>). Diversity Arrays Technology (DARt) WPT-3049 (2.9 cM) and WPT-0289 (4.6 cM) markers were closely linked to *Tsr1* and *Tsr6*, respectively (Singh et al., 2016).

There are a number of studies on the racial composition of *P. tritici-repentis* in Asia and Kazakhstan. The greatest diversity was observed in Azerbaijan, where races 1, 2, 3, 5, 7, and 8 were identified, and in Syria, where races 1, 3, 5, 7, and 8 were detected; the little variation was found in the virulence of isolates from Kazakhstan (race 1 and race 2) (Lamari et al., 2005). It has been revealed that race 1 is the most widespread race in Central Asia and Kazakhstan (87 %), and races 2, 3 and 4 were minor (Zhanarbekova et al., 2005; Maraite et al., 2006). It was found that races 1 and 2 dominate in the North Caucasus region of Russia, and races 1 and 8 *P. tritici-repentis* dominate in Kazakhstan (Kokhmetova et al., 2016). Studies on the racial composition of *P. tritici-repentis* in Kazakhstan indicate the necessity to identify the wheat germplasm resistant to the prevailing races of the disease among promising lines and wheat varieties cultivated in Kazakhstan. The results of previous studies indicate the possibility of postulating recessive alleles of genes for resistance to *P. tritici-repentis* toxins using molecular markers (Kokhmetova et al., 2017, 2018).

Conventional phytopathological methods are not always effective for identification of pathogen resistance genes. The situation is complicated by the fact that different leaf spot pathogens occur together in the field, which make more difficult disease evaluation. In this case, the use of molecular markers associated with disease resistance will be effective for identification of disease resistance factors. The presence of effective molecular markers closely linked to the genes of resistance to toxins makes it possible to conduct molecular screening of wheat breeding material. The main objectives of this study were (i) phytopathological and molecular screening elite cultivars and wheat breeding lines for resistance to tan spot, (ii) identification of resistance sources effective against tan spot.

Materials and methods

A collection of 64 common wheat germplasms, including 46 registered cultivars and elite wheat breeding lines from Ka-

Table 1. *Pyrenophora tritici-repentis* isolate (29A-11) served as representative of race 1

Isolate	Glenlea	6B-662	6B-365	Race*	Source	Location
29A-11	N (ToxA)	R	C (ToxC)	1 (nec+chl+)	Winter wheat	Almaty region of Kazakhstan

* Based on Lamari et al., 2005: N (ToxA) – disease inducing factor (Ptr ToxA), causing necrosis in Glenlea; C (ToxC) – disease inducing factor (Ptr ToxC), causing chlorosis in 6B-365; R – stand for resistance to toxins of *P. tritici-repentis*; nec+ – presence of necrosis; chl+ – presence of chlorosis.

zakhstan and 18 entries from CIMMYT was used in the work (see Table 2). Evaluation of the resistance to *P. tritici-repentis* on adult plant stage was carried out under field conditions of Southeast Kazakhstan, Kazakh Research Institute of Agriculture and Plant Growing (KRIAPG), Almalybak (43°13' N, 76°36' E, and 789 m asl), Almaty region, in the 2017–2018 crop seasons. The experiment was conducted in a completely randomized design with three replications. The field evaluation (from naturally occurring infections) to tan spot resistance was assessed three times according to the scale for appraising the foliar intensity of diseases (Saari, Prescott, 1975) in the modification for tan spot (Kremneva, Volkova, 2007).

The standard wheat differentials included Glenlea and Salamouni cultivars, as well as 6B662 and 6B365 lines. Seedling resistance of the wheat cultivars were assayed in the greenhouse conditions at the two-leaf seedling stage. Three seedlings of each differential line and tested wheat cultivars were produced in plastic cones filled with soil and grown in the greenhouse at an average temperature of 21 °C with a 16-h photoperiod. The seedlings were inoculated with spore suspension with 4,000 spores per ml of each isolate individually until run off. Inoculated seedlings were moved to a mist chamber at 21 °C with a 16-h photoperiod for 24 h. Thereafter, the plants were moved to a growth chamber at 22 °C with a 16-h photoperiod for 24 h (light for 16 h and darkness for 8 h). The plants were rated for disease, using rating system based on lesion type; 1–2 represent resistance, and 3–5 represent susceptibility (Lamari, Bernier, 1989a).

The samples of *P. tritici-repentis* were randomly collected from hexaploid wheat in Almaty region of Kazakhstan. The Petri dishes with leaf pieces with lesions were incubated at 20 °C for 12–18 h under fluorescent lights (~80 μmol·m⁻²·s⁻¹), followed by an additional 12–18 h in the dark at 15 °C (Lamari et al., 1995). Two to three isolates from each field were tested. All *P. tritici-repentis* isolates were typed by their respective race through inoculating them individually on the wheat differential set developed by Lamari, Bernier (1989b) and Strelkov, Lamari (2003). It was found, that *P. tritici-repentis* isolate 29A-11 was related to race 1, since it was produced necrosis on Glenlea and chlorosis on 6B-365 and possible characterized by the production of two toxins: ToxA and ToxC (Table 1).

P. tritici-repentis isolate 29A-11, representing race 1 was used for inoculation. Culture of *P. tritici-repentis* isolate 29A-18 race 1 was grown on V4 agar (150 ml V4 juice in a ratio of 4:3:2:1 parts beet juice, parsley, tomato and carrot, respectively, 20 g agar, 1.5 g CaCO₃ and 850 ml distilled water) in the dark at 20–22 °C for 6 days (Mikhailova et al., 2012). The plates were filled with sterile distilled water; the mycelium flattened the base of a sterile test tube and excess water poured off. To induce conidiophore production, the plates were incubated under continuous light at room temperature for two days followed by 1 day in the dark in an incubator

at 16 °C to induce conidia production. The plates were filled with distilled water and the conidia were suspended in the distilled water by gentle brushing the mycelium to dislodge the conidia from the conidiophores. In order to reduce surface tension 2–3 drops of Tween 20 were added per liter of spore suspension. Spore concentration was measured and adjusted to 4,000 spores per ml. Wheat accessions were screened for toxin ToxA reaction. Plants were infiltrated at the second leaf stage as described in Liu et al. (2006) and were scored as sensitive or insensitive 3 days later based on presence or absence of necrosis, respectively.

Genomic DNA was extracted at two-leaf seedling stage for each individual plant using the CTAB method (Riede, Anderson, 1996). DNA concentration was measured using a spectrophotometer SmartSpec™ Plus (BioRAD). The DNA concentration for each sample was adjusted to 30 ng/μl. Samples were genotyped using the SSR marker *Xfcp623* designed to detect alleles of the *Tsn1* gene. The primer sequence and PCR conditions are given by Faris et al. (2010). The amplification products were separated on 2%-agarose gels, to determine the length of the amplification fragment 100 bp DNA Ladder (Ferments, Lithuania) was used. Gels were visualized on GelDoc BIO-PRINT MEGA for documentation of allele types in cultivars. Wheat entries 6B662 and Glenlea served as positive and negative controls, respectively.

Results

Wheat germplasm reaction to race 1 of *Pyrenophora tritici-repentis*. Seedlings and adult plant response of wheat germplasm to *P. tritici-repentis* are presented in Table 2.

The reaction of wheat cultivars and lines representing the range of lesion types to race 1 using rating system (Lamari, Bernier, 1989a) based on two phenotypically distinct symptoms: tan necrosis (N) and chlorosis (C) was carried out. Evaluation to race 1 showed that lesion type varied greatly amongst wheat cultivars. It was found that 30 entries out of 64 (46.9 %) had average disease reaction type, less than 2 and considered as resistant to this isolate (see Table 2). A type of symptom consisting of small dark spots without any surrounding chlorosis or tan necrosis (rating 1–2, R) was observed in about 19 % of the accessions tested. A type symptom consisting of minute dark spots with very little chlorosis or tan necrosis (rating 2, R-N), showed 19 (30.6 %) accessions. The chlorosis or tan necrosis symptoms (rating 3–4, S-N, S-C, S-NC), were observed in 34 (55.1 %) of the accessions tested.

Fifteen of the 64 entries were sensitive to production of chlorosis and this indicate that they may be sensitive to Ptr ToxB or Ptr ToxC, but resistant to Ptr ToxA. Relatively large proportion of resistant cultivars was presented in entries from CIMMYT (72.22 %). The number of Kazakhstani samples resistant to race 1 was significantly less (36.96 %). So, the majority of studied Kazakhstani and CIMMYT entries were

Table 2. The reaction of wheat accessions to race 1 *P. tritici-repentis* and the allelic state of the *Tsn1* gene

Accession	Origin	Growth habit	Response to race 1		Response to Ptr ToxA	Allelic state of molecular marker	Field evaluation Ptr, %
			Lesion type	Reaction			
Sapaly	KZ	Winter	3	S-C	I	-	10
Reke	KZ		2	R-N	I	-	15
Taza	KZ		2	R	I	-	10
Zhenis	KZ	Spring	2	R-N	I	-	10
Karabalykskaya 101	KZ		3	S-N	I	-	5
Akmola 40	KZ		4	S-N	I	-	5
Celinnaya Jubileynaya	KZ		3	S-C	I	-	10
Kazakstanskaya 3	KZ		4	S-N	S	-	15
Shortandinskaya 2007	KZ		3	S-N	I	-	10
Ishimskaya 92	KZ		2	R	I	-	0
Karagandinskaya 22	KZ		2	R-N	I	-	10
Karabalykskaya 90	KZ		3	S-N	I	-	15
Kazakstanskaya 19	KZ		3	S-N	I	-	10
Kazakstanskaya 20	KZ		3	S-N	I	-	10
Celinnaya 90	KZ		2	R-N	I	-	10
Kazakstanskaya 15	KZ		2	R-N	S	-	15
Pavlodarskaya 93	KZ		3	S-NC	I	-	15
Kargaly 9	KZ		2	R	I	-	0
Express	KZ		2	R-N	I	-	10
KP33	KZ	Winter	1	R-N	I	-	10
KP34	KZ		2	R	I	-	5
KP36	KZ		1	R	I	-	5
KSI6	KZ		1	R	I	-	5
KSI 9/374	KZ		2	R-N	I	-	10
KSI 16	KZ		1	R-N	I	-	10
KSI 17	KZ		2	R-N	I	-	5
Bogarnaya 56	KZ		4	S-NC	S	+	35
Mereke 70	KZ		3	S-N	I	+	50
Raminal	KZ		4	S-N	I	+	35
Nureke	KZ		4	S-C	S	+	50
Tungysh	KZ		2	R-N	S	+	50
Aray	KZ		4	S-N	S	+	35
Alem	KZ		4	S-N	S	+	35
Progress	KZ		3	S-N	S	+	50
Zhalyn	KZ		3	S-N	S	+	35
Karaspán	KZ	4	S-NC	S	+	30	
Kazakstanskaya 4	KZ	4	S-NC	S	+	35	
Anara	KZ	3	S-N	S	+	35	
Akbidai	KZ	4	S-NC	S	+	50	
Rausin	KZ	3	S-N	S	+	35	
Zhadyra	KZ	3	S-N	S	+	35	
KP 4	KZ	3	S-N	S	+	35	
KP 18	KZ	3	S-NC	S	+	30	
KP 35	KZ	3	S-N	S	+	50	
Celinnaya 26	KZ	Spring	2	R-N	I	+	30
Akmola 2	KZ		4	S-NC	S	+	35
Bobwhite 04	CIMMYT		2	R-N	S	+	15

Table 2 (end)

Accession	Origin	Growth habit	Response to race 1		Response to Ptr ToxA	Allelic state of molecular marker	Field evaluation Ptr, %
			Lesion type	Reaction			
F133/SHA5//OPATA	CIMMYT	Winter	2	R-N	S	+	25
BR35/BR14	CIMMYT		1	R-N	I	-	20
F3.71/TRM/VORONA/3/OC14	CIMMYT		1	R-N	I	-	10
CEP80111/VEE	CIMMYT		1	R-N	I	-	15
TPAP#1/OPATA	CIMMYT		3	S-NC	I	-	10
P83-5112/V82274	CIMMYT		3	S-NC	S	+	0
JAC161/TEMU51.80	CIMMYT		1	R	I	-	0
CATBIRD	CIMMYT	Spring	1	R	I	-	20
GAN/AE.437SOVARROSA	CIMMYT	Winter	1	R-N	I	-	25
GAN/AE (408)	CIMMYT		1	R	I	-	15
EG, AUS/H 567.71//4* EG AVS/3/2	CIMMYT		4	S-NC	S	+	25
EFED/F5.83 7792 (BAJAS)	CIMMYT		3	S-NC	I	-	20
L.A.CJAT(SANTACARUS)	CIMMYT		3	S-NC	I	-	0
TALHUENJNJA	CIMMYT		1	R-N	I	-	15
EFED/22150	CIMMYT		1	R	I	-	15
TOO11/TOOOO7	CIMMYT		1	R	I	-	20
RECURRENT SELECTION 1	CIMMYT		1	R	I	-	25
Salomouni	Egypt	Spring	1	R	I	-	0
Glenlea	Canada		4	S-N	S	+	40

Note: *Xfcp623* is the SSR marker to the *Tsn1* locus; "+" indicates sensitive to Ptr ToxA samples, contain *Tsn1* allele, 380 bp DNA fragment; "-" indicates insensitive to Ptr ToxA samples, contain *tsn1*, null allele; Salamouni, the insensitive control for race 1 and toxin Ptr ToxA, carrier of the recessive gene *tsn1*; Glenlea, the susceptible control for race 1 and Ptr ToxA, carrier of the dominant *Tsn1*; 1-5 are the lesion type rating based on Lamari and Bernier (1989a) scale; 1, 2 – indicates resistance, and 3-5 – susceptibility; the reaction to Ptr ToxA: I, insensitivity, S, sensitivity to Ptr ToxA.

susceptible to isolate 29A-18 related to race 1. In general, a higher number of spring wheat cultivars exhibited susceptibility to race 1 as compared to winter wheat cultivars.

Field evaluation to tan spot. The results of the field evaluation (from naturally occurring infections) to tan spot resistance showed that the severity level to *P. tritici-repentis* varied widely, from 0 to 50 % (see Table 2, Fig. 1). In the field, considerable disease (>30 %) developed on plants of 21 cultivars (32.8 %). High level of lesion development from naturally occurring infections was observed in cultivars Mereke 70, Nureke, Progress, Akbidai and KP 35. Field resistance (<15 %) was observed in 37 (57.8 %) of the accessions tested. There was a tendency towards lower rating in the field, most cultivar had similar reactions when tested in the greenhouse and in the field.

Genotyping of wheat accessions with *Xfcp623* marker. The wheat cultivars were genotyped with *Xfcp623* marker to predict reaction to the Ptr ToxA. The marker of *Xfcp623* has two alleles: in the presence of *Tsn1* allele (Ptr ToxA sensitivity) in the genome, 380 bp fragment is amplified, the absence of a fragment of amplification (null-allele) suggests the presence of the recessive *tsn1* allele (Ptr ToxA insensitivity). The results of genotyping of wheat cultivars and lines with the *Xfcp623* marker are presented in Table 2. As an example, the results of the PCR amplification with *Xfcp623* marker on 16 wheat genotypes, are shown in the Figure 2. According to Figure 2, seven out of 16 entries (Bogarnaya 56, KP 18, Kazakstanskaya 4, Akmola 2, KP 4, P83-5112/V82274 and Anara) had

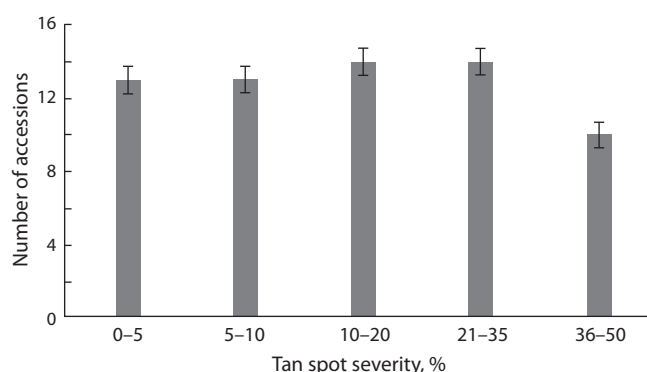


Fig. 1. Frequency distribution of wheat accession for severity to *P. tritici-repentis*, field evaluation, Almaty region.

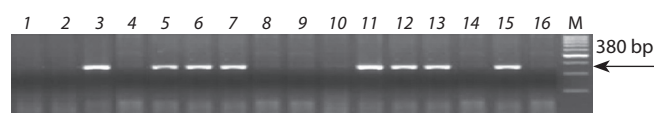


Fig. 2. DNA amplification profile for wheat cultivars and elite lines obtained with *Xfcp623* marker.

Lane: 1, KSI 16; 2, GAN/AE (408); 3, Bogarnaya 56; 4, KP 17; 5, KP 18; 6, Kazakstanskaya 4; 7, Akmola 2; 8, Taza; 9, Kargaly 9; 10, EFED/22150; 11, KP 4; 12, P83-5112/V82274; 13, Anara; 14, KP33; 15, Glenlea (the sensitive control for race 1 and toxin Ptr ToxA, carrier of the dominant gene *Tsn1*); 16, Salamouni (the insensitive control for race 1 and toxin Ptr ToxA, carrier of the recessive gene *tsn1*); M, DNA Ladder.

380 bp fragment, which allows us to postulate the presence of the dominant *Tsn1* allele conferring toxin Ptr ToxA sensitivity. Seven entries including KSI 16, GAN/AE (408), KP 17, Taza, Kargaly 9, EFED/22150 and KP33 showed a lack of amplification (null-allele) and suggests that these samples contain recessive *tsn1* allele conferring toxin Ptr ToxA insensitivity.

The results of genotyping showed that the frequency of *Tsn1* allele was 37.5 % (24 cultivars of 64 analyzed). Analysis of molecular and phytopathological data shows that carriers of the *tsn1* gene characterized by high field resistance with severity level ranging from 0 to 15 %. The carriers of the *Tsn1* gene, showed in the field susceptibility to the disease comprised at 30–45 %.

Twenty-seven wheat entries are of the greatest interest since they demonstrated resistance to the seedling inoculation by the race 1 of *P. tritici-repentis*, showed resistance to the pathogen in the field and were Ptr ToxA insensitive. This set of accessions includes 16 cultivars and lines from Kazakhstan (Reke, Taza, Zhenis, Ishimskaya 92, Karagandinskaya 22, Karabalykskaya 90, Celinnaya 90, Kargaly 9, Express, KP33, KP34, KP36, KSI6, KSI 9/374, KSI 16, KSI 17) and 11 CIMMYT lines (BR35/BR14, F3.71/TRM/VORONA/3/OC14, CEP80111/VEE, JAC161/TEMU51.80, CATBIRD, GAN/AE.437SOVARROSA, GAN/AE (408), TALHUENJNJA, EFED/22150, TOO11/TOOOO7, RECURRENT SELECTION 1).

Discussion

Ptr ToxA toxin is known to be one of the main factors associated with the development of *P. tritici-repentis* in susceptible wheat genotypes (Friesen et al., 2006). The new *P. tritici-repentis* races are emerging through natural selection, therefore development of new resistance sources is imperative (Ali et al., 2010). Several reports indicate the global prevalence of race 1 (Singh et al., 2010; Abdullah et al., 2017a). Since it was previously shown that the race 1 is the most prevalent race in Kazakhstan (Zhanarbekova et al., 2005; Maraite et al., 2006; Kokhmetova et al., 2016), in the present study, we searched for carriers of resistance to race 1 and Ptr ToxA toxin among wheat germplasm. The particular value of the experiment is the breeding material, which was developed and selected in Kazakhstan, as well as in CIMMYT. This material is representing different genetic background, including carriers of resistance to tan spot.

Molecular markers *Xfcp393*, *Xfcp394* and *Xfcp623* were developed as diagnostics for detection of insensitivity to Ptr ToxA and Sn ToxA (Zhang et al., 2009; Faris et al., 2010). On the basis of sequencing the marker *Xfcp623* was proposed as diagnostic for *Tsn1* gene. It was located in intron 5 of the locus in position 4901...5280 (Faris et al., 2010). The reliability of the diagnostic marker *Xfcp623* for identifying wheat genotypes with resistance to the fungus and insensitivity to Ptr ToxA was shown in some studies (Karelov et al., 2015; Kokhmetova et al., 2017, 2018; Mironenko et al., 2017). Taking into consideration the higher efficiency of the *Xfcp623* marker, wheat germplasm in our study were genotyped with this marker. In this study, the frequency of *tsn1* allele of the marker *Xfcp623* for Ptr ToxA insensitivity was 62.5 %. Sensitive reaction to the Ptr ToxA was predicted for the 20 remainder of the tested genotypes (37.5 %).

The majority of studied cultivars, 53.1 % were susceptible to isolate 29A-18 related to race 1. In general, the most part of spring wheat cultivars exhibited susceptibility to race 1 as compared to winter wheat cultivars. The same response to race 1 in a set of spring and winter wheat cultivars was observed by Abdullah et al. (2017b), who indicated that the high resistance of winter wheat to race 1 tan spot minimizes their role in establishing race 1 in the region.

Disease scores from seedling stage, assessed herein, positively correlated with field disease ratings. The most of the wheat entries with the *Tsn1* genotype (90.5 %) were sensitive to race 1 and showed susceptibility to the pathogen in the field. The exception was 2 varieties (Tungysh and Celinnaya 26), which showed an insensitive reaction to the race 1 of the fungus.

Among the studied wheat material 59 accessions (92.2 %) exhibited “sensitive” or “insensitive” alleles at marker loci *Xfcp623* in Ptr ToxA sensitive and insensitive accessions, respectively. In other words, no recombination was observed within the segment harboring the marker *Xfcp623* and *Tsn1* among these 59 accessions. Only 5 genotypes had recombination events between *Xfcp623* and *Tsn1*. In the cultivars Kazakstanskaya 3 and Kazakstanskaya 15 the sensitivity to Ptr ToxA and the presence of resistance gene *tsn1* was observed. The cultivars Mereke 70, Raminal and Celinnaya 26 showed the insensitivity to Ptr ToxA, but characterized by the presence of susceptible gene *Tsn1*. Apparently, recombinations are possible in the segment harboring the *Xfcp623* and *Tsn1* marker among these wheat cultivars.

The results of our study are in agreement with a previous research, suggesting that ToxA is not the major determinant in tan spot disease development in some host backgrounds and indicates the presence of additional effectors (Oliver et al., 2014; Rybak et al., 2017; See et al., 2018). The ToxA–*Tsn1* interaction alone is not a prerequisite for pathogenicity of race 1 Ptr isolates, and pathologists have started to recognize that race 1 Ptr isolates harbour additional uncharacterized effectors in addition to ToxA and ToxC (Manning, Ciuffetti, 2015). Ptr interacts with the host in a complex and intricate manner, leading to a variety of disease reactions that are dependent or independent of the ToxA–*Tsn1* interaction (See et al., 2018). ToxA is found ubiquitously in Australian Ptr isolates and the removal of ToxA sensitivity gene from wheat has been shown to have no effect on yield penalty (Oliver et al., 2014). Although the removal of the *ToxA* gene in Ptr does not severely impede the ability of the pathogen to infect in all varieties, the absence of the *Tsn1* gene in the wheat germplasm does generally improve resistance to tan spot disease (See et al., 2018).

Conclusion

In summary, the results presented in this study indicate that it is necessary to continue breeding for development of carriers of *tsn1* gene insensitive to Ptr ToxA toxin. The obtained results will contribute to wheat breeding by pyramiding Ptr ToxA insensitivity genes using the closely linked marker *Xfcp623* into the desired germplasm. The group of disease resistance germplasm identified in this study can be utilized to develop cultivars with broad-genetic base durable resistance to wheat tan spot.

References

- Abdullah S., Sehgal S.K., Ali S., Liatukas Z., Ittu M., Kaur N. Characterization of *Pyrenophora tritici-repentis* (tan spot of wheat) races in Baltic states and Romania. *Plant Pathol. J.* 2017a;33(2):133-139. DOI 10.5423/PPJ.OA.10.2016.0214.
- Abdullah S., Sehgal S.K., Ali S. Race diversity of *Pyrenophora tritici-repentis* in South Dakota and response of predominant wheat cultivars to tan spot. *J. Plant Pathol. Microbiol.* 2017b;8(5):409. DOI 10.4172/2157-7471.1000409.
- Ali S., Gurung S., Adhikar T.B. Identification and characterization of novel isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* from Arkansas. *Plant Dis.* 2010;94(2):229-235. DOI 10.1094/PDIS-94-2-0229.
- Ballance G.M., Lamari L., Bernier C.C. Purification and characterization of a host selective necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1989;35:203-213. DOI 10.1016/0885-5765(89)90051-9.
- Chu C.-G., Chao S., Friesen T.L., Faris J.D., Zhong S., Xu S.S. Identification of novel tan spot resistance QTLs using an SSR-based linkage map of tetraploid wheat. *Mol. Breed.* 2010;25:327-338. DOI 10.1007/s11032-009-9335-2.
- Duveiller E., Dubin H.J., Reeves J., McNab A. (Eds.). *Helminthosporium Blights of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot*. CIMMYT, El Batán, Mexico, 1998.
- Faris J.D., Abeysekara N.S., McClean P.E., Xu S.S., Friesen L.T. Tan spot susceptibility governed by the *Tsn1* locus and race nonspecific resistance quantitative trait loci in a population derived from the wheat lines Salamouni and Katepwa. *Mol. Breed.* 2012;30:1669-1678. DOI 10.1007/s11032-012-9750-7.
- Faris J.D., Friesen T.L. Identification of quantitative trait loci for race-nonspecific resistance to tan spot in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2005;111:386-392.
- Faris J.D., Liu Z., Xu S.S. Genetics of tan spot resistance in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2013;126:2197-2217. DOI 10.1007/s00122-013-2157-y.
- Faris J.D., Zhang Z., Lu H., Lu S., Reddy L., Cloutier S., Fellers J.P., Meinhardt S.W., Rasmussen J.B., Xu S.S., Oliver R.P., Simons K.J., Friesen T.L. A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107:13544-13549. DOI 10.1073/pnas.1004090107.
- Friesen T.L., Stukenbrock E.H., Liu Z.H., Meinhardt S., Ling H., Faris J.D., Rasmussen J.B., Solomon P.S., McDonald B.A., Oliver R.P. Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nat. Genet.* 2006;38(8):953-956. DOI 10.1038/ng1839.
- Gurung S., Mamidi S., Bonman J.M., Jackson E.W., del Rio L.E., Acevedo M., Mergoum M., Adhikari T.B. Identification of novel genomic regions associated with resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* races 1 and 5 in spring wheat using association analysis. *Theor. Appl. Genet.* 2011;123:1029-1041.
- Juliana P., Singh R.P., Singh P.K., Poland J.A., Bergstrom G.C., Huerta-Espino J., Bhavani S., Crossa J., Sorrells M.E. Genome-wide association mapping for resistance to leaf rust, stripe rust and tan spot in wheat reveals potential candidate genes. *Theor. Appl. Genet.* 2018;131:1405. DOI 10.1007/s00122-018-3086-6.
- Kalia B., Bockus W.W., Singh S., Tiwari V.K., Gill B.S. Mapping of quantitative trait loci for resistance to race 1 of *Pyrenophora tritici-repentis* in synthetic hexaploid wheat. *Plant Breed.* 2018;137:313-319. DOI 10.1111/pbr.12586.
- Karelov A.V., Kozub N.O., Sozinov I.O., Sozinov O.O., Blume Ya.B. Allelic state of the molecular genetic markers for genes associated with sensitivity to *Pyrenophora tritici-repentis* toxins A and B and *Stangospora nodorum* toxin A among Ukrainian common wheat cultivars. *Visn. Ukr. Tov. Genetikov i Selekcionerov.* 2015;13(1): 11-17.
- Kokhmetova A.M., Ali S., Sapakhova Z., Atishova M.N. Identification of genotypes-carriers of resistance to tan spot Ptr ToxA and Ptr ToxB of *Pyrenophora tritici-repentis* in common wheat collection. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2018;22(8):978-986. DOI 10.18699/VJ18.440. (in Russian)
- Kokhmetova A.M., Kremneva O., Keyshilov Zh.S., Sultanova N.Zh. Race structure and virulence of isolates *Pyrenophora tritici-repentis* in the Republic of Kazakhstan and north Caucasus region of Russia. *Eur. J. Appl. Biotech.* 2016;3:57-66. (in Russian)
- Kokhmetova A., Kremneva O., Volkova G., Atishova M., Sapakhova Z. Evaluation of wheat cultivars growing in Kazakhstan and Russia for resistance to tan spot. *J. Plant Pathol.* 2017;99(1):161-167. DOI 10.4454/jpp.v99i1.3812.
- Kollers S., Rodemann B., Ling J., Korzun V., Ebmeyer E., Argillier O., Hinze M., Plieske J., Kulosa D., Ganai M.W., Röder M.S. Genome-wide association mapping of tan spot resistance (*Pyrenophora tritici-repentis*) in European winter wheat. *Mol. Breed.* 2014;34:363-371. DOI 10.1007/s11032-014-0039-x.
- Koyshibaev M.K. *Diseases of Wheat*. Ankara: FAO, 2018. (in Russian)
- Kremneva O.Yu., Volkova G.V. *Diagnostics and Methods for Assessing the Wheat Resistance to the Causative Agent of Tan Spot*. Guidelines. Moscow, 2007. (in Russian)
- Lamari L., Bernier C.C. Evaluation of wheat lines and cultivars to tan spot [*Pyrenophora tritici-repentis*] based on lesion type. *Can. J. Plant Pathol.* 1989a;11(1):49-56. DOI 10.1080/07060668909501146.
- Lamari L., Bernier C.C. Virulence of isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* on 11 wheat cultivars and cytology of the differential host reactions. *Can. J. Plant Pathol.* 1989b;11(3):284-290. DOI 10.1080/07060668909501114.
- Lamari L., Sayoud R., Boulif M., Bernier C.C. Identification of a new race of *Pyrenophora tritici-repentis* implications for the current pathotype classification system. *Can. J. Plant Pathol.* 1995;17(4): 312-318. DOI 10.1080/07060669509500668.
- Lamari L., Strelkov S.E., Yahyaoui A., Amedov M., Saidov M., Djunusova M., Koichibayev M. Virulence of *Pyrenophora tritici-repentis* in the countries of the Silk Road. *Can. J. Plant Pathol.* 2005; 27(3):383-388. DOI 10.1080/07060660509507236.
- Liu Z.H., Friesen T.L., Ling H., Meinhardt S.W., Oliver R.P., Rasmussen J.B., Faris J.D. The *Tsn1*-ToxA interaction in the wheat – *Stagonospora nodorum* pathosystem parallels that of the wheat – tan spot system. *Genome.* 2006;49(10):1265-1273. DOI 10.1139/g06-088.
- Liu Z., Zum J.D., Kariyawasam G., Faris J.D., Shi G., Hansen J., Rasmussen J.B., Acevedo M. Inverse gene-for-gene interactions contribute additively to tan spot susceptibility in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2017;130:1267-1276. DOI 10.1007/s00122-017-2886-4.
- Manning V.A., Ciuffetti L.M. Necrotrophic effector epistasis in the *Pyrenophora tritici-repentis* – wheat interaction. *PLoS One.* 2015; 10(4):e0123548. DOI 10.1371/journal.pone.0123548.
- Maraite H., Mercado-Vergnes D., Renard M.-E., Zhanarbekova A., Duveiller E. Relevance of pathogen diversity in management of leaf spot and leaf blight diseases on wheat in Central Asia. *Agromeridian.* 2006;2(3):105-114.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers J., Morris C., Appel R., Xia X.C. *Catalogue of Gene Symbols for Wheat*. 2013. Suppl. 204-2017. Available at: www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/
- Mikhailova L.A., Mironenko N.V., Kovalenko N.M. Tan Spot of Wheat. Guidelines for the study of populations of the causative agent of tan spot *Pyrenophora tritici-repentis* and resistance of varieties. St. Petersburg: Vseross. Inst. Zashch. Rast., 2012. (in Russian)
- Mironenko N.V., Baranova O.A., Kovalenko N.M., Afanasenko O.S., Mikhailova L.A. Selective influence of wheat cultivars with *Tsn1* gene on the formation of tan spot causative agent *Pyrenophora tritici-repentis* population. *Plant Protection News.* 2017;3:23-27. (in Russian)
- Oliver R., Lichtenzweig J., Tan K., Waters C.O., Rybak K., Lawrence J., Friesen T., Burgess P. Absence of detectable yield penalty associated with insensitivity to Pleosporales necrotrophic effectors in wheat

- grown in the West Australian wheat belt. *Plant Pathol.* 2014;63:1027-1032. DOI 10.1111/ppa.12191.
- Rees R.G., Platz G.J., Mayer R.J. Susceptibility of Australian wheats to *Pyrenophora tritici-repentis*. *Aust. J. Agric. Res.* 1988;39:141-151.
- Riede C.R., Anderson J.A. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. *Crop Sci.* 1996;36(4):905-909. DOI 10.2135/cropsci1996.0011183X0036000400015x.
- Rybak K., See P.T., Phan H.T., Syme R.A., Moffat C.S., Oliver R.P., Tan K.C. A functionally conserved Zn₂Cys₆ binuclear cluster transcription factor class regulates necrotrophic effector gene expression and host-specific virulence of two major Pleosporales fungal pathogens of wheat. *Mol. Plant Pathol.* 2017;18(30):420-434. DOI 10.1111/mpp.12511.
- Saari E.E., Prescott L.M. A scale for appraising the foliar intensity of wheat diseases. *Plant Dis. Reporter.* 1975;59:377-380.
- See P.T., Marathamuthu K.A., Iagallo E.M., Oliver R.P., Moffat C.S. Evaluating the importance of the tan spot ToxA-Tsn1 interaction in Australian wheat varieties. *Plant Pathol.* 2018;67(5):1066-1075. DOI 10.1111/ppa.12835.
- Singh P.K., Crossa J., Duveiller E., Singh R.P., Djurle A. Association mapping for resistance to tan spot induced by *Pyrenophora tritici-repentis* race 1 in a CIMMYT's historical bread wheat set. *Euphytica.* 2016;207(3):515-525. DOI 10.1007/s10681-015-1528-7.
- Singh P.K., Singh R.P., Duveiller E., Mergoum M., Adhikari T.B., Elias E.M. Genetics of wheat – *Pyrenophora tritici-repentis* interactions. *Euphytica.* 2010;171:1-13. DOI 10.1007/s10681-009-0074-6.
- Strelkov S.E., Lamari L. Host-parasite interactions in tan spot [*Pyrenophora tritici-repentis*] of wheat. *Can. J. Plant Pathol.* 2003;25(4):339-349. DOI 10.1080/07060660309507089.
- Xiao-Chun S., Bockus W., Guihua B. Quantitative trait loci for resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* race 1 in a Chinese wheat. *Phytopathology.* 2010;100:468-473. DOI 10.1094/PHYTO-100-5-0468.
- Zhanarbekova A.B., Koishibayev M., Maraitte H., Duveiller E., Mercado D.M., Sliamova N.D. The distribution of tan spot on wheat and race structure of *Drechslera tritici-repentis* in Kazakhstan and neighboring CIS countries. In: Proc. Int. Sci. Conf. "Modern Problems of Plant Protection and Quarantine". Almaty, 2005;371-376.
- Zhang Z., Friesen T.L., Simons K.J., Xu S.S., Faris J.D. Development, identification, and validation of markers for marker assisted selection against the *Stagonospora nodorum* toxin sensitivity genes *Tsn1* and *Snn2* in wheat. *Mol. Breed.* 2009;23(1):35-49. DOI 10.1007/s11032-008-9211-5.

ORCID ID

A.M. Kokhmetova orcid.org/0000-0002-0186-7832
M.N. Atishova orcid.org/0000-0002-2270-571X
M.T. Kumarbayeva orcid.org/0000-0002-5588-6772
I.N. Leonova orcid.org/0000-0000-0002-6516-0545

Acknowledgements. This study was supported by the Kazakhstan Ministry of Education and Sciences, project AP05132540.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received August 22, 2019. Revised September 16, 2019. Accepted September 23, 2019.

The Fifth International Scientific Conference PlantGen2019

Identification of QTLs for resistance to leaf and stem rusts in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) using a mapping population of 'Pamyati Azieva × Paragon'

Y. Genievskaya¹, Y. Fedorenko², A. Sarbayev³, A. Amalova¹, S. Abugalieva^{1,5}, S. Griffiths⁴, Y. Turuspekov^{1,5} ✉¹ Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan² North-Kazakhstan Agricultural Station, Shagalaly, North Kazakhstan region, Kazakhstan³ Kazakh Research Institute of Agriculture and Plant Industry, Almalybak, Almaty region, Kazakhstan⁴ John Innes Centre, Norwich, United Kingdom⁵ al-Farabi Kazakh National University, Faculty of Biology and Biotechnology, Department of Biodiversity and Bioresources, Almaty, Kazakhstan

✉ e-mail: yerlant@yahoo.com

Leaf rust (LR) and stem rust (SR) are harmful fungal diseases of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). The purpose of this study was to identify QTLs for resistance to LR and SR that are effective in two wheat-growing regions of Kazakhstan. To accomplish this task, a population of recombinant inbred lines (RILs) of 'Pamyati Azieva × Paragon' was grown in the northern and southeastern parts of Kazakhstan, phenotyped for LR/SR severities, and analyzed for key yield components. The study revealed a negative correlation between disease severity and plant productivity in both areas. The mapping population was genotyped using a 20,000 Illumina SNP array. A total of 4595 polymorphic SNP markers were further selected for linkage analysis after filtering based on missing data percentage and segregation distortion. Windows QTL Cartographer was applied to identify QTLs associated with LR and SR resistances in the RIL mapping population studied. Two QTLs for LR resistance and eight for SR resistance were found in the north, and the genetic positions of eight of them have matched the positions of the known *Lr* and *Sr* genes, while two QTLs for SR were novel. In the southeast, eight QTLs for LR and one for SR were identified in total. The study is an initial step of the genetic mapping of LR and SR resistance loci of bread wheat in Kazakhstan. Field trials in two areas of the country and the genotyping of the selected mapping population have allowed identification of key QTLs that will be effective in regional breeding projects for better bread wheat productivity.

Key words: bread wheat; linkage mapping; recombinant inbred lines; qualitative trait loci; leaf rust; stem rust.

For citation: Genievskaya Y., Fedorenko Y., Sarbayev A., Amalova A., Abugalieva S., Griffiths S., Turuspekov Y. Identification of QTLs for resistance to leaf and stem rusts in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) using a mapping population of 'Pamyati Azieva × Paragon'. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019; 23(7):887-895. DOI 10.18699/VJ19.563

Идентификация локусов количественных признаков устойчивости к листовой и стеблевой ржавчинам мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с использованием картирующей популяции Памяти Азиева × Парагон

Ю.А. Гениевская¹, Е.Н. Федоренко², А.Т. Сарбаев³, А.Б. Амалова¹, С.И. Аbugалиева^{1,5}, С. Гриффис⁴, Е.К. Туруспеков^{1,5} ✉¹ Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан² Северо-Казахстанская сельскохозяйственная опытная станция, Шагалалы, Северо-Казахстанская область, Казахстан³ Казахский НИИ земледелия и растениеводства, Алмалыбак, Алматинская область, Казахстан⁴ Центр им. Джона Иннеса, Норидж, Великобритания⁵ Казахский Национальный университет им. аль-Фараби, факультет биологии и биотехнологии, кафедра биоразнообразия и биоресурсов, Алматы, Казахстан

✉ e-mail: yerlant@yahoo.com

Листовая и стеблевая ржавчины являются вредоносными грибными болезнями мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Целью данного исследования была идентификация локусов количественных признаков (ЛКП), связанных с устойчивостью к болезням, в двух регионах возделывания пшеницы в Казахстане. Для этого картирующая популяция Памяти Азиева × Парагон, состоящая из 98 рекомбинантно-инбредных линий и выращиваемая на севере и юго-востоке Казахстана, была фенотипирована по степени поражения листовой и стеблевой ржавчиной и проанализирована по ключевым компонентам урожайности. Выявлена отрицательная корреляция между степенью поражения болезнью и продуктивностью растений в обоих регионах. Картирующая популяция была генотипирована с использованием ДНК микрочипа Illumina на 20000 маркеров ОНП (однонуклеотидный полиморфизм). Для дальнейшего анализа отобрано 4595 полиморфных маркеров ОНП. Для идентификации

ЛКП, связанных с устойчивостью картирующей популяции к листовой и стеблевой ржавчинам, использовалась программа Windows QTL Cartographer v2.5. В северном регионе были обнаружены два ЛКП устойчивости к листовой ржавчине и восемь ЛКП – к стеблевой. Локализации восьми из них совпали с позициями известных генов *Lr* и *Sr*. Два ЛКП для стеблевой ржавчины были обозначены как новые. Для юго-восточного региона обнаружено восемь ЛКП, ассоциированных с устойчивостью к листовой ржавчине, и один – к стеблевой. Настоящее исследование является первым шагом в генетическом картировании локусов устойчивости к листовой и стеблевой ржавчинам мягкой пшеницы в Казахстане. Полевые исследования в двух регионах страны и генотипирование выбранной картирующей популяции позволили выявить ключевые ЛКП, которые будут эффективны в региональных селекционных проектах, направленных на улучшение продуктивности мягкой пшеницы. Ключевые слова: мягкая пшеница; картирование; рекомбинантно-инбредные линии; локусы количественных признаков; листовая ржавчина; стеблевая ржавчина.

Introduction

Wheat is one of the most important cereal crops in the World and Kazakhstan (<http://www.fao.org>). In Kazakhstan wheat is grown on about 13 million hectares annually. The country produces up to 20–25 million tons of bread wheat per year, and exports up to 5–7 million tons of the grain (<http://stat.gov.kz>). However, an annual infection of bread wheat by fungal diseases is causing a serious yield reduction (Koyshybaev et al., 2017).

The three most common wheat fungal pathogens in the world are *Puccinia triticina* Erikss. (leaf rust), *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Erikss. & Henn. (stem rust), and *Puccinia striiformis* Westend. f. sp. *tritici* Eriks. (stripe or yellow rust) (Bushnell, Roelfs, 1984). *P. recondita* is now recognized as one of the most dangerous pathogens in wheat production worldwide, causing significant yield losses over the large geographical areas (Bolton et al., 2008). The infection with any rust fungus results in decreased numbers of kernels per spike and lower kernel weights due to the parasitic consumption of host nutrients, which leads to apparent yield losses and poor quality of the grains (Afzal et al., 2008).

In Kazakhstan, leaf rust (LR) and stem rust (SR) together cause the most severe yield losses in bread wheat (Rsaliev et al., 2005). When the epidemic develops at the early stage, and the infection persists until wheat is fully ripe, the yield loss increases up to 40–60 % (Koyshybaev, 2010). It happens because of the favorable climate conditions for the spreading of *P. recondita* in the fields, especially in south and south-east of Kazakhstan, where the high temperature and water deficiency stimulate the expansion of spores (Koyshybaev, 2010). As for the SR, the constantly widening areal of aggressive stem rust race Ug99 creates a threat to the food security of the entire planet (Singh et al., 2011; Bhardwaj et al., 2014), including Kazakhstan (Shamanin et al., 2010; Rsaliev, 2011). With epiphytotic SR development, the yield losses of spring wheat can potentially reach 40–50 % (Koyshybaev, 2010; Soko et al., 2018).

One of the most effective ways to protect wheat from LR and SR is the development of resistant cultivars with high yield potential (Ellis et al., 2014). In the last 100 years, approximately 80 LR resistance genes designated from *Lr1* to *Lr78*, *Lrac104*, and *Lrac124*, have been identified and described in common wheat, durum wheat and diploid wheat species (McIntosh et al., 1998, 2007, 2017). In the last 10 years in Kazakhstan, there were active research works on the identification of genes, which are effective against LR, screening of wheat cultivars for the presence of resistance gene (Kokhmetova et al., 2009; Akhmetova et al., 2015) and investigation

on population of *P. recondita* in the country and neighboring territories (Agabaeva, Rsaliev, 2013; Gulytaeva et al., 2018).

As for the SR, to date, nearly 60 *Sr* genes have been identified in wheat and its wild relatives (McIntosh et al., 2017). Almost all of the wheat cultivars approved for use on the territory of Kazakhstan demonstrate poor resistance to SR pathogens (Koyshybaev et al., 2017). For this reason, the analysis of SR and methods of its prevention in Kazakhstan are an important issue and require comprehensive genetic and breeding studies. Several experiments were conducted to search SR resistance sources in wheat germplasm of Kazakhstan (Rsaliev, 2011; Kokhmetova, Atishova, 2012). However, no efforts were done to identify effective genes and quantitative trait loci (QTL) based on genetic mapping approach. Genetic mapping is an effective tool for the identification of QTLs that are responsible for natural phenotypic variations in complex traits, such as resistance to rust diseases (Goutam et al., 2015; Xu et al., 2017). During the past two decades, linkage mapping has been commonly used in various plant species, numerous wheat dense genetic maps were developed (Yang et al., 2017), and a large number of QTL have been cloned or tagged (Price, 2006).

The purpose of this study was the identification of QTL for LR and SR resistance by using 98 recombinant inbred lines (RILs) of 'Pamyati Azieva × Paragon' mapping population (MP). As these lines were tested in environmental conditions of North and South-East Kazakhstan, it was expected that important insights of the genetic control for two types of rust disease resistance in bread wheat will be revealed. This work is a continuation of our recent studies of bread wheat undertaken in our research organization (Turuspekov et al., 2017a, b).

Materials and methods

'Pamyati Azieva × Paragon' mapping population. The MP comprising of 98 F₈ RILs was assembled via crossing between two spring wheat cultivars – 'Pamyati Azieva' (PA) and 'Paragon' (P). These two cultivars were chosen because of their different genetic background and differences in morphological traits. The first parental cultivar is Russian medium-early spring wheat cultivar 'Pamyati Azieva' recommended for the Western Siberian region (<https://reestr.gossort.com>), approved for commercial cultivation in the North Kazakhstan (<http://www.goscomsort.kz/index.php/ru>), and susceptible to LR and SR. The second parental cultivar was a modern UK elite spring wheat cultivar 'Paragon' that was used as a key parent for Wheat Genetic Improvement Programme (<http://www.wgin.org.uk>) resources but poorly studied for the resistance to LR and SR. The MP, as well as the genetic

map, was developed within ADAPTAWHEAT project in greenhouse conditions by using facilities of the John Innes Centre (Norwich, UK) during 2011–2015 (<https://www.jic.ac.uk/adaptawheat>).

Evaluation of the MP for variation in agronomic traits, and LR/SR severity in South-East and North Kazakhstan. Field evaluations of the MP were conducted in North Kazakhstan agricultural experimental station (North Kazakhstan region) and Kazakh Research Institute of Agriculture and Plant Industry (South-East Kazakhstan, Almaty region). Ninety-eight RILs, the parental cultivars ('Pamyati Azieva' and 'Paragon'), and standard check cultivars ('Astana' and 'Omskaya 35' in the North, and 'Kazakhstanskaya 4' and 'Kazakhstanskaya rannespelaya' in the South-East) were evaluated in 2018 under field conditions for resistance to LR and SR, as well as for key adaptation traits and yield components. The population was planted at each site in randomized triplicated experiments. Plants were grown in 15 cm distance between rows and 5 cm distance between plants within a row. Each row contained 25 plants. In the field conditions the MP was tested using 11 traits, including HT (heading time), MT (seed maturation time), PH (plant height), PL (peduncle length), SL (spike length), NPS (number of productive spikes per plant), NKS (number of kernels per spike), WKS (weight of kernels per spike), TKW (thousand kernels weight), WKP (weight of kernels per plant), YSM (yield per square meter).

Evaluation of rusts resistance in both locations was conducted in two randomized replicates with a natural source of infection. LR and SR resistance was evaluated on two growth stages – phase of grain formation on 75 of Zadoks scale and at the beginning of grain ripening on 83 of Zadoks scale (Zadoks et al., 1974). Averaged values for both diseases in two regions were calculated. Field infection response of the test materials was assessed visually. In both regions assessment of resistance/susceptibility levels was performed using the scale of Stakman (Stakman et al., 1962) for SR, the scale of Mains and Jackson (Mains, Jackson, 1926) for LR. The severity of rust infection on leaf and stem surfaces was assessed using the modified Cobb scale (Peterson et al., 1948; Roelfs et al., 1992). To meet the data format required for association analysis, the conventional scale was converted to the 0–9 linear disease scale described by Zhang and co-authors (Zhang et al., 2011). Pearson correlation analysis between agronomic traits and

SR/LR severity was performed using the R statistical platform (<https://www.r-project.org>).

Linkage mapping and QTL analysis. Genomic DNA for 98 RILs and their parental cultivars was extracted from seedlings using the cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method (Doyle J.J., Doyle J.L., 1990) and genotyped with the Illumina's iSelect 20K SNP array at the TraitGenetics Company (TraitGenetics GmbH, Gatersleben, Germany). MapChart v2.32 software was used to draw the genetic map (Voorrips, 2002). Each repetition experiments and their average results for studied traits in each environment were used for QTL analysis. For analysis of QTL, the Windows QTL Cartographer v2.5 software (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>) with composite interval mapping (CIM) method at a logarithm of the odds (LOD) for the threshold of 3.0 was used.

Results

Phenotypic variations of resistance to stem and leaf rusts in two environmental conditions. Generally, mean values of SR and LR severity of two parental cultivars and 98 RILs in two regions demonstrated non-equal distribution with deviations towards resistance in the North and susceptibility in the South-East for both diseases (Fig. 1). Out of 98 RILs, fourteen lines were recognized as fully resistant to SR (1 point), 67 lines as moderate resistant on the level of 2–3 points, and only one line was determined as susceptible with 8 points of infection severity (see Fig. 1, a). In the South-East area, the severity of SR infection at the stage of grain ripening is higher and less diverse than in the North. SR scores of RILs at the adult plant stage were not normally distributed and were strongly skewed towards susceptibility. Here, 89 lines were affected by stem rust on the level of 8 points, with no lines identified as resistant (see Fig. 1, a).

As per the LR resistance, parents and lines of the MP grown in North Kazakhstan had demonstrated clear evidence of infection at the phase of grain ripening. The majority of RILs (81 lines) was identified as moderately resistant with the severity level on 2–3 points. The remaining six lines were resistant, and 11 lines had shown intermediate (4–5 points) level of infection (see Fig. 1, b). In the region of South-East Kazakhstan, as in the case of stem rust, the severity of leaf rust infection was significantly higher than in the northern part of the country.

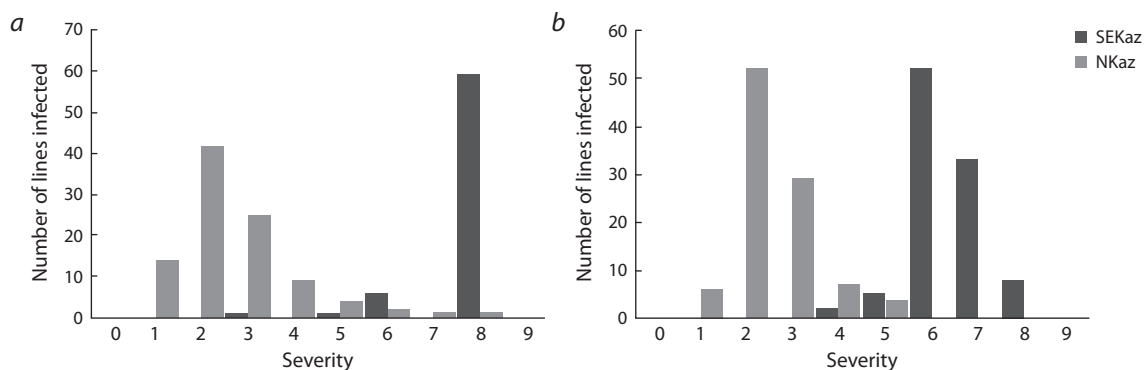


Fig. 1. Phenotypic variations of recombinant inbred lines for stem (a) and leaf rust (b) severity in two environments. The severity of infections was determined based on the 9-point scale. SEKaz – South-East Kazakhstan, NKaz – North Kazakhstan.

Coefficients of pairwise Pearson correlations (*r*) between the leaf and stem rusts infections severities and adaptation/yield-related traits in RILs population grown in North Kazakhstan

Parameter	SR (grain formation)	SR (grain ripening)	SR (average)	LR (average)
HT	-0.254*	-0.072	-0.059	0.129
MT	-0.295**	-0.191	-0.211*	-0.054
PH	-0.061	-0.219*	-0.214*	-0.123
PL	-0.047	-0.037	-0.042	-0.085
NPS	0.159	-0.113	-0.060	-0.215*
SL	0.208*	0.098	0.124	0.019
NFS	-0.180	-0.113	-0.155	-0.094
NKS	-0.148	-0.117	-0.151	-0.237*
WKS	0.053	-0.144	-0.141	-0.295**
WKP	0.010	-0.214*	-0.230*	-0.168
TKW	0.031	-0.168	-0.198	-0.059

Notes: SR, stem rust severity; LR, leaf rust severity; HT, heading time; MT, maturation time; PH, plant height; PL, peduncle length; NPS, number of productive spikes per plant; SL, spike length; NFS, number of fertile spikelets per spike; NKS, number of kernels per spike; WKS, weight of kernels per spike; WKP, weight of kernels per plant; TKW, thousand kernels weight.

* Significance level at $p < 0.05$; ** significance level at $p < 0.01$.

Correlation analysis for resistance to LR/SR and agronomic traits. North Kazakhstan is the biggest wheat-growing area in Kazakhstan that gives around 85 % of bread wheat grain annually (<http://stat.gov.kz>). Therefore, a separate evaluation of the relationship between yield components and rust indexes was performed (see the Table).

The severity of LR and SR infections measured on two growth stages and averaged values revealed generally negative influence on all key adaptation and yield-related traits. In North Kazakhstan, the averaged level of SR infections was negatively correlated with three important traits – MT, PH, and WKP. At the same time, the level of SR infections measured during the phase of grain formation demonstrated a negative correlation with HT, MT, while measures at the beginning of grain ripening were negatively correlated with PH and WKP. LR severity made a significant negative impact on NPS, NKS, and WKS.

Genetic linkage map of the studied RILs population. A total of 4595 polymorphic SNP markers from 21 chromosomes were used in the current study. All SNPs showed a good fit to 1:1 segregation in the RILs mapping population ($p > 0.001$ in Chi-squared test). The distribution of markers among genomes was the following: A genome – 1939 SNPs, B genome – 2099 SNPs, and D genome – 557 SNPs. The lengths of genetic maps for individual chromosomes ranged from 218.9 cM (chromosome 3B) to 16.9 cM (chromosome 4D). Chromosome 2B was identified as the densest with 563 SNPs per 150.6 cM (average spacing 0.27 cM), while chromosome 5D demonstrated the least markers density with the average 2.65 cM between neighboring SNPs.

QTL analysis of resistance to LR and SR. Information about QTL identified in this research work is summarized in Supplementary 1¹. Ten putative QTL for LR resistance were identified in seven different chromosomes (Fig. 2, Supple-

mentary 1). The majority of QTL was revealed in South-East Kazakhstan, where the severity of LR was on a maximum level. Four of QTL for LR resistance were located on 3B chromosome on short distances from each other. One QTL is observed on 3A chromosome while remaining five QTL were on chromosomes 1B, 1D, 2A, 2B and 4B.

Among all identified QTL for LR, the *QLR.IPBB-3B.1* located on the 3B chromosome was detected in the South-East region during the peak of infection. It had demonstrated the highest 7.8 LOD score among the others and explained 27 % of the phenotypic variances. Other QTL demonstrated LOD score in the range from 3.3 up to 6.0 and phenotypic variances from 11 to 20 %.

Nine tentative QTL for SR were detected in this study (Fig. 3, see Supplementary 1). All of them are distributed among six chromosomes, where 3B chromosome contained three QTL, 6B chromosome – two QTL while remaining QTL were spread in chromosomes 1A, 2B, 2D, and 4A. The majority of QTL for SR resistance was identified in the North region, while there was only one QTL identified in the South-East. The highest LOD score was observed for two QTL – *QSR.IPBB-2D* and *QSR.IPBB-6B.1* – on chromosomes 2D and 6B, and explained 22 and 20 % of the stem rust resistance variances, respectively.

Discussion

Identified QTL for LR resistance and their comparison to previously LR mapping studies. The literature survey suggests that LR pathotypes of infections, as well as the sources of infection and wheat genes that are effective against them, are different in two regions. For example, in South-East Kazakhstan, seven *Lr* genes were reported to be highly effective (0R, 1–5 MR) – *Lr9*, *Lr12*, *Lr13*, *Lr18*, *Lr19*, *Lr24*, and *Lr37* (Koyshybaev, 2018). In the North, the difference in *Lr* genes effectiveness was observed even between two sites. For Akmola site, there were nine genes with good effective-

¹ Supplementary Materials 1 and 2 are available in the online version of the paper: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2019-23/appx20.pdf>

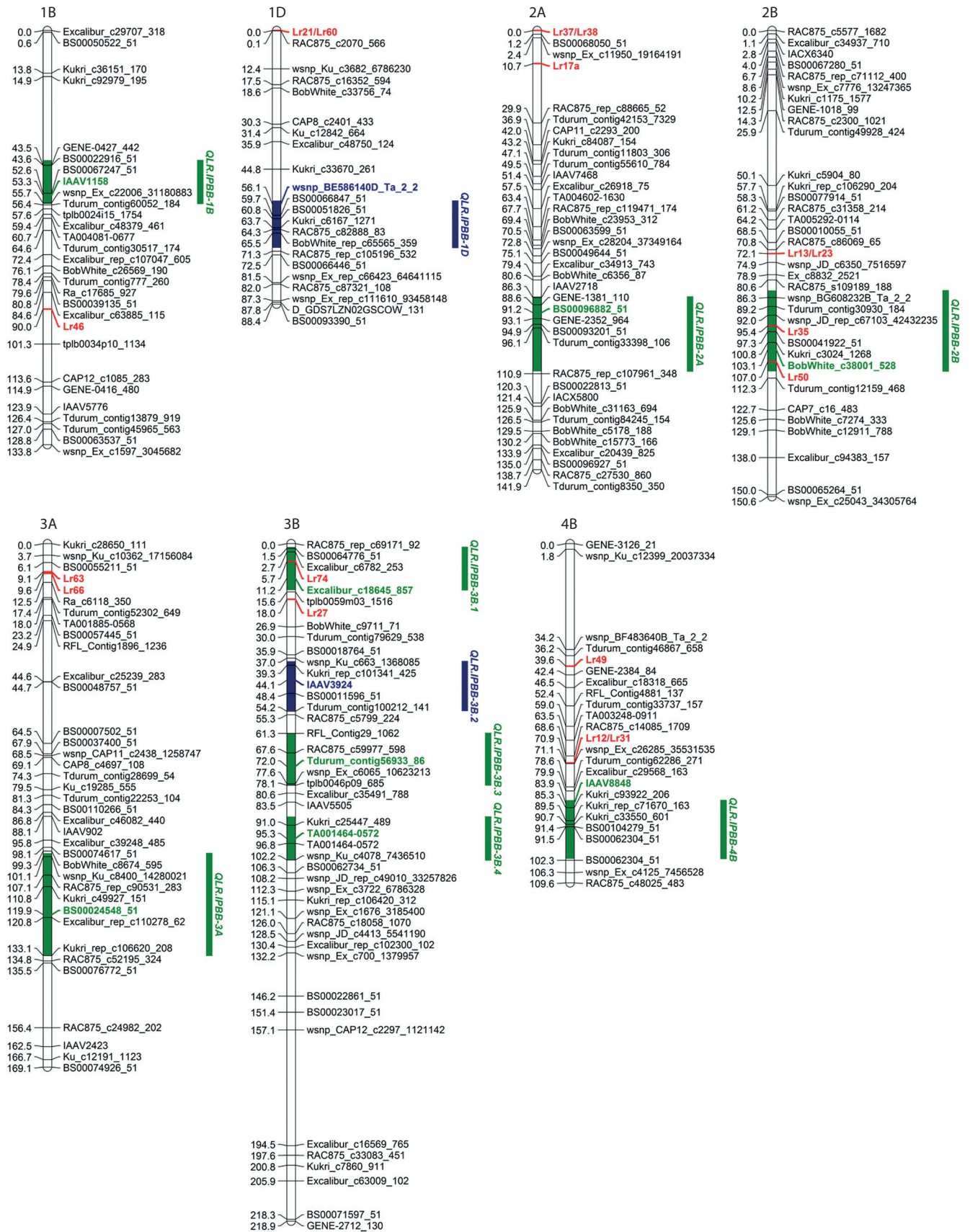


Fig. 2. Genetic map with QTL for leaf rust (LR) resistance detected using mapping population ‘Pamyati Azieva×Paragon’ and previously mapped *Lr* genes.

In each case, the genomic region containing the QTL is indicated by the vertical bar on the right and followed by the name of the QTL. SNP markers are indicated on the right, and their genetic positions (cM) are shown on the left. Peak marker for each QTL is highlighted in bold.

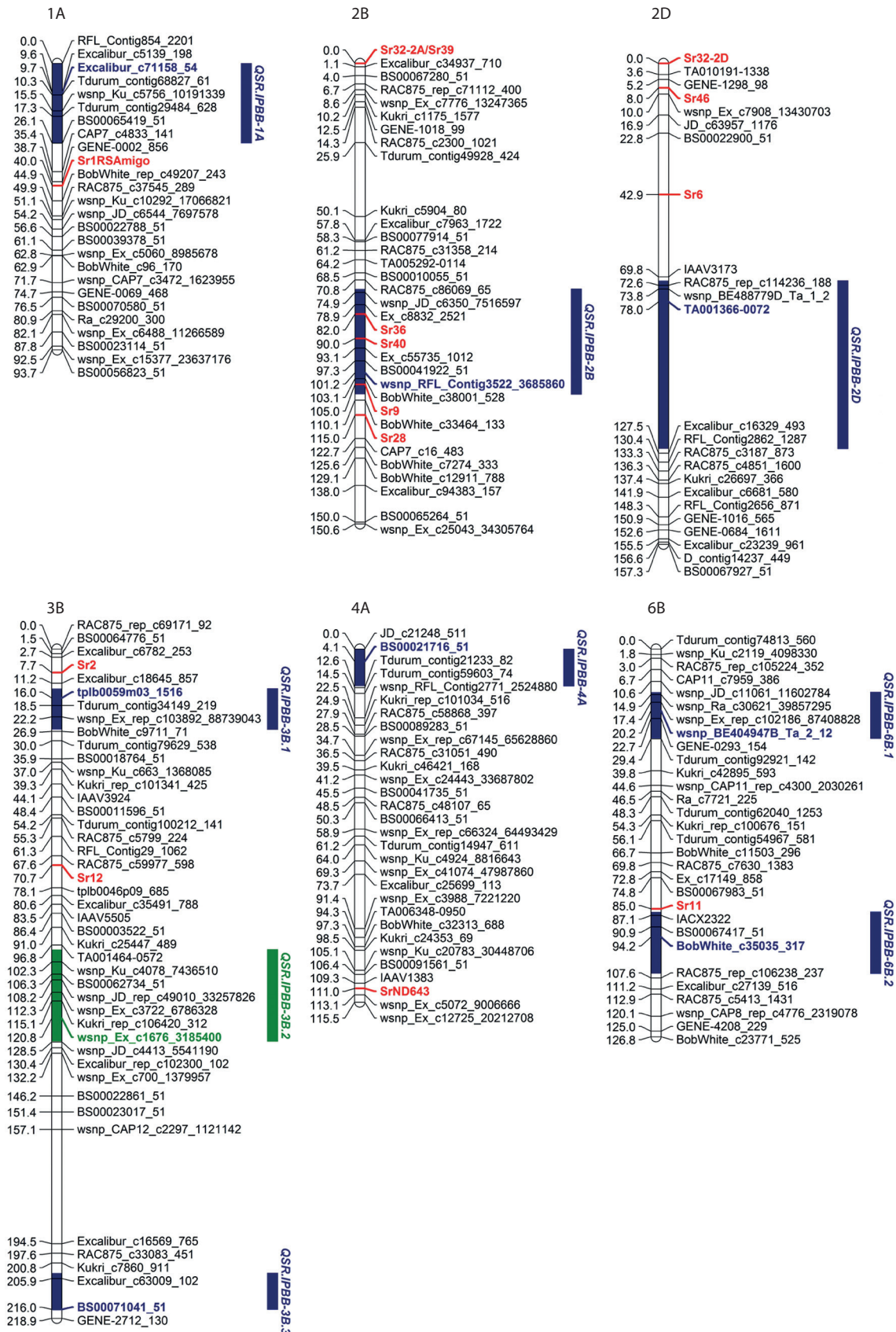


Fig. 3. QTL for stem rust (SR) resistance identified in mapping population 'Pamyati Azieva x Paragon' and previously mapped Sr genes.

In each case, the genomic region containing the QTL is indicated by the vertical bar on the right and followed by the name of the QTL. SNPs are indicated on the right, and their genetic positions (cM) are shown on the left. Peak marker for each QTL is highlighted in bold.

ness – *Lr9*, *Lr12*, *Lr13*, *Lr19*, *Lr23*, *Lr24*, *Lr28*, *Lr33*, and *Lr35*, while for North Kazakhstan site only three genes were highly effective – *Lr9*, *Lr28*, and *Lr36* (Koyshybaev, 2018). Here, ten QTL for LR were identified for two studied regions, and there were no matchings between them. Differences in QTL identification in North and South-East regions agreed with the data on differences in the composition of the pathogen populations between these regions (Koyshybaev, 2018). All comparison information concerning candidate genes and previously mentioned resistance QTL in the literature is presented in Supplementary 2.

One of two QTL identified in the North (*QLR.IPBB-1D*) is located in the long arm of 1D chromosome. The 1D chromosome has four *Lr* genes (see Supplementary 2) positioned on the far distances from the *QLR.IPBB-1D*. The second association found in the North region was *QLR.IPBB-3B.2*. The locus was within the interval of 38.0–54.0 cM on the 3B chromosome, near the locus *QLR.IPBB-3B.3*, which was identified in the South-East study. The *QLR.IPBB-3B.2* was distantly located from both *Lr27* and *Lr74* genes (see Fig. 2, Supplementary 2), but in close proximity to QTL described earlier (Gao et al., 2016; Zhang et al., 2017). Interestingly, none of *Lr* genes or QTL on chromosomes 1D and 3B had been described as effective in Kazakhstan before.

Field assessment of LR resistance in South-East allowed revealing eight QTL in six different chromosomes (see Supplementary 2). These QTL can be formally separated into two groups: the first group has QTL overlapping with previously identified and well described *Lr* genes, and the second group has QTL identified in this study. The first group is presented by two QTL on 2B and 3B chromosomes. On 2B chromosome, the *QLR.IPBB-2B* has similar positions with *Lr35* and *Lr50* (see Supplementary 2). Also, Gao and colleagues (Gao et al., 2016) and Zhang with co-authors (Zhang et al., 2017) identified similar QTL for LR in this part of the genome. The *Lr35* was previously described as highly effective in East, West, and North Kazakhstan regions (Koyshybaev, 2018). The second QTL *QLR.IPBB-3B.1* is positioned in the interval 1.1–15.0 cM of 3B chromosome, where it possibly overlaps with *Lr74* located approximately 4.9 cM away from *xgwm533* at 10.6 cM (Quarrie et al., 2005). Also, *Lr27* is another previously reported gene located in this region (see Supplementary 2). Notably, *QLR.IPBB-3B.1* was the most significant QTL for LR identified in this study with the highest R² and additive effect.

The remaining six QTL for LR belong to the second group of putatively new genetic factors for studied environments. The first QTL from this group is *QLR.IPBB-1B* that located on the 1B chromosome. There are two QTL for LR described by Kumar and colleagues (Kumar et al., 2013) and Gao with co-authors (Gao et al., 2016) that were positioned in the same vicinity as the *QLR.IPBB-1B*. The *QLR.IPBB-2A* was the only identified association on 2A chromosomes in this study, and it was mapped in the interval 86.0–110.1 cM. The interval of the *QLR.IPBB-2A* is near to genetic positions of QTL for LR resistance that were described in previous studies (Kumar et al., 2013; Gao et al., 2016). The *QLR.IPBB-3A* was located in the interval 100.0–133.1 cM, and it is coinciding with the position of QTL for LR resistance described by Chu with colleagues (Chu et al., 2009). On the 3B chromosome, two

QTL for LR were identified in this group of study in South-East region. These are *QLR.IPBB-3B.3* and *QLR.IPBB-3B.4* positioned in 61.2–78.1 and 88.2–102.3 cM intervals, respectively. It appears that QTL for LR in these regions were previously identified (Kumar et al., 2013; Muhammad et al., 2018). Finally, the *QLR.IPBB-4B* was located in the interval 82.9–101.8 cM, which is overlapping with the position of QTL for LR resistance described by Gao and co-authors (Gao et al., 2016).

As all identified genetic factors associated with the resistance to LR in this study were genetically positioned with associations identified in recent GWAS for LR resistance (Gao et al., 2016; Muhammad et al., 2018), it is strong indications that QTL identified in this study may play an important role in local breeding projects.

Identified QTL for SR resistance and their comparison to previously SR mapping studies. Unlike in LR study, where the majority of QTL for SR were found based on the data from South-East, in SR study almost all QTL (8 out of 9) were identified in the North region. The only SR resistant locus from the South-East was *QSR.IPBB-3B.2* in the interval 98.3–128.3 cM on the 3B chromosome, and it was significantly far from *Sr* genes mapped in this linkage group (see Supplementary 2). Other QTL for SR resistance can also be formally divided into two groups, likewise in LR study. The first group of marker-trait associations includes four QTL. The *QSR.IPBB-1A* was located in the interval 0–26.0 cM at a relatively short distance from the *Sr1RS^{Amigo}* mapped at 40.0 cM (Yu et al., 2014), and two QTL described in other studies (Yu et al., 2012; Bajgain et al., 2016). The next QTL *QSR.IPBB-2B* lies in the interval 73.8–108.2 cM and overlaps with three mapped *Sr* genes (*Sr9*, *Sr36*, and *Sr40*) and adjoins *Sr28* (see Fig. 3), as well as several QTL for SR from literature (Yu et al., 2012; Bajgain et al., 2015; Edae et al., 2018). Two of these genes – *Sr9* and *Sr36* – were distinguished as effective against the Western Siberian population of SR (Shamanin et al., 2011). On the 3B chromosome, there are three identified QTL for SR, but only *QSR.IPBB-3B.1* was positioned in the vicinity of previously mapped gene *Sr2*, and QTL for SR resistance described by Elbasyoni with co-authors (Elbasyoni et al., 2017). Notably, the *Sr2* is the most important disease resistance gene to be deployed in modern plant breeding and provided partial resistance for many years over large areas and under high and prolonged disease pressure in the field (Ellis et al., 2014). Finally, the *QSR.IPBB-6B.2* was positioned just in 2.1 cM from *Sr11* (see Supplementary 2).

The second group of QTL for SR resistance included associations that previously were not mentioned in Kazakhstan. This group was comprised of five QTL located on chromosomes 2D, 3B, 4A, and 6B. The region 71.1–126.0 cM of chromosome 2D, which is associated with the *QSR.IPBB-2D*, has not been mentioned in connection with previous QTL for SR mapping studies. The *QSR.IPBB-2D* demonstrated the highest impact on the SR resistance in this study, explaining 22 % of the variation. Also, on the 3B chromosome, there is *QSR.IPBB-3B.3*, which is another presumably novel QTL for SR resistance in Kazakhstan. The *QSR.IPBB-4A* on the 4A chromosome resembles two SR-associated loci described in previous studies (see Supplementary 2) (Basnet et al., 2015), but it has no candidate *Sr* genes nearby. The remaining QTL

QSR.IPBB-6B.1 was located in the short arm of the 6B chromosome. It seems that the position of the *QSR.IPBB-6B.1* is matching the position of QTL for SR resistance that was previously described by Yu with co-authors (Yu et al., 2012).

Conclusion

The constructed RILs MP 'Pamyati Azieva × Paragon' was very efficient in the identification of QTL for LR and SR resistance in bread wheat. The MP consisted of 98 RILs and analyzed by using 4595 polymorphic SNP markers densely populated all 21 wheat chromosomes. Field trials output suggested a negative correlation between LR and SR severity and key yield components in the North and South-East regions of Kazakhstan. The CIM method allowed the identification of ten QTL for LR and nine QTL SR resistance associated with resistance to these two rust diseases. The comparative analysis of the findings in this study and reports from previously published data suggested that the majority of identified QTL were well described in existed literature, confirming the robustness of obtained results. Nevertheless, two QTL for SR identified in the North region of the country were never described before, and they are presumably novel genetic factors. Overall, identified QTL both for LR and SR resistances in newly developed MP 'Pamyati Azieva × Paragon' can be efficiently used in local breeding projects for higher yield in bread wheat.

References

- Afzal S.N., Haque M.I., Ahmedani M.S., Rauf A., Munir M., Firdous S.S., Rattu A.R., Ahmad I. Impact of stripe rust on the kernel weight of the wheat varieties sown in rainfed area of Pakistan. *Pak. J. Bot.* 2008;40(2):923-929.
- Agabaeva A.Ch., Rsaliev Sh.S. Pathogenic properties of wheat leaf rust pathogen (*Puccinia triticina* Erikss.) in Kazakhstan. *Novosti Nauki Kazakhstana = Science News of Kazakhstan.* 2013;1:66-74. (in Russian)
- Akhmetova A.K., Karataeva R.K., Suleimenov R.M., Zelensky Yu.I., Morgunov A.I., Zhapaev R.K., Karabaev M.K. Test of cultivars and lines of durum wheat for resistance to leaf rust in the conditions of North Kazakhstan (Akmola region). *Modern Microbiology in Russia.* 2015;15:7-8. (in Russian)
- Bajgain P., Rouse M.N., Bulli P., Bhavani S., Gordon T., Wanyera R., Njau P.N., Legesse W., Anderson J.A., Pumphrey M.O. Association mapping of North American spring wheat breeding germplasm reveals loci conferring resistance to Ug99 and other African stem rust races. *BMC Plant Biol.* 2015;15:249. DOI 10.1186/s12870-015-0628-9.
- Bajgain P., Rouse M.N., Tsilo T.J., Macharia G.K., Bhavani S., Jin Y., Anderson J.A. Nested association mapping of stem rust resistance in wheat using genotyping by sequencing. *PLoS One.* 2016;11(5): e0155760. DOI 10.1371/journal.pone.0155760.
- Basnet B.R., Singh S., Lopez-Vera E.E., Huerta-Espino J., Bhavani S., Jin Y., Rouse M.N., Singh R.P. Molecular mapping and validation of SrND643: a new wheat gene for resistance to the stem rust pathogen Ug99 race group. *Phytopathology.* 2015;105(4):470-476. DOI 10.1094/PHYTO-01-14-0016-R.
- Bhardwaj S.C., Prashar M., Prasad P. Ug99-Future Challenges. In: Goyal A., Manoharachary C. (Eds.). *Future Challenges in Crop Protection Against Fungal Pathogens.* Fungal Biology. Springer, New York, 2014.
- Bolton M.D., Kolmer J.A., Garvin D.F. Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Mol. Plant Pathol.* 2008;9(5):563-575. DOI 10.1111/j.1364-3703.2008.00487.x.
- Bushnell W.R., Roelfs A.P. (Eds.). *The Cereal Rusts. Vol. 1. Origins, Specificity, Structure, and Physiology.* Academic Press, 1984.
- Chu C., Friesen T.L., Xu S.S., Faris J.D., Kolmer J.A. Identification of novel QTLs for seedling and adult plant leaf rust resistance in a wheat doubled haploid population. *Theor. Appl. Genet.* 2009;119(2): 263-269. DOI 10.1007/s00122-009-1035-0.
- Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 1990;12:13-15.
- Edae E.A., Pumphrey M.O., Rouse M.N. A Genome-Wide Association Study of field and seedling response to individual stem rust pathogen races reveals combinations of race-specific genes in north American spring wheat. *Front. Plant Sci.* 2018;9:52. DOI 10.3389/fpls.2018.00052.
- Elbasyoni I., El-Orabey W.M., Baenziger P.S., Eskridge K. Association mapping for leaf and stem rust resistance using worldwide spring wheat collection. *Asian J. Biol.* 2017;4(3):1-25. DOI 10.9734/AJOB/2017/38120.
- Ellis J.G., Lagudah E.S., Spielmeyer W., Dodds P.N. The past, present and future of breeding rust resistant wheat. *Front. Plant Sci.* 2014; 5:641. DOI 10.3389/fpls.2014.00641.
- Gao L., Turner M.K., Chao S., Kolmer J., Anderson J. Genome Wide Association Study of seedling and adult plant leaf rust resistance in elite spring wheat breeding lines. *PLoS One.* 2016;11(2):e0148671. DOI 10.1371/journal.pone.0148671.
- Goutam U., Kukreja S., Yadav R., Salaria N., Thakur K., Goyal A.K. Recent trends and perspectives of molecular markers against fungal diseases in wheat. *Front. Microbiol.* 2015;6:861. DOI 10.3389/fmicb.2015.00861.
- Gulyaeva E.I., Shaydayuk E.L., Shamanin V.P., Akhmetova A.K., Tyunin V.A., Shreider E.R., Kashina I.V., Eroshenko L.A., Sereida G.A., Morgunov A.I. Genetic structure of Russian and Kazakhstani leaf rust causative agent *Puccinia triticina* Erikss. populations as assessed by virulence profiles and SSR markers. *Agricultural Biology.* 2018;53(1):85-95. DOI 10.15389/agrobiology.2018.1.85eng.
- Kokhmetova A.M., Atishova M.N. Identification of stem rust resistance sources in wheat by using molecular markers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2012;16(1):132-141. (in Russian)
- Kokhmetova A.M., Sedlovsky A.I., Tyupina L.N., Esenbekova G.T. Identification of rust resistant wheat germplasm using genetic and molecular markers. *Byulleten' GNBS = Bulletin of the State Nikita Botanical Gardens.* 2009;99:41-45. (in Russian)
- Koyshybaev M. The role of disease-resistant cultivars in the integrated protection of wheat. *Zashchita i Karantin Rastenii = Plant Protection and Quarantine.* 2010;3:30-33. (in Russian)
- Koyshybaev M. *Wheat Diseases.* Ankara: Turkey, 2018. (in Russian)
- Koyshybaev M., Kanafin B.K., Fedorenko E.N., Gots A.Yu., Litovchenko Zh.I. Stability sources of spring soft wheat to types of rust and *Septoria* in North Kazakhstan. *Int. Res. J.* 2017;12(66):117-122. DOI 10.23670/IRJ.2017.66.098. (in Russian)
- Kumar A., Chhuneja P., Jain S., Kaur S., Balyan H.S., Gupta P.K. Mapping main effect QTL and epistatic interactions for leaf rust and yellow rust using high density ITMI linkage map. *AJCS.* 2013; 7(4):492-499.
- Mains E.B., Jackson H.S. Physiologic specialization in the leaf rust of wheat *Puccinia triticina* Erikss. *Phytopathology.* 1926;16(2): 89-120.
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C.F., Xia X.C. *Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 2017 Supplement.*
- McIntosh R.A., Devos K.M., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C.F., Appels R., Somers J., Anderson O.A. *Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 2007 Supplement.*
- McIntosh R.A., Hart G.E., Devos K.M., Gale M.D., Rogers W.J. *Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 1998 Supplement.*
- Muhammad S., Ahmad A., Awan F.S., Khan A.I., Qasim M., Rehman A., Rehman A., Javed M.A., Manzoor I., Sajjad M. Genome wide association analysis for leaf rust resistance in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm. *Int. J. Agric. Biol.* 2018;20:1117-1122. DOI 10.17957/IJAB/15.0765.

- Peterson R.F., Campbell A.B., Hannah A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals. *Can. J. Res.* 1948;26:496-500.
- Price A.H. Believe it or not, QTLs are accurate! *Trends Plant Sci.* 2006; 11:213-216. DOI 10.1016/j.tplants.2006.03.006.
- Quarrie S.A., Steed A., Calestani C., Semikhodskii A., Lebreton C., Chinoy C., Steele N., Pljevljakusić D., Waterman E., Weyen J., Schondelmaier J., Habash D.Z., Farmer P., Saker L., Clarkson D.T., Abugaliev A., Yessimbekova M., Turuspekov Y., Abugaliev S., Tuberosa R., Sanguineti M.-C., Hollington P.A., Aragués R., Royo A., Dodig D. A high-density genetic map of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) from the cross Chinese Spring × SQ1 and its use to compare QTLs for grain yield across a range of environments. *Theor. Appl. Genet.* 2005;110(5):865-880. DOI 10.1007/s00122-004-1902-7.
- Roelfs A., Singh R., Saari E.E. Rust diseases of wheat: concepts and methods of disease management. CIMMYT, Mexico, 1992.
- Rsaliev A.S. Wheat stem rust pathotypes in Kazakhstan. *Zashchita i Karantin Rastenii = Plant Protection and Quarantine.* 2011;10:41. (in Russian)
- Rsaliev Sh.S., Koysybaev M.K., Morgunov A.I., Kolmer D. Analysis of the composition of the stem and leaf rust of wheat in Kazakhstan. In: *Modern Problems of Plant Protection and Quarantine: Collection of articles of the Int. scientific-practical conf. Almaty.* 2005;1:267-272. (in Russian)
- Shamanin V.P., Morgunov A.I., Manes Y., Zelensky Yu.I., Chursin A.S., Levshunov M.A. Breeding of spring common wheat for resistance to local populations and virulent race Ug99 of stem rust in West Siberia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2010;14(2):223-231. (in Russian)
- Shamanin V.P., Pototskaya I.V., Kuzmina S.P., Trushchenko A.Yu., Chursin A.S. Selection of spring wheat for resistance to brown and stem rust in Western Siberia. *Omskii Nauchnyi Vestnik = Omsk Scientific Bulletin.* 2011;1(104):255-257. (in Russian)
- Singh R.P., Hodson D.P., Huerta-Espino J., Jin Y., Bhavani S., Njau P., Herrera-Foessel S., Singh P.K., Singh S., Govindan V. The emergence of Ug99 races of the stem rust fungus is a threat to world wheat production. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2011;49:465-481. DOI 10.1146/annurev-phyto-072910-095423.
- Soko T., Bender C.M., Prins R., Pretorius Z.A. Yield loss associated with different levels of stem rust resistance in bread wheat. *Plant Dis.* 2018;102(12):2531-2538. DOI 10.1094/PDIS-02-18-0307-RE.
- Stakman E.C., Stewart D.M., Loegering W.Q. Identification of physiologic races of *Puccinia graminis* var. *tritici*. *U.S. Agric. Res. Serv.* 1962;617:1-53.
- Turuspekov Y., Baibulatova A., Yermekbayev K., Tokhetova L., Chudinov V., Sereda G., Ganal M., Griffiths S., Abugaliev S. GWAS for plant growth stages and yield components in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) harvested in three regions of Kazakhstan. *BMC Plant Biol.* 2017a;17(Suppl.1):190. DOI 10.1186/s12870-017-1131-2.
- Turuspekov Y., Plieske J., Ganal M., Akhunov E. Phylogenetic analysis of wheat cultivars in Kazakhstan based on the wheat 90 K single nucleotide polymorphism array. *Plant Genet. Resour.* 2017b;15(1):29-35. DOI 10.1017/S1479262115000325.
- Voorrips R.E. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J. Hered.* 2002;93(1):77-78. DOI 10.1093/jhered/93.1.77.
- Xu Y., Li P., Yang Z., Xu C. Genetic mapping of quantitative trait loci in crops. *Crop J.* 2017;5(2):175-184. DOI 10.1016/j.cj.2016.06.003.
- Yang Z., Chen Z., Peng Z., Yu Y., Liao M., Wei S. Development of a high-density linkage map and mapping of the three-pistil gene (*Pis1*) in wheat using GBS markers. *BMC Genomics.* 2017;18:567. DOI 10.1186/s12864-017-3960-7.
- Yu L., Barbier H., Rouse M.N., Singh S., Singh R.P., Bhavani S., Huerta-Espino J., Sorrells M.E. A consensus map for Ug99 stem rust resistance loci in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2014;127(7):1561-1581. DOI 10.1007/s00122-014-2326-7.
- Yu L.X., Morgunov A., Wanyera R., Keser M., Singh S.K., Sorrells M. Identification of Ug99 stem rust resistance loci in winter wheat germplasm using genome-wide association analysis. *Theor. Appl. Genet.* 2012;125(4):749-758. DOI 10.1007/s00122-012-1867-x.
- Zadoks J.C., Chang T.T., Konzak C.F. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res.* 1974;14:415-421.
- Zhang D., Bowden R., Bai G. A method to linearize Stakman infection type ratings for statistical analysis. In: McIntosh R. (Ed.) *Proceedings Borlaug Global Rust Initiative 2011 Technical Workshop.* Saint Paul, Minnesota, USA, 2011.
- Zhang P., Yin G., Zhou Y., Qi A., Gao F., Xia X., He Z., Li Z., Liu D. QTL mapping of adult-plant resistance to leaf rust in the wheat cross Zhou 8425b/Chinese Spring using high-density SNP markers. *Front. Plant Sci.* 2017;8:793. DOI 10.3389/fpls.2017.00793.

ORCID ID

Y. Genievskaya orcid.org/0000-0001-5987-2952
A. Amalova orcid.org/0000-0002-7903-3467
S. Abugaliev orcid.org/0000-0002-9748-507X
Y. Turuspekov orcid.org/0000-0001-8590-1745

Acknowledgements. This work was done in the framework of the project "Development of new DNA markers associated with the resistance of bread wheat to the most dangerous fungal diseases in Kazakhstan" in Program "Development of the innovative systems for increasing the resistance of wheat varieties to especially dangerous diseases in the Republic of Kazakhstan" BR06249329 supported by the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received August 21, 2019. Revised September 23, 2019. Accepted September 23, 2019.

The Fifth International Scientific Conference PlantGen2019

The cinnamyl alcohol dehydrogenase gene family is involved in the response to *Fusarium oxysporum* in resistant and susceptible flax genotypes

R.O. Novakovskiy¹, L.V. Povkhova^{1, 2}, G.S. Krasnov¹, T.A. Rozhmina^{1, 3}, A.A. Zhuchenko^{3, 4}, L.P. Kudryavtseva³, E.N. Pushkova¹, P. Kezimana^{1, 5}, A.V. Kudryavtseva¹, A.A. Dmitriev¹, N.V. Melnikova¹ ✉¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia² Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow Region, Russia³ Federal Research Center for Bast Fiber Crops, Torzhok, Russia⁴ All-Russian Horticultural Institute for Breeding, Agrotechnology and Nursery, Moscow, Russia⁵ Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia

✉ e-mail: mnv-4529264@yandex.ru

Flax (*Linum usitatissimum* L.) is used for the production of textile, oils, pharmaceuticals, and composite materials. Fusarium wilt, caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*, is a very harmful disease that reduces flax production. Flax cultivars that are resistant to Fusarium wilt have been developed, and the genes that are involved in the host response to *F. oxysporum* have been identified. However, the mechanisms underlying resistance to this pathogen remain unclear. In the present study, we used transcriptome sequencing data obtained from susceptible and resistant flax genotypes grown under control conditions or *F. oxysporum* infection. Approximately 250 million reads, generated with an Illumina NextSeq instrument, were analyzed. After filtering to exclude the *F. oxysporum* transcriptome, the remaining reads were mapped to the *L. usitatissimum* genome and quantified. Then, the expression levels of cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) family genes, which are known to be involved in the response to *F. oxysporum*, were evaluated in resistant and susceptible flax genotypes. Expression alterations in response to the pathogen were detected for all 13 examined CAD genes. The most significant differences in expression between control and infected plants were observed for *CAD1B*, *CAD4A*, *CAD5A*, and *CAD5B*, with strong upregulation of *CAD1B*, *CAD5A*, and *CAD5B* and strong downregulation of *CAD4A*. When plants were grown under the same conditions, the expression levels were similar in all studied flax genotypes for most CAD genes, and statistically significant differences in expression between resistant and susceptible genotypes were only observed for *CAD1A*. Our study indicates the strong involvement of CAD genes in flax response to *F. oxysporum* but brings no evidence of their role as resistance gene candidates. These findings contribute to the understanding of the mechanisms underlying the response of flax to *F. oxysporum* infection and the role of CAD genes in stress resistance.

Key words: flax; *Linum usitatissimum*; resistant cultivars; *Fusarium oxysporum*; RNA-Seq; transcriptome; CAD.

For citation: Novakovskiy R.O., Povkhova L.V., Krasnov G.S., Rozhmina T.A., Zhuchenko A.A., Kudryavtseva L.P., Pushkova E.N., Kezimana P., Kudryavtseva A.V., Dmitriev A.A., Melnikova N.V. The cinnamyl alcohol dehydrogenase gene family is involved in the response to *Fusarium oxysporum* in resistant and susceptible flax genotypes. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(7):896-901. DOI 10.18699/VJ19.564

Семейство генов дегидрогеназ коричневого спирта вовлечено в ответ устойчивых и восприимчивых генотипов льна на заражение *Fusarium oxysporum*

Р.О. Новаковский¹, Л.В. Повхова^{1, 2}, Г.С. Краснов¹, Т.А. Рожмина^{1, 3}, А.А. Жученко^{3, 4}, Л.П. Кудрявцева³, Е.Н. Пушкова¹, П. Кезимана^{1, 5}, А.В. Кудрявцева¹, А.А. Дмитриев¹, Н.В. Мельникова¹ ✉¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия² Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Московская область, Россия³ Федеральный научный центр лубяных культур, Торжок, Россия⁴ Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства, Москва, Россия⁵ Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

✉ e-mail: mnv-4529264@yandex.ru

Лен (*Linum usitatissimum* L.) используется для производства текстиля, масел, фармацевтических препаратов и композитных материалов. Крайне вредоносным заболеванием, снижающим урожайность льна, является фузариозное увядание, вызываемое грибом *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. Созданы устойчивые к фузариозному увяданию сорта льна и определены гены, вовлеченные в ответ на *F. oxysporum*, однако механизмы устойчивости *L. usitatissimum* к этому патогену до сих пор неясны. В настоящем исследовании мы использо-

вали данные секвенирования транскриптомов восприимчивых и устойчивых генотипов льна, выращенных в контрольных условиях или зараженных *F. oxysporum*. Проанализировано около 250 миллионов прочтений, полученных на секвенаторе NextSeq Illumina. После фильтрации прочтений для исключения транскриптома *F. oxysporum* оставшиеся прочтения картировали на геном *L. usitatissimum* и провели их количественный анализ. Оценили экспрессию генов семейства *CAD*, которые, как известно, участвуют в ответе на заражение *F. oxysporum*, у устойчивых и восприимчивых к фузариозному увяданию генотипов. Изменение экспрессии в ответ на возбудителя выявили для всех 13 исследованных генов *CAD*. Наиболее значительные различия в экспрессии между контрольными и инфицированными растениями наблюдались для генов *CAD1B*, *CAD4A*, *CAD5A* и *CAD5B*: сильное повышение экспрессии выявлено для *CAD1B*, *CAD5A* и *CAD5B*, а сильное снижение – для *CAD4A*. Для большинства генов *CAD* уровни экспрессии были близкими при одинаковых условиях выращивания для всех изученных генотипов льна. Статистически значимое различие в изменении экспрессии между группами устойчивых и восприимчивых генотипов выявлено только для гена *CAD1A*. Наше исследование указывает на активное участие генов *CAD* в ответе растений льна на *F. oxysporum*, но не приводит свидетельств их роли в качестве кандидатов в гены устойчивости. Полученные результаты вносят вклад в понимание механизмов ответа льна на заражение *F. oxysporum* и роли генов *CAD* в устойчивости к стрессовым воздействиям.

Ключевые слова: лен; *Linum usitatissimum*; устойчивые сорта; *Fusarium oxysporum*; RNA-Seq; транскриптом; *CAD*.

Introduction

Flax (*Linum usitatissimum* L.) is an agricultural crop with numerous uses. High-quality fiber can be obtained from flax stems and is used for the production of textile and fiber-based materials for the healthcare, military, aerospace, and electronics industries (Costa et al., 2018). Flaxseed is also used in the production of pharmaceuticals, functional foods, and other products for human consumption, while linseed is used in paints, varnishes, and animal feed (Singh et al., 2011; Goyal et al., 2014). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* is a harmful pathogen that reduces flax production and quality (Rashid, 2003). Flax genotypes showing resistance to *Fusarium* wilt have been identified, and cultivars with improved resistance have been bred (Diederichsen et al., 2008; Rozhmina et al., 2017). However, the molecular mechanisms underlying resistance to *Fusarium* wilt remain unclear, and the search for genes involved in the response to *F. oxysporum* is an area of active research. The involvement of pathogenesis-related proteins in the response to *F. oxysporum* infection was demonstrated (Wrobel-Kwiatkowska et al., 2004; Wojtasik et al., 2014; Galindo-Gonzalez, Deyholos, 2016), and the roles of antioxidants, polyamines, and phenolic compounds in response to the pathogen were shown (Lorenc-Kukula et al., 2007, 2009; Boba et al., 2011, 2016; Zeitoun et al., 2014; Wojtasik et al., 2015). Moreover, *F. oxysporum*-infected flax plants show cell wall rearrangements (Wojtasik et al., 2015, 2016; Boba et al., 2016).

Cinnamyl-alcohol dehydrogenases (CADs) are involved in the biosynthesis of lignin, which can function as a barrier against pathogens, and the role of *CAD* genes in the response to *F. oxysporum* was previously shown (Wrobel-Kwiatkowska et al., 2007; Preisner et al., 2014, 2018). Plants with downregulated *CAD* showed reduced (Wrobel-Kwiatkowska et al., 2007) or slightly decreased (Preisner et al., 2014) resistance to *F. oxysporum*. Sixteen *CAD* genes were identified in *L. usitatissimum* and their roles in plant growth and stress responses were examined in the Nike cultivar, which is relatively resistant to *Fusarium* infection (Preisner et al., 2018). In the present study, we evaluated the expression of *CAD* genes in resistant and susceptible flax genotypes under control conditions and *F. oxysporum* infection to determine the general trends in response to the pathogen and genotype-specific alterations in expression.

Materials and methods

Two *F. oxysporum*-susceptible flax cultivars (TOST and AP5), two resistant cultivars (3896 and Dakota), and two resistant BC₂F₅ populations (3896 × AP5, recurrent parent AP5, and Dakota × AP5, recurrent parent AP5) were used in the present study. Seeds were obtained from the Institute for Flax (Torzhok, Russia) and sterilized, first in 70 % ethanol for 1 min and then in 1 % sodium hypochlorite for 20 min. The plants were grown in 15 ml glass tubes on Murashige–Skoog medium in a growth chamber at 22 °C under a 16/8 h day/night cycle for seven days. Then, half of the plants were inoculated with *F. oxysporum* (pathogenic isolate #39 from the phytopathogen collection of the Institute for Flax); the remaining uninoculated plants were used as controls. Forty-eight hours later, the root tips were collected and frozen in liquid nitrogen. In total, the material was obtained from 240 plants.

Total RNA was extracted from the pooled plants (10–12 plants each) using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, USA). We obtained 24 RNA samples from the TOST, AP5, 3896, Dakota, 3896 × AP5, and Dakota × AP5 plants under control and infection in duplicate. The quality and concentration of the isolated RNA were evaluated using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA) and Qubit 2.0 fluorometer (Life Technologies, USA). The TruSeq Stranded Total RNA Sample Prep Kit (Illumina, USA) was used to prepare the cDNA library. The libraries were sequenced on a NextSeq500 sequencer (Illumina) with 80-nucleotide paired-end reads (SRP119227, Sequence Read Archive).

Reads were trimmed using Trimmomatic (Bolger et al., 2014) and filtered against the *F. oxysporum* reference genome as described in our previous study (Dmitriev et al., 2017). Then, the remaining reads were mapped to the *L. usitatissimum* genome (GenBank assembly: GCA_000224295.2) using STAR (Dobin et al., 2013) and quantified using BEDTools (Quinlan, Hall, 2010). The genome sites where the *CAD* family genes (*CAD1A*, *CAD1B*, *CAD2A*, *CAD2B*, *CAD3A*, *CAD3B*, *CAD4A*, *CAD4B*, *CAD5A*, *CAD5B*, *CAD6*, *CAD7*, and *CAD8*) are localized were identified in the latest *L. usitatissimum* genome assembly (GenBank assembly: GCA_000224295.2) using the data of Preisner et al. (2018). Namely, the sequences of the scaffold regions of the old *L. usitatissimum* genome assembly (GenBank: AFSQ00000000.1) that encode *CAD* transcripts were mapped to the latest *L. usitatissimum* ge-

nome assembly (GCA_000224295.2) and new coordinates were identified for the *CAD* transcripts. The counts per million (CPM) values were determined for 13 *CAD* genes in each cultivar and population under both control conditions and *Fusarium* infection, and then the $\log(\text{CPM } \textit{Fusarium} / \text{CPM control})$ values were calculated for each cultivar and BC₂F₅ population. This was performed using the equipment of the Genome Center of Engelhardt Institute of Molecular Biology (http://www.eimb.ru/rus/ckp/ccu_genome_c.php).

Results

In our previous study on the response of *L. usitatissimum* to *F. oxysporum*, we used RNA-Seq data for *de novo* transcriptome assembly and annotation and then quantified the expression levels of the identified transcripts (Dmitriev et al., 2017). Unfortunately, we had failed to identify a significant number of *CAD* family genes in our *de novo* transcriptome assembly. In the present study, we used an improved assembly of the *L. usitatissimum* genome (GCA_000224295.2), in which the scaffolds were mapped to specific chromosomes, as a reference for RNA-Seq read mapping, and *CAD* gene sequence data (Preisner et al., 2018) were used to identify the genome sites in which the *CAD* genes are located. This approach enabled us to evaluate the expression levels of all presently identified *CAD* genes in flax. Unique chromosome locations were determined for *CAD1A*, *CAD1B*, *CAD2A*, *CAD2B*, *CAD3A*, *CAD3B*, *CAD4A*, *CAD4B*, *CAD5A*, *CAD5B*, *CAD6*, and *CAD7*, while *CAD8A*, *CAD8B*, *CAD8C*, and *CAD8D* were mapped to the same region of chromosome Lu7. Therefore, we performed an expression analysis of *CAD1A*, *CAD1B*, *CAD2A*, *CAD2B*, *CAD3A*, *CAD3B*, *CAD4A*, *CAD4B*, *CAD5A*, *CAD5B*, *CAD6*, *CAD7*, and *CAD8* genes.

The expression levels of the 13 *CAD* family genes in six flax cultivars and populations grown under control conditions or inoculated with a pathogenic isolate of *F. oxysporum* were evaluated based on RNA-Seq data. The results are shown in the

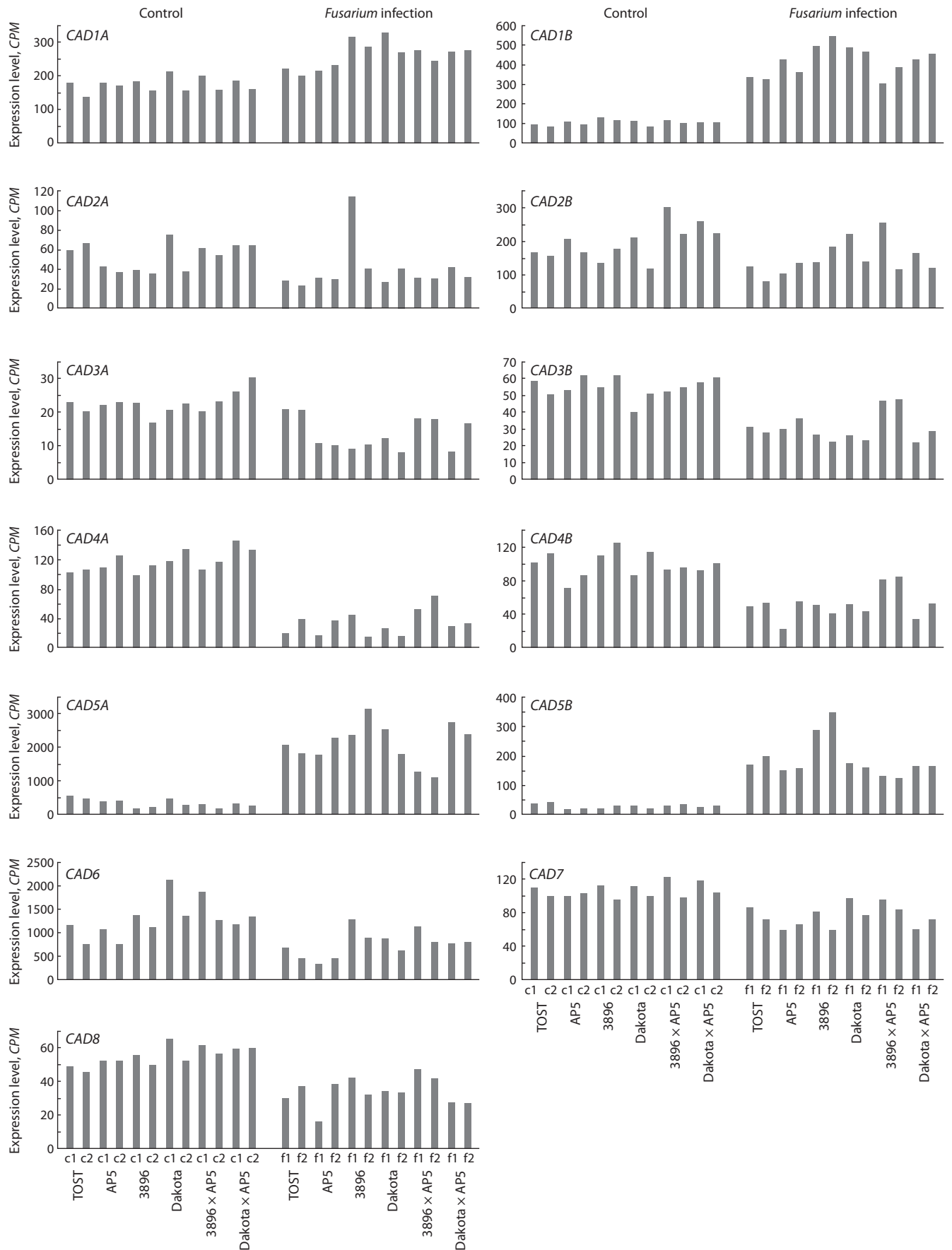
Figure, which presents the CPM values for each studied gene in resistant (3896, Dakota, 3896 × AP5, and Dakota × AP5) and susceptible (TOST and AP5) genotypes under control conditions and 48 h after inoculation with *F. oxysporum* in biological replicates. Under both conditions, the expression levels of *CAD5A* and *CAD6* were the highest, and the expression levels of *CAD2A*, *CAD3A*, *CAD3B*, and *CAD8* were the lowest. Compared to control conditions, statistically significant alterations in expression under *Fusarium* infection were observed for all 13 genes ($p < 0.01$ for all genes except *CAD2B*, which was $p < 0.05$, Mann–Whitney test). The most significant differences in expression between the control and infected plants were observed for *CAD1B*, *CAD4A*, *CAD5A*, and *CAD5B*; *CAD1B*, *CAD5A*, and *CAD5B* showed strong up-regulation under *F. oxysporum* infection, and *CAD4A* showed strong downregulation. Under the same conditions, the expression levels were similar in all studied flax genotypes for most *CAD* genes; however, some exceptions were observed. For example, the expression levels of *CAD3A*, *CAD3B*, *CAD4A*, and *CAD4B* in the infected plants of the 3896 × AP5 population were higher than those in other infected genotypes.

To identify genotype-specific expression alterations in response to *F. oxysporum* infection, the $\log(\text{CPM } \textit{Fusarium} / \text{CPM control})$ values were calculated (see the Table). In all studied genotypes, the most significant (more than 3-fold in average) increases in expression were observed for *CAD1B*, *CAD5A*, and *CAD5B*, while the most significant decreases in expression were observed for *CAD4A*. For *CAD2A*, *CAD3A*, *CAD3B*, *CAD4B*, and *CAD6*, downregulation was observed in the majority of genotypes after *F. oxysporum* infection. For *CAD2B*, *CAD7*, and *CAD8*, the decrease in expression was only slight, and for some genotypes, no decrease was observed. Statistically significant differences in expression between resistant (3896, Dakota, 3896 × AP5, and Dakota × AP5) and susceptible (TOST and AP5) genotypes were only observed for the *CAD1A* gene ($p < 0.05$, Mann–Whitney test).

Expression alterations in the *CAD* genes of *F. oxysporum* resistant and susceptible flax cultivars and populations

Gene	$\log(\text{CPM } \textit{Fusarium} / \text{CPM control})$					
	Susceptible genotypes		Resistant genotypes			
	TOST	AP5	3896	Dakota	3896 × AP5	Dakota × AP5
<i>CAD1A</i>	0.42	0.36	0.82	0.70	0.54	0.65
<i>CAD1B</i>	1.86	1.91	2.08	2.24	1.67	2.04
<i>CAD2A</i>	-1.28	-0.38	1.04*	-0.73	-0.89	-0.80
<i>CAD2B</i>	-0.65	-0.64	0.04	0.14	-0.49	-0.75
<i>CAD3A</i>	-0.07	-1.10	-1.03	-1.09	-0.26	-1.17
<i>CAD3B</i>	-0.88	-0.80	-1.26	-0.87	-0.18	-1.23
<i>CAD4A</i>	-1.80	-2.08	-1.80	-2.56	-0.86	-2.14
<i>CAD4B</i>	-1.05	-1.03	-1.34	-1.07	-0.19	-1.14
<i>CAD5A</i>	1.91	2.32	3.66	2.51	2.22	3.09
<i>CAD5B</i>	2.14	2.85	3.56	2.66	1.98	2.55
<i>CAD6</i>	-0.73	-1.18	-0.19	-1.21	-0.69	-0.70
<i>CAD7</i>	-0.40	-0.70	-0.57	-0.28	-0.30	-0.75
<i>CAD8</i>	-0.47	-0.93	-0.50	-0.77	-0.37	-1.13

* A 3-fold difference between biological replicates was observed for the *CAD2A* gene in cultivar 3896 under *Fusarium* infection (see the Figure).



Expression of *CAD* genes in resistant (3896, Dakota, 3896 x AP5, and Dakota x AP5) and susceptible (TOST and AP5) flax genotypes under control conditions (c1 and c2) and 48 h after inoculation with *F. oxysporum* (f1 and f2) in biological replicates.

Discussion

Recent progress in molecular analysis has provided novel opportunities for plant studies (Kage et al., 2015; Poland, 2015). Using high-throughput sequencing, genome and transcriptome sequences for many plant species can be obtained in a short time period and used for further research (Varshney et al., 2009; He et al., 2014). The draft genome sequence for flax was obtained in 2012 (Wang et al., 2012), and in 2018, the genome assembly was improved and chromosome-scale pseudomolecules were obtained using BioNano genome optical mapping (You et al., 2018). Flax transcriptomes and small RNAs obtained from different tissues, development stages, and under biotic and abiotic stresses have been sequenced. Such data has enabled the identification of genes and miRNAs that are expressed in particular organs and in the definite time and could play key roles in plant development, as well as the discovery of genes and miRNAs with altered expression under unfavorable conditions that are likely involved in the response to stress (Yu et al., 2014, 2016; Melnikova et al., 2015, 2016; Dmitriev et al., 2016, 2017, 2019; Galindo-Gonzalez, Deyholos, 2016; Dash et al., 2017; Gorshkova et al., 2018; Zyblytsin et al., 2018; Gorshkov et al., 2019; Krasnov et al., 2019; Wu et al., 2019).

In the present study, we used RNA-Seq data from *F. oxysporum*-resistant (3896, Dakota, 3896 × AP5, and Dakota × AP5) and -susceptible (TOST and AP5) flax genotypes grown under control conditions or 48 h after inoculation with *F. oxysporum* to evaluate the expression of *CAD1A*, *CAD1B*, *CAD2A*, *CAD2B*, *CAD3A*, *CAD3B*, *CAD4A*, *CAD4B*, *CAD5A*, *CAD5B*, *CAD6*, *CAD7*, and *CAD8* and identified the *CAD* genes that were involved in the response to the pathogen. The genes showed different expression changes after *F. oxysporum* infection: in most genotypes, *CAD1A*, *CAD1B*, *CAD5A*, and *CAD5B* were upregulated, while *CAD2A*, *CAD2B*, *CAD3A*, *CAD3B*, *CAD4A*, *CAD4B*, *CAD6*, *CAD7*, and *CAD8* were downregulated. In the study by Preisner et al. (2018), decreased expression was observed for most *CAD* genes at 24 and 96 h after *F. oxysporum* infection in the flax cultivar Nike. In the present study, the greatest expression changes in infected plants were observed for *CAD1B*, *CAD4A*, *CAD5A*, and *CAD5B*; three of these genes were upregulated, while *CAD4A* was downregulated. Our data for *CAD1B*, *CAD4A*, *CAD5A*, and *CAD5B* are consistent with the results of the previous study at 24 h after infection (Preisner et al., 2018). However, the changes observed by us were more significant, with a 3–5-fold change for *CAD1B*, a 2–5-fold change for *CAD4A*, a 4–13-fold change for *CAD5A*, and a 4–12-fold change for *CAD5B*. Based on our results, we suggest that *CAD1B*, *CAD4A*, *CAD5A*, and *CAD5B* are the most involved in the response of flax to *F. oxysporum*.

Searching for genes with diverse expression alterations in resistant and susceptible genotypes under stress conditions is important for the identification of resistance genes. In our study, statistically significant differences in expression between resistant and susceptible genotypes in response to the pathogen were observed only for *CAD1A*. Therefore, this gene could be involved in resistance to *F. oxysporum*. However, the changes were not pronounced. Thus, further investigations are necessary.

Conclusion

We performed expression analysis of *CAD* family genes after *F. oxysporum* inoculation based on RNA-Seq data and identified genes with significant up- and down-regulation after pathogen infection. The results of the present study indicate the involvement of *CAD* genes in response to *Fusarium* infection, but their role as resistance genes in the studied cultivars and populations is questionable. Our data also contribute to the understanding of the role of *CAD* genes in stress response and resistance.

References

- Boba A., Kostyn K., Kostyn A., Wojtasik W., Dziadas M., Preisner M., Szopa J., Kulma A. Methyl salicylate level increase in flax after *Fusarium oxysporum* infection is associated with phenylpropanoid pathway activation. *Front. Plant Sci.* 2016;7:1951. DOI 10.3389/fpls.2016.01951.
- Boba A., Kulma A., Kostyn K., Starzycki M., Starzycka E., Szopa J. The influence of carotenoid biosynthesis modification on the *Fusarium culmorum* and *Fusarium oxysporum* resistance in flax. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2011;76(1):39-47. DOI 10.1016/j.pmp.2011.06.002.
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114-2120. DOI 10.1093/bioinformatics/btu170.
- Costa S.M., Ferreira D.P., Ferreira A., Vaz F., Fanguero R. Multifunctional flax fibres based on the combined effect of silver and zinc oxide (Ag/ZnO) nanostructures. *Nanomaterials.* 2018;8(12):1069. DOI 10.3390/nano8121069.
- Dash P.K., Rai R., Mahato A.K., Gaikwad K., Singh N.K. Transcriptome landscape at different developmental stages of a drought tolerant cultivar of flax (*Linum usitatissimum*). *Front. Chem.* 2017;5: 82. DOI 10.3389/fchem.2017.00082.
- Diederichsen A., Rozhmina T.A., Kudryavtseva L.P. Variation patterns within 153 flax (*Linum usitatissimum* L.) genebank accessions based on evaluation for resistance to fusarium wilt, anthracnose and pasmo. *Plant Genet. Resour.* 2008;6(1):22-32.
- Dmitriev A.A., Krasnov G.S., Rozhmina T.A., Kishlyan N.V., Zyblytsin A.V., Sadritdinova A.F., Snezhkina A.V., Fedorova M.S., Yurkevich O.Y., Muravenko O.V., Bolsheva N.L., Kudryavtseva A.V., Melnikova N.V. Glutathione S-transferases and UDP-glycosyltransferases are involved in response to aluminum stress in flax. *Front. Plant Sci.* 2016;7:1920. DOI 10.3389/fpls.2016.01920.
- Dmitriev A.A., Krasnov G.S., Rozhmina T.A., Novakovskiy R.O., Snezhkina A.V., Fedorova M.S., Yurkevich O.Y., Muravenko O.V., Bolsheva N.L., Kudryavtseva A.V., Melnikova N.V. Differential gene expression in response to *Fusarium oxysporum* infection in resistant and susceptible genotypes of flax (*Linum usitatissimum* L.). *BMC Plant Biol.* 2017;17(Suppl.2):253. DOI 10.1186/s12870-017-1192-2.
- Dmitriev A.A., Krasnov G.S., Rozhmina T.A., Zyblytsin A.V., Snezhkina A.V., Fedorova M.S., Pushkova E.N., Kezimana P., Novakovskiy R.O., Povkhova L.V., Smirnova M.I., Muravenko O.V., Bolsheva N.L., Kudryavtseva A.V., Melnikova N.V. Flax (*Linum usitatissimum* L.) response to non-optimal soil acidity and zinc deficiency. *BMC Plant Biol.* 2019;19(Suppl.1):54. DOI 10.1186/s12870-019-1641-1.
- Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T.R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15-21. DOI 10.1093/bioinformatics/bts635.
- Galindo-Gonzalez L., Deyholos M.K. RNA-seq transcriptome response of flax (*Linum usitatissimum* L.) to the pathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. *Front. Plant Sci.* 2016;7:1766. DOI 10.3389/fpls.2016.01766.
- Gorshkov O., Chernova T., Mokshina N., Gogoleva N., Suslov D., Tkachenko A., Gorshkova T. Intrusive growth of phloem fibers in

- flax stem: integrated analysis of miRNA and mRNA expression profiles. *Plants*. 2019;8(2). DOI 10.3390/plants8020047.
- Gorshkova T., Chernova T., Mokshina N., Gorshkov V., Kozlova L., Gorshkov O. Transcriptome analysis of intrusively growing flax fibers isolated by laser microdissection. *Sci. Rep.* 2018;8(1):14570. DOI 10.1038/s41598-018-32869-2.
- Goyal A., Sharma V., Upadhyay N., Gill S., Sihag M. Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food. *J. Food Sci. Technol.* 2014;51(9):1633-1653. DOI 10.1007/s13197-013-1247-9.
- He J., Zhao X., Laroche A., Lu Z.X., Liu H., Li Z. Genotyping-by-sequencing (GBS), an ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding. *Front. Plant Sci.* 2014;5:484. DOI 10.3389/fpls.2014.00484.
- Kage U., Kumar A., Dhokane D., Karre S., Kushalappa A.C. Functional molecular markers for crop improvement. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2015;1-14. DOI 10.3109/07388551.2015.1062743.
- Krasnov G.S., Dmitriev A.A., Zyablitsin A.V., Rozhmina T.A., Zhuchenko A.A., Kezimana P., Snezhkina A.V., Fedorova M.S., Novakovsky R.O., Pushkova E.N., Povkhova L.V., Bolsheva N.L., Kudryavtseva A.V., Melnikova N.V. Aluminum responsive genes in flax (*Linum usitatissimum* L.). *BioMed Res. Int.* 2019;2019:5023125. DOI 10.1155/2019/5023125.
- Lorenc-Kukula K., Wrobel-Kwiatkowska M., Starzycki M., Szopa J. Engineering flax with increased flavonoid content and thus *Fusarium* resistance. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2007;70(1-3):38-48. DOI 10.1016/j.pmpp.2007.05.005.
- Lorenc-Kukula K., Zuk M., Kulma A., Czemplik M., Kostyn K., Skala J., Starzycki M., Szopa J. Engineering flax with the GT family 1 *Solanum sogardandinum* glycosyltransferase SsGT1 confers increased resistance to *Fusarium* infection. *J. Agric. Food Chem.* 2009;57(15):6698-6705. DOI 10.1021/jf900833k.
- Melnikova N.V., Dmitriev A.A., Belenikin M.S., Koroban N.V., Speranskaya A.S., Krinitsina A.A., Krasnov G.S., Lakunina V.A., Snezhkina A.V., Sadritdinova A.F., Kishlyan N.V., Rozhmina T.A., Klimina K.M., Amosova A.V., Zelenin A.V., Muravenko O.V., Bolsheva N.L., Kudryavtseva A.V. Identification, expression analysis, and target prediction of flax genotroph microRNAs under normal and nutrient stress conditions. *Front. Plant Sci.* 2016;7:399. DOI 10.3389/fpls.2016.00399.
- Melnikova N.V., Dmitriev A.A., Belenikin M.S., Speranskaya A.S., Krinitsina A.A., Rachinskaia O.A., Lakunina V.A., Krasnov G.S., Snezhkina A.V., Sadritdinova A.F., Uroshlev L.A., Koroban N.V., Samatadze T.E., Amosova A.V., Zelenin A.V., Muravenko O.V., Bolsheva N.L., Kudryavtseva A.V. Excess fertilizer responsive miRNAs revealed in *Linum usitatissimum* L. *Biochimie.* 2015;109:36-41. DOI 10.1016/j.biochi.2014.11.017.
- Poland J. Breeding-assisted genomics. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2015;24:119-124. DOI 10.1016/j.pbi.2015.02.009.
- Preisner M., Kulma A., Zebrowski J., Dyminska L., Hanuza J., Arendt M., Starzycki M., Szopa J. Manipulating cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) expression in flax affects fibre composition and properties. *BMC Plant Biol.* 2014;14:50. DOI 10.1186/1471-2229-14-50.
- Preisner M., Wojtasik W., Kostyn K., Boba A., Czuj T., Szopa J., Kulma A. The cinnamyl alcohol dehydrogenase family in flax: differentiation during plant growth and under stress conditions. *J. Plant Physiol.* 2018;221:132-143. DOI 10.1016/j.jplph.2017.11.015.
- Quinlan A.R., Hall I.M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics.* 2010;26(6):841-842. DOI 10.1093/bioinformatics/btq033.
- Rashid K. Principal diseases of flax. In: Muir A.D., Westcott N.D. (Eds.). *Flax. The genus Linum*. London: CRC Press, 2003;92-123. DOI 10.1201/9780203437506.ch5.
- Rozhmina T.A., Pavlova L.N., Melnikova N.V., Golubeva L.M. The role of flax gene pool in breeding for adaptability. *Uzpekhi Sovremennoi Nauki = Successes of Modern Science*. 2017;1(10):184-189. (in Russian)
- Singh K.K., Mridula D., Rehal J., Barnwal P. Flaxseed: a potential source of food, feed and fiber. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2011;51(3):210-222. DOI 10.1080/10408390903537241.
- Varshney R.K., Nayak S.N., May G.D., Jackson S.A. Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends Biotechnol.* 2009;27(9):522-530. DOI 10.1016/j.tibtech.2009.05.006.
- Wang Z., Hobson N., Galindo L., Zhu S., Shi D., McDill J., Yang L., Hawkins S., Neutelings G., Datla R., Lambert G., Galbraith D.W., Grassa C.J., Geraldine A., Cronk Q.C., Cullis C., Dash P.K., Kumar P.A., Cloutier S., Sharpe A.G., Wong G.K., Wang J., Deyholos M.K. The genome of flax (*Linum usitatissimum*) assembled *de novo* from short shotgun sequence reads. *Plant J.* 2012;72(3):461-473. DOI 10.1111/j.1365-313X.2012.05093.x.
- Wojtasik W., Kulma A., Boba A., Szopa J. Oligonucleotide treatment causes flax beta-glucanase up-regulation via changes in gene-body methylation. *BMC Plant Biol.* 2014;14:261. DOI 10.1186/s12870-014-0261-z.
- Wojtasik W., Kulma A., Dyminska L., Hanuza J., Czemplik M., Szopa J. Evaluation of the significance of cell wall polymers in flax infected with a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. *BMC Plant Biol.* 2016;16:75. DOI 10.1186/s12870-016-0762-z.
- Wojtasik W., Kulma A., Namysl K., Preisner M., Szopa J. Polyamine metabolism in flax in response to treatment with pathogenic and non-pathogenic *Fusarium* strains. *Front. Plant Sci.* 2015;6:291. DOI 10.3389/fpls.2015.00291.
- Wrobel-Kwiatkowska M., Lorenc-Kukula K., Starzycki M., Oszmianski J., Kepczynska E., Szopa J. Expression of beta-1,3-glucanase in flax causes increased resistance to fungi. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2004;65(5):245-256. DOI 10.1016/j.pmpp.2005.02.008.
- Wrobel-Kwiatkowska M., Starzycki M., Zebrowski J., Oszmianski J., Szopa J. Lignin deficiency in transgenic flax resulted in plants with improved mechanical properties. *J. Biotechnol.* 2007;128(4):919-934. DOI 10.1016/j.jbiotec.2006.12.030.
- Wu J., Zhao Q., Wu G., Yuan H., Ma Y., Lin H., Pan L., Li S., Sun D. Comprehensive analysis of differentially expressed unigenes under NaCl stress in flax (*Linum usitatissimum* L.) using RNA-Seq. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(2). DOI 10.3390/ijms20020369.
- You F.M., Xiao J., Li P., Yao Z., Jia G., He L., Zhu T., Luo M.C., Wang X., Deyholos M.K., Cloutier S. Chromosome-scale pseudomolecules refined by optical, physical and genetic maps in flax. *Plant J.* 2018;95(2):371-384. DOI 10.1111/tbj.13944.
- Yu Y., Huang W., Chen H., Wu G., Yuan H., Song X., Kang Q., Zhao D., Jiang W., Liu Y., Wu J., Cheng L., Yao Y., Guan F. Identification of differentially expressed genes in flax (*Linum usitatissimum* L.) under saline-alkaline stress by digital gene expression. *Gene.* 2014;549(1):113-122. DOI 10.1016/j.gene.2014.07.053.
- Yu Y., Wu G., Yuan H., Cheng L., Zhao D., Huang W., Zhang S., Zhang L., Chen H., Zhang J., Guan F. Identification and characterization of miRNAs and targets in flax (*Linum usitatissimum*) under saline, alkaline, and saline-alkaline stresses. *BMC Plant Biol.* 2016;16(1):124. DOI 10.1186/s12870-016-0808-2.
- Zeitoun A.M., Preisner M., Kulma A., Dyminska L., Hanuza J., Starzycki M., Szopa J. Does biopolymers composition in seeds contribute to the flax resistance against the *Fusarium* infection? *Biotechnol. Prog.* 2014;30(5):992-1004. DOI 10.1002/btpr.1965.
- Zyablitsin A.V., Dmitriev A.A., Krasnov G.S., Bolsheva N.L., Rozhmina T.A., Muravenko O.V., Fedorova M.S., Snezhkina A.V., Kudryavtseva A.V., Melnikova N.V. *CAX3* gene is involved in flax response to high soil acidity and aluminum exposure. *Mol. Biol.* 2018;52(4):514-519. DOI 10.1134/S0026893318040192.

Acknowledgements. This work was financially supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 16-16-00114).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received June 02, 2019. Revised August 16, 2019. Accepted August 19, 2019.


Пятая международная научная конференция PlantGen2019

Сравнительная оценка variability ядерного и хлоропластного генома лука-поррея (*Allium porrum* L.)

Е.А. Дьяченко¹, Т.М. Середин², М.А. Филюшин^{1, 2} 

¹ Федеральное исследовательское учреждение «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Институт биоинженерии, Москва, Россия

² Федеральное научное учреждение «ВНИИССОК», Одинцовский район, Московская область, Россия

 e-mail: michel7753@mail.ru

К роду *Allium* L. (сем. Amaryllidaceae), самому многочисленному среди однодольных растений, относятся такие экономически значимые овощные культуры, как лук репчатый (*A. cepa*), чеснок (*A. sativum*) и лук-порей (*A. porrum*). Лук-порей обладает высокими вкусовыми качествами и доказанными ценными диетическими свойствами и является одной из самых популярных овощных культур в Западной Европе. Несмотря на высокую значимость лука-порей как овощной культуры, этот вид редко бывает объектом молекулярно-генетических исследований. Генетическое разнообразие лука-порей практически не изучали ранее. Поэтому в настоящей работе на широкой выборке образцов изучена variability ядерного (метод AFLP) и хлоропластного (анализ нуклеотидных последовательностей) геномов. Для проведения работы было отобрано 65 образцов лука-порей из коллекции Федерального научного центра овощеводства, которая включала сорта отечественной и зарубежной селекции. В результате проведения AFLP-анализа и обработки полученных ДНК-спектров идентифицировано 760 фрагментов, из которых 716 были полиморфны для анализируемых образцов лука-порей. Рассчитанные генетические расстояния между образцами лука-порей варьировали от 0.4 до 0.76, что сопоставимо с внутривидовым полиморфизмом родственных видов *Allium* (лук репчатый, чеснок). Анализ геномной структуры в программе STRUCTURE 2.3.4 разделил исследуемые образцы лука-порей на семь групп, что в целом совпадает с кластеризацией этих образцов по результатам кластерного анализа. Для оценки variability хлоропластного генома у анализируемых образцов лука-порей были секвенированы девять участков хлоропластного генома, как некодирующие: межгенные спейсеры *rpl32-trnL*, *ndhJ-trnL* и интрон гена *rps16*, так и белок-кодирующие: гены *psaA*, *psaB*, *psbA*, *psbB*, *psbE*, *petB*. Проведенный анализ участков хлоропластного генома лука-порей выявил крайне низкий уровень их полиморфизма, было обнаружено всего шесть SNP в изученных последовательностях суммарной длиной около 10500 п. н. Таким образом, в результате работы был установлен высокий уровень полиморфизма ядерного генома лука-порей, при этом полиморфизм хлоропластного генома оказался крайне низким.

Ключевые слова: лук-порей; *Allium porrum*; AFLP; генетическое разнообразие; анализ генома; хлоропластный геном.


Для цитирования: Дьяченко Е.А., Середин Т.М., Филюшин М.А. Сравнительная оценка variability ядерного и хлоропластного генома лука-порей (*Allium porrum* L.). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019; 23(7):902-909. DOI 10.18699/VJ19.565

Nuclear and chloroplast genome variability in leek (*Allium porrum* L.)

Е.А. Dyachenko¹, Т.М. Seredin², М.А. Filyushin^{1, 2} 

¹ Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology", RAS, Institute of Bioengineering, Moscow, Russia

² Federal Scientific Center, VNISSOK, Odintsovo region, Moscow district, Russia

 e-mail: michel7753@mail.ru

The genus *Allium* L. (Amaryllidaceae), the most numerous among monocotyledonous plants, includes such economically important vegetable crops as onion (*A. cepa*), garlic (*A. sativum*) and leek (*A. porrum*). Leek has a high taste and proven valuable dietary properties and is one of the most popular vegetable crops in Western Europe. Despite a high importance of leek as a vegetable, this species is rarely the subject of molecular genetic studies. The genetic diversity of leeks has never been studied before. Therefore, in this work, we studied the nuclear variability (AFLP) and the chloroplast (nucleotide sequence analysis) genomes using a broad sample. For this work, 65 leek accessions were selected from the collection of the Scientific Center of Vegetable Crops, which included varieties of domestic and foreign breeding. As a result of an AFLP analysis and processing of the DNA spectra obtained, 760 fragments were identified, of which 716 were polymorphic for the leek accessions being analyzed. The calculated genetic distances between the leek samples varied from 0.4 to 0.76, which is comparable to the intraspecific polymorphism of related *Allium* species (onions, garlic). Analysis of the genomic structure with STRUCTURE 2.3.4 divided the leek samples into seven groups, which generally coincides with the clustering of these samples. To

assess the variability of the chloroplast genome, nine sites of the chloroplast genome were sequenced in the leek samples, both non-coding (intergenic spacers *rpl32-trnL*, *ndhJ-trnL*, and intron *rps16* gene), and protein coding genes (*psaA*, *psaB*, *psbA*, *psbB*, *psbE*, *petB*). The analysis of the sites of the leek chloroplast genome revealed an extremely low level of their polymorphism, only six SNPs were detected in the studied sequences with a total length of about 10,500 bp. Thus, as a result of this work, a high level of polymorphism of the leek nuclear genome was revealed, while the polymorphism of the chloroplast genome was extremely low.

Key words: leek; *Allium porrum*; AFLP; genetic diversity; genome analysis; chloroplast genome.

For citation: Dyachenko E.A., Seredin T.M., Filyushin M.A. Nuclear and chloroplast genome variability in leek (*Allium porrum* L.). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(7):902-909. DOI 10.18699/VJ19.565 (in Russian)

Введение

Род *Allium* L. (сем. Amaryllidaceae) – самый многочисленный среди однодольных растений, объединяет около 1200 видов, каждый год описываются новые виды луков (Govaerts et al., 2018; Brullo et al., 2019). Представители рода распространены в Северном полушарии, многие виды являются эндемиками. К роду *Allium* относятся такие важные сельскохозяйственные культуры, как лук репчатый (*A. cepa*), чеснок (*A. sativum*), лук-порей (*A. porrum*), возделываемые в настоящее время во всем мире.

Лук-порей – ценная овощная культура с двухлетним циклом выращивания. В пищу пригодно практически все растение – утолщенный ложный стебель и широкие зеленые линейно-ланцетные листья. Обе части содержат важные для диеты человека вторичные метаболиты: сераорганические, полифенольные соединения, витамин С (Bernaert et al., 2014; Агафонов, Дубов, 2018). Высокие вкусовые качества и доказанные ценные диетические свойства сделали лук-порей популярным в Европе, Северной Америке и Азии. Ежегодное производство этой культуры составляет более 2 млн т в год (по данным FAO, 2017 г.), крупнейшим производителем и потребителем лука-порея является Западная Европа (Soininen et al., 2014; Агафонов, Дубов, 2018).

Культуру лук-порея, столь популярную в Западной Европе, в России начали выращивать сравнительно недавно. Первый из отечественных сортов – Карantanский – внесен в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию (Госсортреестр) в 1961 г., и только с 1993 г. этот список начал расширяться, включая к настоящему времени 27 сортов, преимущественно западноевропейской селекции. В Российской Федерации активная селекция лука-порея ведется в Федеральном научном центре овощеводства (ФНЦО), на сегодняшний день четыре сорта лука-порея включены в Госсортреестр.

Лук-порей – популярный объект для биохимических исследований (Bernaert et al., 2013, 2014; Soininen et al., 2014), однако генные и геномные исследования этой культуры ранее практически не проводили. Так, был определен транскриптом листа лука-порея, который использовали для сравнительного анализа экспрессии генов у видов *Allium* с различной морфологией листа (Zhu et al., 2017). Методами AFLP и ISSR изучены геномный полиморфизм 16 образцов лука-порея и внутрисортная вариабельность (Филюшин и др., 2011; Филюшин, Агафонов, 2015).

Комплексная оценка биоразнообразия, включающая, помимо классического морфофизиологического описания образцов, геномный анализ, становится в настоящее время обязательной для характеристики сельскохозяйствен-

ных видов растений. Поэтому целью нашей работы стали оценка и сравнительный анализ вариабельности ядерного и хлоропластного геномов у широкой выборки образцов лука-порея.

Материалы и методы

Для изучения были взяты 65 образцов лука-порея из коллекции Федерального научного центра овощеводства (пос. ВНИИССОК, Московская область) (табл. 1). В качестве внешней группы использованы родственные виды из коллекции Ботанического сада Университета Оснабрюк (Германия), предоставленные профессором Н. Фризеном: *A. ampeloprasum* (кат. № 1023 и 1744, Грузия), *A. commutatum* (кат. № 1662, Франция) и *A. pyrenaicum* (кат. № 3018, Испания). ДНК выделяли из пятнадцатидневных проростков СТАВ-методом с двойной депротенизацией хлороформом, для выделения использовали по 10 проростков каждого сорта для охвата возможного внутрисортного полиморфизма.

Полиморфизм ядерного генома определяли методом AFLP, согласно стандартному протоколу (Vos et al., 1995). В связи с тем, что лук-порей имеет большой размер генома, для AFLP-анализа применяли праймерные комбинации с девятью селективными нуклеотидами: E-ACT/M-CAAGCG и E-AGG/M-CAAGCG. Из 12 протестированных комбинаций только эти пары позволили выявить внутривидовой полиморфизм и получить оптимальное количество фрагментов на геле. ДНК гидролизовали с помощью рестриктаз *EcoRI* и *MseI* (Thermo Fisher Scientific, США). Продукты амплификации разделяли в 6.5 % денатурирующем полиакриламидном геле с помощью системы фрагментного анализа LI-COR 4300 DNA Analyzer (LI-COR Biosciences, США).

Определение генетических расстояний (1 – коэф. Жаккара) и построение дендрограммы (метод UPGMA) проводили в программе PAST3 (<https://folk.uio.no/ohammer/past/>). Геномную структуру выявляли с помощью программы STRUCTURE 2.3.4 (<https://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure.html>) со следующими параметрами: ADMIXTURE model с allele frequencies correlated, burn-in 500.000 и длиной прогона 500.000 MCMC, числом кластеров (set K) от 2 до 19. Наиболее вероятное число кластеров определяли по методике (Evanno et al., 2005).

Для анализа полиморфизма участков хлоропластного генома были амплифицированы и секвенированы межгенные спейсеры *rpl32-trnL* и *ndhJ-trnL*, интрон гена *rps16* (последовательности праймеров взяты из работы (Shaw et al., 2007) и белок-кодирующие гены *psaA* (5'-CTTGACTGTTGGCGGGTCT-3'; 5'-GTAC

Таблица 1. Образцы лука-порея из коллекции ФНЦО, использованные в работе

№ п/п	Сорт*	Страна происхождения*	Номер по каталогу ФНЦО*	Номер по каталогу ВИР*
1	Agria	Нидерланды	K-16	2398
2	Amarillo	Франция	K-13	2307
3	American flag	Дания	K-3	2191
4	Arcona	Нидерланды	K-24	5162
5	Bentons Monorel	–	K-59	2084
6	Blauwgroene Winter	Германия	K-17	2403
7	Carentan	Германия	K-60	2092
8	Colonna	Нидерланды	K-54	2243
9	Empire	Дания	K-14	2350
10	Florena	Нидерланды	K-25	5989
11	Geant d'Hiver Tezier	Франция	K-64	2203
12	Giant anelioro	Нидерланды	K-7	2238
13	Giant Musselburgh	Индия	K-69	2140
14	Italion gent	Дания	K-15	2353
15	Lincoln	Югославия	K-21	2544
16	Long d'hiver	Франция	K-5	2212
17	Lyon	Великобритания	K-2	2159
18	Lyon	Великобритания	K-55	2252
19	Merlin	Нидерланды	K-45	2545
20	Monstruoso	Аргентина	K-1	2114
21	Monstrouso	Великобритания	K-10	2248
22	Monstruena de Carentan	Франция	K-65	2204
23	Monstrueux	Франция	K-67	2198
24	Monstrueux d'Elbeuf	Франция	–	2236
25	Musselburgh	Нидерланды	K-11	2253
26	Olifant-Exelsior	Нидерланды	K-4	2196
27	Poireau	Франция	K-6	2231
28	Porree dicker	Германия	K-41	2017
29	Praza 2	Италия	K-9	2245
30	Siegfried	Дания	K-70	2187
31	Suttons Prizetaker	Индия	K-68	2120
32	The Legon	Нидерланды	K-50	5998
33	Timperley Light	Великобритания	–	2239
34	Tres long Hiver	Ботсвана	K-19	2518
35	Tynis	Тунис	K-57	2276
36	Wastlandia Winterreusen	Нидерланды	K-62	2197
37	Winter lauch Rijen fon Carentan	Германия	K-71	2005
38	Zocal Type	–	K-53	2580
39	Zocalen	Иран	K-22	2574
40	Аллигатор	–	–	–
41	Веста	–	–	–
42	Голиаф	–	K-28	–
43	Гулливёр	–	K-119	–
44	Добрый молодец	–	K-39	–
45	Жираф	–	K-29	–
46	Зимний гигант	–	K-118	–
47	Казачок (кявар)	Россия	K-113	–
48	Казимир	Германия	K-31	–

Окончание табл. 1

№ п/п	Сорт*	Страна происхождения*	Номер по каталогу ФНЦО*	Номер по каталогу ВИР*
49	Карантанский	Россия	К-40	2001
50	Килима	–	К-111	–
51	Коламбус	Нидерланды	–	–
52	Кявар	Азербайджан	К-61	2094
53	Летний бриз	–	К-33	–
54	Осенний гигант	–	–	–
55	Прас	Россия	К-42	2038
56	Премьер	Россия	–	–
57	Слон	–	К-36	–
58	Хобот слона	–	К-37	–
59	Элефант	Чехия	–	–
60	–	Сирия	К-43	2054
61	–	Великобритания	К-44	2026
62	–	Великобритания	К-63	2200
63	–	Канада	К-23	4895
64	–	–	К-51	5954
65	–	–	К-52	2563

* При наличии.

CATAGTCAGTAGCTAGA-3'), *psaB* (5'-TTCTGGG TGGAATTGCCAC-3'; 5'-ATAGCTCCATGAGCAAAG GC-3'), *psbA* (5'-AGTACGTGTGCTTGGGAGT-3'; 5'-TATAGCCCCTTCGTTTCGAC-3'), *psbB* (5'-GTC TATTGCAATGCGATAAAG-3'; 5'-ACCATAGAA CTCAACAGTTAC-3'), *psbE* (5'-TCCCATCTTTCAC CGAATC-3'; 5'-AGTCCGTGAATAGCTAACC-3'), *petB* (5'-TGTGTTTCTGTTTGAGCCGT-3'; 5'-TATT GTTCCCTTCCCGATAGG-3'). Праймеры для белок-кодирующих генов были разработаны на основе секвенированных пластомов видов *Allium* (Filyushin et al., 2016, 2018). Нуклеотидные последовательности выравнивали и анализировали в программе MEGA7.0 (<https://www.megasoftware.net/>).

Результаты и обсуждение

AFLP-анализ ядерного генома лука-порей. С использованием отобранных комбинаций праймеров E-ACT/M-CAAGCG и E-AGG/M-CAAGCG проведен AFLP-анализ ядерного генома 65 образцов лука-порей, включающих сорта отечественной и зарубежной селекции. В результате анализа и обработки полученных ДНК-спектров идентифицировано 760 фрагментов, 716 из которых были полиморфны для анализируемых образцов. Рассчитанные генетические расстояния между образцами лука-порей варьировали от 0.4 до 0.76, а между образцами лука-порей и видами, взятыми в качестве внешней группы, – от 0.65 до 0.82.

На дендрограмме (рис. 1) все образцы *A. porrum* формировали единый субкластер, а виды, взятые в качестве внешней группы, – сестринский субкластер. Выбор видов *A. ampeloprasum*, *A. commutatum* и *A. pyrenaicum* в качестве внешней группы обусловлен тем, что ряд исследователей объединяет их вместе с *A. porrum* и еще несколькими родственными видами в *Allium ampeloprasum* complex (Jones,

Mann, 1963; Hirschegger et al., 2010; Guenaoui et al., 2013). Согласно системе APG IV, *A. porrum* – самостоятельный вид, в то время как ряд исследователей считает лук-порей подвигом *A. ampeloprasum* (Hirschegger et al., 2010; Guenaoui et al., 2013). Однако на дендрограмме образцы *A. ampeloprasum* не образуют единой группы с образцами *A. porrum*, а кластеризуются с образцами *A. commutatum* и *A. pyrenaicum* (см. рис. 1).

Анализ геномной структуры изучаемых образцов лука-порей в программе STRUCTURE 2.3.4 в сочетании с методикой (Evanno et al., 2005) показал их вероятное разделение на семь групп. Полученная диаграмма была наложена на AFLP-дендрограмму (см. рис. 1). Как видно на диаграмме, наборы ДНК-фрагментов образцов лука-порей отличаются друг от друга менее чем 10 % (примеси других цветов на красном фоне), при этом образцы *A. porrum*, формирующие на дендрограмме отдельные группы, имеют схожую геномную структуру (см. рис. 1).

Выявленный высокий уровень полиморфизма ядерного генома *A. porrum* логично было бы объяснить типом размножения (перекрестное опыление). Аналогично высокий уровень внутривидовой variability был показан для перекрестно-опыляемого лука репчатого *A. cepa* (Karić et al., 2018). При этом интересно отметить, что геном чеснока *A. sativum*, который размножается только вегетативно, также является крайне variability (Volk et al., 2004; Zhao et al., 2011; Egea et al., 2017). По всей видимости, высокий уровень полиморфизма ядерного генома характерен для видов *Allium* и может быть связан с насыщенностью мобильными элементами и повторяющимися последовательностями, о чем свидетельствуют проведенные ранее цитологические и геномные исследования некоторых видов *Allium* (Suzuki et al., 2001; Jakse et al., 2008; Vitte et al., 2013; Peška et al., 2019). Помимо этого, для некоторых сельскохозяйственных культур было по-

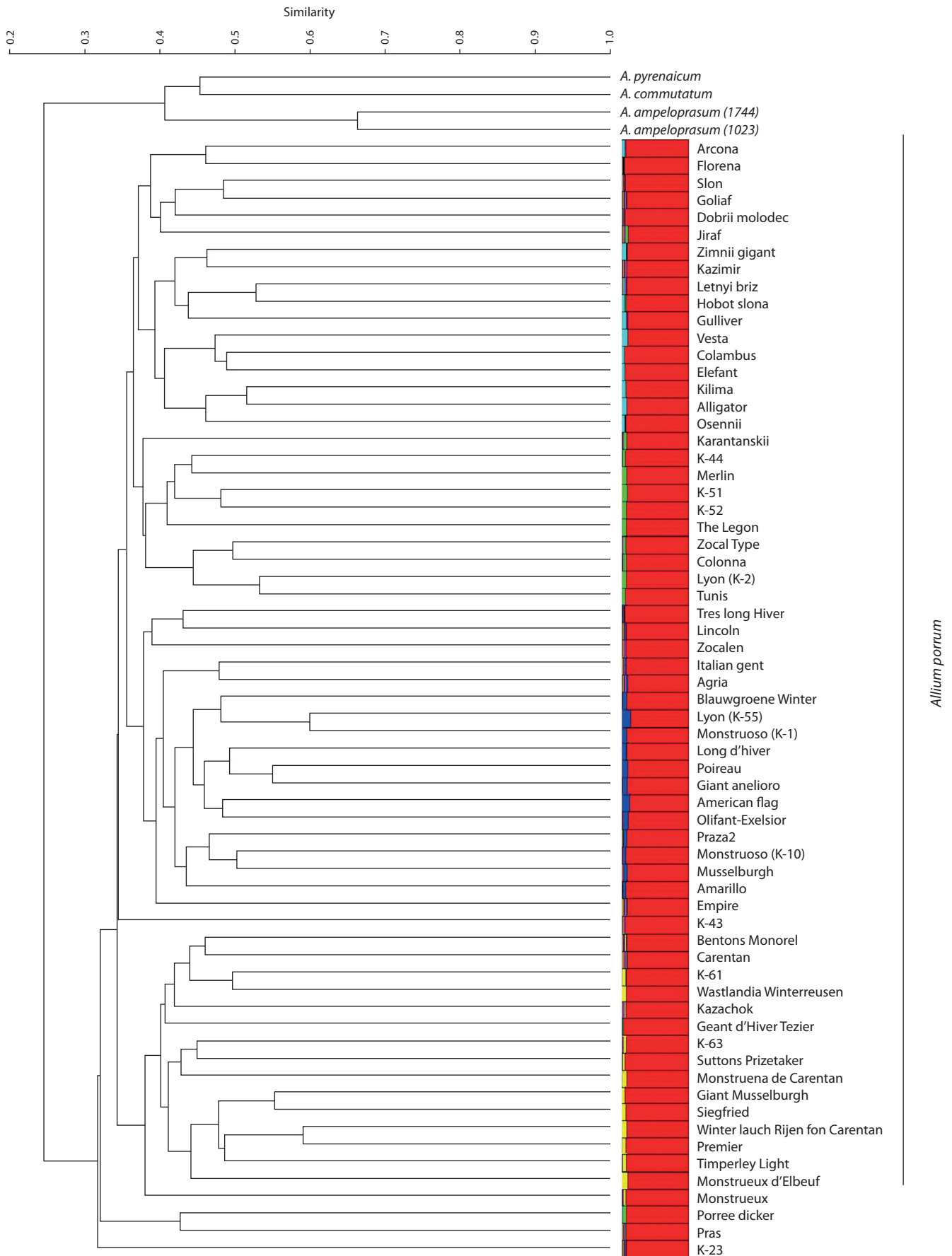


Рис. 1. Дендрограмма, построенная на основе данных AFLP-анализа 65 образцов *Allium porrum* и четырех родственных видов *Allium*, совмещенная с диаграммой, отражающей геномную структуру анализируемых образцов лука-поррея.

Таблица 2. Характеристика анализируемых участков хлоропластного генома у образцов *A. porrum*

Показатель	<i>rpl32-trnL</i>	<i>ndhJ-trnL</i>	<i>rps16</i> (интрон)	<i>psaA</i>	<i>psaB</i>	<i>psbA</i>	<i>psbB</i>	<i>psbE</i>
Размер фрагмента, п. н.	793	837	844, 891, 913	2253	2205	1062	1527	252
Кол-во SNP	2	3	0	0	1	0	0	0
Кол-во инделей	0	0	2	0	0	0	0	0

казано, что уровень генетического разнообразия может быть связан с domestikацией и селекцией (Sun et al., 2018; Fu et al., 2019).

Анализ вариабельности участков хлоропластного генома. У изучаемых образцов лука-порея были амплифицированы и секвенированы девять участков хлоропластного генома, как некодирующие: межгенные спейсеры *rpl32-trnL* и *ndhJ-trnL*, интрон гена *rps16*, так и белок-кодирующие: гены *psaA*, *psaB*, *psbA*, *psbB*, *psbE*, *petB* (табл. 2).

Размеры межгенных спейсеров *rpl32-trnL* и *ndhJ-trnL* у всех исследуемых образцов лука-порея оказались инвариантны, в нуклеотидных последовательностях было выявлено два и три вариабельных сайта соответственно (см. табл. 2). Размеры этих участков у видов луков, взятых в качестве внешней группы, варьировали за счет наличия коротких инделей. Так, длина последовательности *rpl32-trnL* у образцов *A. ampeloprasum* составила 839 п. н., *A. commutatum* – 822 п. н., *A. pyrenaicum* – 785 п. н. Интересно, что в последовательностях *rpl32-trnL* и *ndhJ-trnL* у *A. ampeloprasum* обнаружены короткие индели и нуклеотидные замены, не встречающиеся у образцов *A. porrum*, но присутствующие у *A. commutatum*.

Длина последовательности интрона гена *rps16* у образцов лука-порея была различна. У большинства образцов интрон имел размер 913 п. н. У трех образцов *A. porrum* – Monstruoso (K-1), Wastlandia Winterreusen и Премьер – длина последовательности составила 891 п. н. Разница в длинах обусловлена тандемно повторяющимся 22-нуклеотидным фрагментом. У образцов видов *A. ampeloprasum*, *A. commutatum* и *A. pyrenaicum* этот повтор представлен одной копией. У единственного образца лука-порея – сорта Merlin – выявлена специфичная 69-нуклеотидная делеция, за счет чего длина интрона составила 844 п. н.

Последовательности шести генов фотосинтетического аппарата, кодирующих субъединицы фотосистем 1 и 2 (*psaA*, *psaB*, *psbA*, *psbB*, *psbE*), а также субъединицу цитохрома b (*petB*), были инвариантны по размеру у анализируемых образцов лука-порея и мономорфны (см. табл. 2). Единственная замена T327A в гене *psaB* была обнаружена у сортов Monstruoso (K-1), Wastlandia Winterreusen (K-62) и Казачок, однако она не приводила к замещению аминокислотного остатка. У образцов видов, взятых в качестве внешней группы, размеры изучаемых шести генов также были инвариантны.

Полученные для каждого образца последовательности были объединены и использованы для построения дендрограммы (рис. 2). На дендрограмме анализируемые образцы лука-порея образуют единый субкластер, базальную ветвь к которому формирует образец *A. pyrenaicum*. Образцы *A. ampeloprasum* и *A. commutatum* образуют

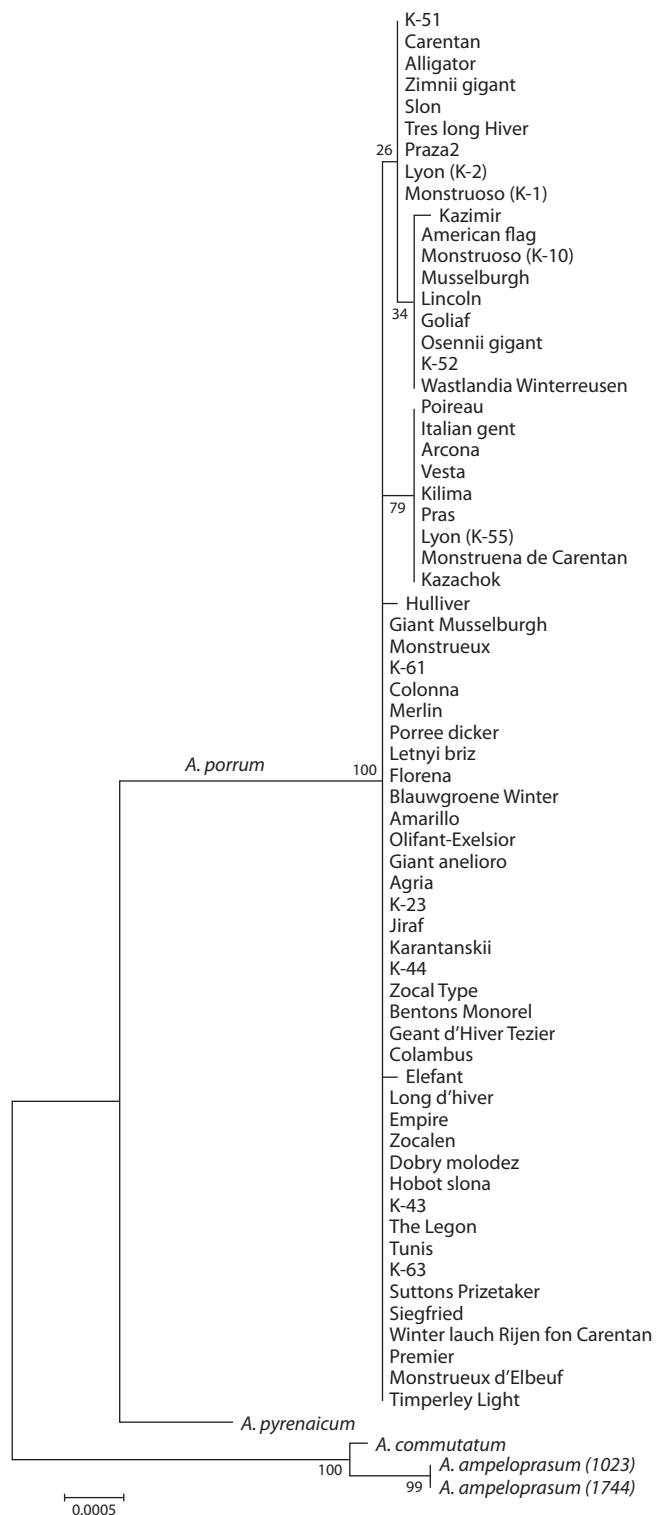


Рис. 2. Дендрограмма, построенная на основе нуклеотидных последовательностей девяти участков хлоропластного генома (MEGA7.0, метод Maximum Likelihood, модель HKY).

обособленный субкластер, в изученных последовательностях хлоропластного генома этих видов был обнаружен ряд общих инделей и SNP, отсутствующих у *A. porrum* и *A. pyrenaicum*, последовательности которых были высокомонологичны (99.62 %).

Анализ кодирующих и некодирующих участков хлоропластного генома суммарной длиной около 10500 п. н. для каждого из 65 образцов лука-порей показал крайне низкий уровень их полиморфизма – всего 6 SNP.

Данные о внутривидовом полиморфизме участков пластома известны лишь для нескольких видов *Allium*. Так, анализ трех межгенных спейсеров у 24 образцов дикорастущих популяций *A. roseum* также выявил низкую вариабельность хпДНК (Guétat et al., 2010). Отсутствие внутривидовой вариабельности пластома обнаружено при исследовании небольших выборок (до 10 образцов) видов секции Rhizirideum (Sinitsyna et al., 2016). Низкий уровень вариабельности участков хлоропластного генома, по-видимому, – характерный признак для представителей *Allium*, что, как предполагается, может быть следствием гибридизации или интрогрессии хлоропластного генома (Hanelt, 1996; Li et al., 2010, 2016).

Заключение

В настоящей работе впервые на широкой выборке образцов изучен внутривидовой полиморфизм генома *A. porrum*. В результате выявлен высокий уровень полиморфизма ядерного генома лука-порей, сопоставимый с таковым у других сельскохозяйственно значимых видов *Allium*. Несмотря на то, что лук-порей – популярная овощная культура, молекулярно-генетические исследования как всего генома в целом, так и отдельных локусов/генов ранее практически не проводились. Наши результаты по вариабельности ядерного генома *A. porrum* будут использованы для научно обоснованного подбора родительских пар для скрещивания с целью получения возможного гетерозисного эффекта в F_1 при селекции лука-порей в Федеральном научном центре овощеводства.

Список литературы / References

Агафонов А.Ф., Дубов М.В. Селекция лука порей для средней полосы России при выращивании безрассадным способом. Овощи России. 2018;3(41):47-51.
[Agafonov A.F., Dubova M.V. Selection of leek for the midland of Russia at cultivation no seedling method. Ovoshchi Rossii = Vegetable Crops of Russia. 2018;3:47-51. DOI 10.18619/2072-9146-2018-3-47-51. (in Russian)]

Филюшин М.А., Агафонов А.Ф. Анализ внутрисортного полиморфизма сортообразцов лука порей методами RAPD и ISSR анализов. Вестн. Российской академии сельскохозяйственных наук. 2015;5:53-56.
[Filyushin M.A., Agafonov A.F. Analyzing the intravarietal polymorphism in variety samples of leek by methods of RAPD and ISSR analysis. Vestnik Rossiyskoy Akademii Selskokhozyaystvennyh Nauk = Vestnik of the Russian Agricultural Science. 2015;5:53-56. (in Russian)]

Филюшин М.А., Холда О.А., Кочиева Е.З., Рыжова Н.Н. AFLP маркирование генотипов сортов лука-порей (*Allium porrum*). Генетика. 2011;47(4):560-565.
[Filyushin M.A., Kholda O.A., Kochieva E.Z., Ryzhova N.N. AFLP marking of the genotypes of leek (*Allium porrum*) varieties. Rus. J. Genet. 2011;47:492-496. DOI 10.1134/S1022795411030045.]

Bernaert N., De Loose M., Van Bockstaele E., Van Droogenbroeck B. Antioxidant changes during domestic food processing of the white shaft and green leaves of leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*). J. Sci. Food Agric. 2014;94(6):1168-1174. DOI 10.1002/jsfa.6389.

Bernaert N., Wouters D., De Vuyst L., De Paep D., De Clercq H., Van Bockstaele E., De Loose M., Van Droogenbroeck B. Antioxidant changes of leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*) during spontaneous fermentation of the white shaft and green leaves. J. Sci. Food Agric. 2013;93(9):2146-2153. DOI 10.1002/jsfa.6020.

Brullo S., Brullo C., Cambria S., del Galdo G.G., Salmeri C. *Allium albanicum* (Amaryllidaceae), a new species from Balkans and its relationships with *A. meteoricum* Heldr. & Hausskn. ex Halácsy. PhytoKeys. 2019;119:117-136. DOI 10.3897/phytokeys.119.30790.

Egea L.A., Mérida-García R., Kilian A., Hernandez P., Dorado G. Assessment of genetic diversity and structure of large garlic (*Allium sativum*) germplasm bank, by diversity arrays technology “genotyping-by-sequencing” platform (DArTseq). Front. Genet. 2017; 8:98.

Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol. Ecol. 2005;14(8):2611-2620.

Filyushin M.A., Beletsky A.V., Mazur A.M., Kochieva E.Z. The complete plastid genome sequence of garlic *Allium sativum* L. Mitochondrial DNA. Part B. 2016;1(1):831-832. DOI 10.1080/23802359.2016.1247669.

Filyushin M.A., Beletsky A.V., Mazur A.M., Kochieva E.Z. Characterization of the complete plastid genome of lop-sided onion *Allium obliquum* L. (Amaryllidaceae). Mitochondrial DNA. Part B. 2018;3(1):393-394. DOI 10.1080/23802359.2018.1456369.

Fu Y.H., Yang C., Meng Q., Liu F., Shen G., Zhou M., Ao M. Genetic diversity and structure of *Coix lacryma-jobi* L. from its world secondary diversity center, Southwest China. Int. J. Genomics. 2019; 2019:9815697. DOI 10.1155/2019/9815697.

Govaerts R., Kington S., Friesen N., Fritsch R., Snijman D.A., Marcucci R., Silverstone-Sopkin P.A., Brullo S. World checklist of Amaryllidaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. 2018. <http://wvsp.science.kew.org> [Retrieved 1 October 2018].

Guenauoui C., Mang S., Figliuolo G., Neffati M. Diversity in *Allium ampeloprasum*: from small and wild to large and cultivated. Genet. Resour. Crop Evol. 2013;60:97-114. DOI 10.1007/s10722-012-9819-5.

Guétat A., Vilatersana R., Neffati M., Boussaid M. Genetic diversity in Tunisian rosy garlic populations (*Allium roseum* L.) as evidenced by chloroplastic DNA analysis: sequence variation of non-coding region and intergenic spacers. Biochem. Syst. Ecol. 2010;38:502-509.

Hanelt P. Taxonomic problems in Mediterranean *Allium*, and relationships with non-Mediterranean *Allium* groups. Bocconea. 1996;5: 259-265.

Hirscheegger P., Jakse J., Trontelj P., Bohanec B. Origins of *Allium ampeloprasum* horticultural groups and a molecular phylogeny of the section *Allium* (*Allium*: Alliaceae). Mol. Phylogenet. Evol. 2010; 54(2):488-497. DOI 10.1016/j.ympev.2009.08.030.

Jakse J., Meyer J.D., Suzuki G. Pilot sequencing of onion genomic DNA reveals fragments of transposable elements, low gene densities, and significant gene enrichment after methyl filtration. Mol. Genet. Genomics. 2008;280:287-292.

Jones H.A., Mann L.K. Onions and their Allies – Botany, Cultivation, and Utilization. London: Leonard Hill Books Limited, 1963.

Karić L., Golzardi M., Glamočlija P., Šutković J. Genetic diversity assessment of *Allium cepa* L. cultivars from Bosnia and Herzegovina using SSR makers. Genet. Mol. Res. 2018;17(1):gmr16039870. DOI 10.4238/gmr16039870.

Li Q.Q., Zhou S.D., He X.J., Yu Y., Zhang Y.C., Wei X.Q. Phylogeny and biogeography of *Allium* (Amaryllidaceae: Alliaceae) based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast *rps16* sequences, focusing on the inclusion of species endemic to China. Ann. Bot. 2010;106(5):709-733. DOI 10.1093/aob/mcq177.

Li Q.Q., Zhou S.D., Huang D.Q., He X.J., Wei X.Q. Molecular phylogeny, divergence time estimates and historical biogeography within

- one of the world's largest monocot genera. *AoB Plants*. 2016;8: plw041. DOI 10.1093/aobpla/plw041.
- Peška V., Mandáková T., Ihradská V., Fajkus J. Comparative dissection of three giant genomes: *Allium cepa*, *Allium sativum*, and *Allium ursinum*. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(3):733. DOI 10.3390/ijms20030733.
- Shaw J., Lickey E.B., Schilling E.E., Small R.L. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *Am. J. Bot.* 2007;94(3):275-288.
- Sinitsyna T.A., Herden T., Friesen N. Dated phylogeny and biogeography of the Eurasian *Allium* section Rhizirideum (Amaryllidaceae). *Plant Syst. Evol.* 2016;302:1311-1328.
- Soininen T.H., Jukarainen N., Soininen P. Metabolite profiling of leek (*Allium porrum* L.) cultivars by (1) H NMR and HPLC-MS. *Phytochem. Anal.* 2014;25(3):220-228. DOI 10.1002/pca.2495.
- Sun S., Zhou Y., Chen J., Shi J., Zhao H., Zhao H., Song W., Zhang M., Cui Y., Dong X., Liu H., Ma X., Jiao Y., Wang B., Wei X., Stein J.C., Glaubitz J.C., Lu F., Yu G., Liang C., Fengler K., Li B., Rafalski A., Schnable P.S., Ware D.H., Buckler E.S., Lai J. Extensive intraspecific gene order and gene structural variations between Mo17 and other maize genomes. *Nat. Genet.* 2018;50(9):1289-1295. DOI 10.1038/s41588-018-0182-0.
- Suzuki G., Ura A., Saito N., Do G.S., Seo B.B., Yamamoto M., Mukai Y. BAC FISH analysis in *Allium cepa*. *Genes Genet. Syst.* 2001; 76:251-255.
- Vitte C., Estep M.C., Leebens-Mack J., Bennetzen J.L. Young, intact and nested retrotransposons are abundant in the onion and asparagus genomes. *Ann. Bot.* 2013;112:881-889.
- Volk G.M., Henk A.D., Richards C.M. Genetic diversity among U.S. garlic clones as detected using AFLP methods. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 2004;129(4):559-569.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijmans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1995;23: 4407-4414.
- Zhao W.G., Chung J.W., Lee G.A., Ma K.H., Kim H.H., Kim K.T., Chung I.M., Lee J.K., Kim N.S., Kim S.M., Park Y.J. Molecular genetic diversity and population structure of a selected core set in garlic and its relatives using novel SSR markers. *Plant Breed.* 2011; 130:46-54.
- Zhu S., Tang S., Tan Z., Yu Y., Dai Q., Liu T. Comparative transcriptomics provide insight into the morphogenesis and evolution of fistular leaves in *Allium*. *BMC Genomics.* 2017;18:60. DOI 10.1186/s12864-016-3474-8.

ORCID ID

E.A. Dyachenko orcid.org/0000-0002-0570-9751
M.A. Filyushin orcid.org/0000-0003-3668-7601

Благодарности. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ, № 19-016-00054 (проведение AFLP-анализа) и гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук, № МК-3350.2019.11 (секвенирование участков хлоропластного генома).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.


Поступила в редакцию 23.05.2019. После доработки 01.07.2019. Принята к публикации 15.07.2019.

Пятая международная научная конференция PlantGen2019

Изучение линий мягкой пшеницы селекции Национального центра зерна им. П.П. Лукьяненко по аллельным вариантам генов *Waxy*

Э.Р. Давоян , Л.А. Беспалова, Р.О. Давоян, Е.В. Агаева, Г.И. Букреева, Ю.С. Зубанова, Д.С. Миков, Д.М. Болдаков

Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко, Краснодар, Россия


 e-mail: davayan@rambler.ru

В статье представлены результаты изучения с помощью молекулярных маркеров линий мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) по аллельным вариантам генов *Wx*. Исследование проводили в рамках работ по передаче нуль-аллелей генов *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* в сорта мягкой пшеницы и созданию селекционного материала с измененной активностью основных ферментов, участвующих в биосинтезе амилозы. Линии получены в отделе селекции и семеноводства пшеницы и тритикале Национального центра зерна им. П.П. Лукьяненко в результате скрещивания мутантных форм – носителей неактивных (нуль-аллелей) генов *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* с коммерческими сортами мягкой пшеницы. Отобранные для работы молекулярные маркеры позволили выявить ценный селекционный материал, имеющий в своем геноме как единичные нуль-аллели генов *Wx*, так и их комбинации. Сочетание двух нуль-аллелей (*Wx-A1b* + *Wx-D1b*) обнаружено у 30 линий. Наличие трех нуль-аллелей (*Wx-A1b* + *Wx-B1b* + *Wx-D1b*), что соответствует полностью *Wx*-пшеницам, обнаружено у одной линии. Отобрано 37 линий, сочетающих присутствие аллеля *Wx-B1e* с нуль-аллелями *Wx-A1b* и *Wx-D1b*. У 26 линий идентифицирована комбинация (*Wx-A1b* + *Wx-B1e*), 24 линии имели сочетание аллелей (*Wx-B1e* + *Wx-D1b*). Идентифицировано, что мутантные формы PI619381, PI619384, PI619386 – носители функционального аллеля *Wx-B1e*. Аллели *Wx-A1b* и *Wx-B1e* могли быть переданы в изучаемые линии как от используемых доноров, так и от сортов Старшина и Коротышка соответственно. Донорами привнесения в линии аллелей *Wx-B1b* и *Wx-D1b* служат использованные в скрещиваниях мутантные формы. Применение отобранных нами молекулярных маркеров для идентификации аллельного состояния генов *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* может стать эффективной основой для селекции с помощью молекулярных маркеров (MAS) по данному признаку. Отобранные линии с идентифицированными в них нуль-аллелями генов *Wx* представляют интерес для селекционных программ, направленных на улучшение технологических качеств зерна и получение сортов мягкой пшеницы с новыми свойствами крахмала.


Ключевые слова: мягкая пшеница; молекулярные маркеры; гены *Wx*.

Для цитирования: Давоян Э.Р., Беспалова Л.А., Давоян Р.О., Агаева Е.В., Букреева Г.И., Зубанова Ю.С., Миков Д.С., Болдаков Д.М. Изучение линий мягкой пшеницы селекции Национального центра зерна им. П.П. Лукьяненко по аллельным вариантам генов *Waxy*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(7):910-915. DOI 10.18699/VJ19.566

Allelic variants for *Waxy* genes in common wheat lines bred at the Lukyanenko National Grain Center

E.R. Davoyan , L.A. Bespalova, R.O. Davoyan, E.V. Agaeva, G.I. Bukreeva, Yu.S. Zubanova, D.S. Mikov, D.M. Boldakov

National Center of Grain named after P.P. Lukyanenko, Krasnodar, Russia

 e-mail: davayan@rambler.ru

This article presents the results of a molecular marker-assisted study of allelic variants of *Wx* genes in common wheat (*Triticum aestivum* L.) lines. The study was carried out as part of the work on the transfer of null alleles of the genes *Wx-A1*, *Wx-B1*, and *Wx-D1* to soft wheat the varieties and creation of breeding material with modified activities of the main enzymes involved in amylose biosynthesis. The lines were obtained at the Department of Breeding and Seed Production of Wheat and Triticale, Lukyanenko National Grain Center, by crossing mutant forms carrying inactive (null) alleles of genes *Wx-A1*, *Wx-B1*, and *Wx-D1* to bread wheat cultivars. The molecular markers selected for the study allowed identification of valuable breeding material carrying both single null alleles of *Wx* genes and their combinations in its genome. A combination of two null alleles (*Wx-A1b* + *Wx-D1b*) was detected in 30 lines. The presence of three null alleles (*Wx-A1b* + *Wx-B1b* + *Wx-D1b*), which corresponded to fully *Wx* wheat, was found in one line. We selected 37 lines that combined the presence of the *Wx-B1e* allele with the *Wx-A1b* and *Wx-D1b* null alleles. The *Wx-A1b* + *Wx-B1e* combination was identified in 26 lines, and 24 lines carried the combination of alleles *Wx-B1e* + *Wx-D1b*. The mutant forms PI619381, PI619384, and PI619386 were identified as carriers of the functional *Wx-B1e* allele. The *Wx-A1b* and *Wx-B1e* alleles could have been transferred to the studied lines from the donors used or from the Starshina and Korotyshka varieties, respectively. The mutant forms

used in the crosses are donors of the *Wx-B1b* and *Wx-D1b* alleles. The use of molecular markers chosen by us for identification of the allelic state of the *Wx-A1*, *Wx-B1*, and *Wx-D1* genes can provide grounds for marker-assisted selection for this trait. Selected lines found to possess null alleles of the *Wx* genes are applicable in breeding programs aimed at the improvement of technological qualities of grain and raise of bread wheat varieties with modified starch properties.

Key words: common wheat; molecular markers; *Wx* genes.

For citation: Davoyan E.R., Bepalova L.A., Davoyan R.O., Agaeva E.V., Bukreeva G.I., Zubanov Yu.S., Mikov D.S., Boldakov D.M. Allelic variants for *Waxy* genes in common wheat lines bred at the Lukyanenko National Grain Center. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(7): 910-915. DOI 10.18699/VJ19.566 (in Russian)

Введение

Создание сортов с улучшенными технологическими качествами зерна – актуальная задача селекции мягкой пшеницы.

Фракция крахмала, составляющая около 70 % от общего количества сухого вещества в зерне пшеницы, может значительно влиять на качество конечного использования муки из мягкой пшеницы (Zeng et al., 1997). Активное применение пшеничного крахмала в химической и пищевой промышленности объясняется его свойствами. К ним относятся: гигроскопичность; нейтральность вкусовых качеств; хорошая стойкость в случае термообработки; умеренная вязкость; стабилизация эмульсий (Maningat, Seib, 1997). Одно из интересных свойств – способность зерен набухать при нахождении в жидкости с повышенной температурой. Кроме того, его отличительной особенностью можно назвать возможность формировать клейстеры, отличающиеся стабильностью при термическом воздействии и долгом хранении (Maningat et al., 2009).

Качество крахмала тесно связано с соотношением амилозы к амилопектину – двух основных макромолекул, образующих крахмал. Связанная с гранулами крахмалсинтаза (GBSSI) – это фермент, ответственный за синтез амилозы в зерне пшеницы. Поскольку некоторые важные технологические свойства крахмала, такие как желатинизация, склеивание и гелеобразование, зависят от соотношения амилоза/амилопектин (Zeng et al., 1997), то в последние годы фермент GBSSI, или белок *Waxy*, был объектом многих исследований. У мягкой пшеницы этот фермент кодируется тремя гомологичными генами *Waxy* (*Wx*), расположенными на хромосомах 7A (локус *Wx-A1*), 7D (*Wx-D1*) и 4A (*Wx-B1*), (Shure et al., 1983; Chao et al., 1989; Yamamori et al., 1994). Каждый из генов *Wx* имеет несколько аллельных вариантов. Наиболее часто встречаются аллели дикого типа, получившие название *Wx-A1a*, *Wx-B1a* и *Wx-D1a* (Yamamori et al., 1994; Nakamura et al., 1995). Эти аллели не несут мутации и активно экспрессируют белок GBSSI. Другой тип аллеля (нуль-аллель) – нефункциональный, встречается реже и приводит к снижению содержания амилозы в крахмале. Известно, что наибольшее влияние на содержание амилозы в крахмале мягкой пшеницы оказывает ген *Wx-B1*, затем *Wx-D1* и *Wx-A1* (Yamamori et al., 1994). Выделены также функциональные аллели, отличные от аллелей дикого типа, однако их влияние остается малоизученным. Наличие трех нуль-аллелей по генам *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* приводит к полной элиминации GBSSI, блокированию синтеза амилозы и формированию крахмала амилопектинового типа (Nakamura et al., 2002).

В последнее время широкое распространение получили методы молекулярного маркирования для идентификации аллельного состояния генов *Wx*. Они позволяют обнаруживать различные аллели генов *Wx*, в том числе и нуль-аллели, и могут использоваться в качестве основы для селекционных программ, направленных на производство мягкой пшеницы с модифицированным соотношением амилозы и амилопектина (Nakamura et al., 1995; Kiribuchi-Otobe et al., 1997).

Ранее с помощью молекулярных маркеров было изучено 99 сортов и линий мягкой пшеницы селекции Национального центра зерна (НЦЗ) им. П.П. Лукьяненко по аллельному составу генов *Wx*. Установлено, что у большинства из них присутствуют аллели дикого типа, не снижающие содержание амилозы в крахмале (Климушина и др., 2012). Полученные данные послужили началом работ по передаче нуль-аллелей генов *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* в сорта мягкой пшеницы селекции НЦЗ им. П.П. Лукьяненко и созданию селекционного материала с измененной активностью основных ферментов, участвующих в биосинтезе амилозы.

В настоящей статье представлены результаты изучения с помощью молекулярных маркеров линий мягкой пшеницы F_6 по аллельным вариантам генов *Wx*. Цель работы заключалась в отборе ценных генотипов, несущих как отдельные нуль-аллели так и их комбинации, для последующего вовлечения их в селекционный процесс, направленный на получение сортов с улучшенными технологическими качествами зерна.

Материалы и методы

Объектами исследования стали 502 линии мягкой пшеницы поколения F_6 , полученные в отделе селекции и семеноводства пшеницы и тритикале НЦЗ им. П.П. Лукьяненко в результате скрещивания носителей неактивных (нуль-аллелей) генов *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* с коммерческими сортами мягкой пшеницы. В качестве доноров нуль-аллелей использовали мутантные формы PI619381, PI619384, PI619376, PI619386, PI619377, PI619378, у которых синтез функционального белка *Waxy* отсутствует. Эти формы пшеницы были получены из отделения СИММУТ (Турция) в рамках сотрудничества по обмену селекционным материалом. Мутантные формы созданы в Национальном центре по исследованию гермоплазмы мелкозерновых культур (USDA-ARS, США) в результате скрещивания сортов мягкой пшеницы Bai Huo китайской селекции, носителя нуль-аллеля гена *Wx-D1*, и сортов Kanto 107 и Ike селекции США, носителей нуль-аллелей генов *Wx-A1* и *Wx-B1*. В качестве реципиентов приме-

Таблица 1. Комбинации скрещивания изучаемых линий (2012 г.)

№ комбинации скрещивания	Комбинация скрещивания
54	(PI 619381/Коротышка) × Старшина
55	(PI 619384/Коротышка) × Старшина
56	(PI 619376/Васса) × Васса
58	(PI 619384/Утриш) × Утриш
59	(PI 619384/Коротышка) × Сила
60	(Есаул/PI 619386//Васса) × Васса
61	Табор × (PI619381/Коротышка/Старшина)
62	Гром × (PI619378/Коротышка/Старшина)
70	(Есаул/PI 619381) × Есаул
71	(Есаул/PI 619377) × Кума

няли сорта Старшина, Васса, Утриш, Сила, Есаул, Кума селекции НЦЗ им. П.П. Лукьяненко и сорт Коротышка селекции Белгородского научно-исследовательского института сельского хозяйства. Комбинации скрещивания изучаемых линий приведены в табл. 1.

ДНК выделяли из 5–7-дневных этиолированных проростков пшеницы по методу Плашке с коллегами (Plaschke et al., 1995). Оценку линий на аллельное состояние генов *Wx* осуществляли с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР). Праймеры отбирали на основании литературных данных, их названия и условия амплификации представлены в табл. 2. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 1× буфер для Taq-ДНК-полимеразы (50 мМ KCl, 20 мМ трис-HCl, pH 8.4, 2–5 мМ MgCl₂, 0.01 % твин-20), 2 мМ MgCl₂, по 0.2 мМ каждого dNTP, 12.5 мМ каждого праймера, 50 нг ДНК и 1 ед. Taq-полимеразы.

Амплификацию вели согласно условиям, указанным в табл. 2. Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в агарозном геле с 0.5× буфером TBE (трис-боратный буфер). Концентрация геля варьировала от 1.5 до 2.0 % в зависимости от размера амплифицированного фрагмента.

Гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолетовом свете с помощью фотобокса Infiniti 1000. В качестве маркера молекулярной массы использовали ДНК-маркер M 24 100 bp «СибЭнзим».

Результаты

С применением молекулярных маркеров проведен анализ 502 линий мягкой пшеницы поколения F₆ на аллельное состояние генов *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1*. Число изученных образцов по каждой комбинации скрещивания, а также количество выявленных аллелей приведены в табл. 3.

Изучение линий на аллельное состояние гена *Wx-A1* проводили при помощи кодоминантного маркера, разработанного Т. Nakamura с коллегами (2002). Нуль-аллель гена *Wx-A1* был идентифицирован во всех комбинациях скрещивания, за исключением № 59 и 60. Всего идентифицировано 122 линии, несущие *Wx-A1b*, в остальных был аллель *Wx-A1a* (дикий тип). Присутствие нуль-аллеля *Wx-A1b* подтверждено во всех используемых донорах, мутантных по генам *Wx-A1*, *Wx-B1*, и *Wx-D1* линиях.

Для идентификации аллельного состояния гена *Wx-B1* на первом этапе использовали маркер, разработанный А. McLauchlan с коллегами (2001), далее образцы с выявленными нуль-аллелями *Wx-B1b* были подвергнуты повторному скринингу с помощью маркера, предложенного L.S. Vanzetti с коллегами (2009) (рисунок). Эти авторы показали, что с помощью молекулярного маркера, разработанного А. McLauchlan с коллегами (2001), невозможно различить аллель *Wx-B1e* и нуль-аллель *Wx-B1b*. В то же время при использовании второго маркера в случае нуль-аллеля амплификация отсутствует, что может приводить к ошибкам при некачественном выделении ДНК и ингибировании ПЦР в отдельных образцах (Климушина и др., 2013).

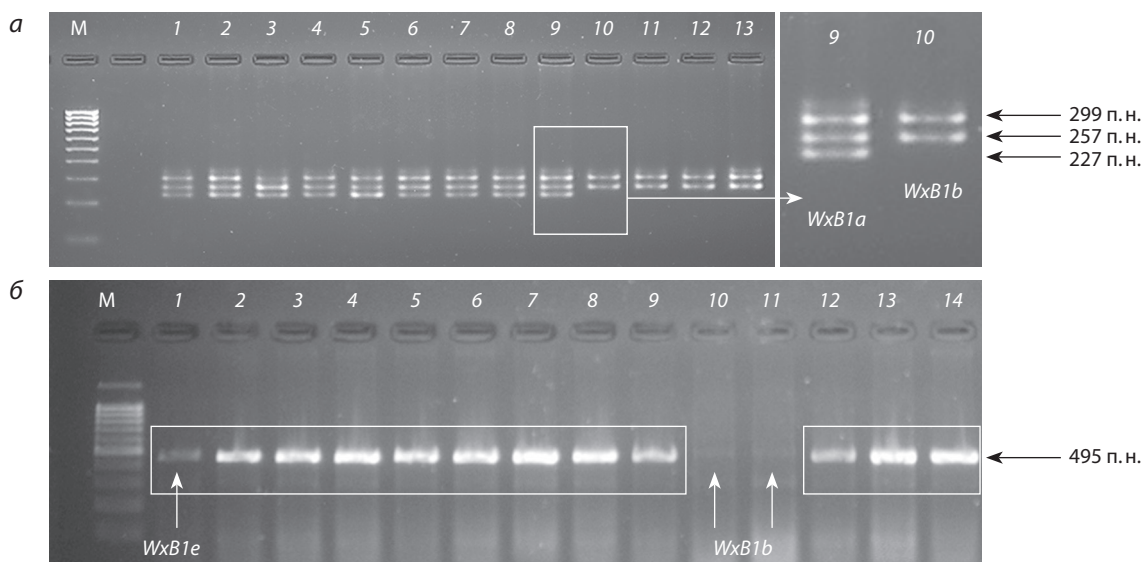
Нуль-аллель *Wx-B1b* обнаружен в одной линии, полученной из комбинации скрещивания № 56, четырех линиях комбинации № 62 и пяти линиях комбинации № 71. Установлено также, что из шести используемых в качестве доноров мутантных форм аллель *Wx-B1b* несут только три: PI619376, PI619377, PI619378. Присутствие функционального аллеля *Wx-B1e*, отличного от *Wx-B1a*, идентифицировано в 108 линиях. В комбинациях № 56, 59, 62, 71 этот аллель не обнаружен.

Таблица 2. Условия ПЦР и названия праймеров, используемых для идентификации соответствующих аллелей генов *Wx*

Ген	Праймеры	Температура отжига, °С	Аллель	Размер фрагмента, п. н.
<i>WxA1</i>	AFC и AR2 (Nakamura et al., 2002)	65	<i>Wx-A1a</i>	389
			<i>Wx-A1b</i>	370
<i>WxB1</i>	4F и 4R (McLauchlan et al., 2001)	65	<i>Wx-B1a</i>	3 фрагмента, 299, 257, 227
			<i>Wx-B1b</i>	2 фрагмента, 299, 257
	Wx-B1L и Wx-B1R (Vanzetti et al., 2009)	65	<i>Wx-B1a</i>	461
			<i>Wx-B1b</i>	Отсутствие фрагмента
	<i>Wx-B1e</i>	495		
<i>WxD1</i>	Wx-D1-2-F и Wx-D1-2-R (Shariflou et al., 2001)	55	<i>Wx-D1a</i>	900
			<i>Wx-D1b</i>	279

Таблица 3. Номер комбинации скрещивания и количество линий с идентифицированными нуль-аллелями *Wx-A1b*, *Wx-B1b*, *Wx-D1b* и аллелем *Wx-B1e*

№ комбинации скрещивания	Кол-во линий	Кол-во линий с выявленными аллелями			
		<i>Wx-A1b</i>	<i>Wx-B1b</i>	<i>Wx-B1e</i>	<i>Wx-D1b</i>
54	26	26		22	17
55	45	27		20	4
56	27	11	1		
58	43	22		1	17
59	33				
60	62			5	1
61	47	17		13	4
62	60	9	4		3
70	100	3		47	42
71	59	7	5		12
	502	122	10	108	100



Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами:

a – 4F и 4R (McLauchlan et al., 2001). 1–12 – линии комбинации скрещивания № 54; 13 – К+ (мутантная форма PI619381); *б* – *Wx-B1L* и *Wx-B1R* (Vanzetti et al., 2009). 1 – К+ (мутантная форма PI619381); 2–9; 12–14 – линии комбинации скрещивания № 54; 10 – мутантная форма PI619377; 11 – мутантная форма PI619378. М – маркер молекулярного веса.

Нефункциональный аллель *Wx-D1b* обнаружен у 100 линий во всех комбинациях скрещивания, за исключением № 56 и 59. Наибольшее число линий с этим аллелем идентифицировано в комбинации скрещивания № 70. В результате проведенного анализа отобраны линии с комбинациями нуль-аллелей генов *Wx* (табл. 4).

Сочетание двух нуль-аллелей (*Wx-A1b* + *Wx-D1b*) обнаружено у 19 линий из комбинации скрещивания № 58, у трех линий в комбинациях № 61 и № 62, у двух линий комбинации № 70 и у одной линии в комбинации № 71. Наличие трех нуль-аллелей (*Wx-A1b* + *Wx-B1b* + *Wx-D1b*), что соответствует полностью *Wx*-пшеницам, выявлено в линии 56-12Mc4, полученной от скрещивания мутантной формы PI 619376 с сортом Васса (комбинация скрещива-

ния № 56). Отобрано 37 линий, сочетающих присутствие аллеля *Wx-B1e* с нуль-аллелями *Wx-A1b* и *Wx-D1b*. У 26 линий идентифицирована комбинация (*Wx-A1b* + *Wx-B1e*), 24 линии несли сочетание аллелей (*Wx-B1e* + *Wx-D1b*).

Обсуждение

С помощью отобранных молекулярных маркеров выявлены линии мягкой пшеницы, несущие как единичные нуль-аллели генов *Wx*, так и их комбинации. Применение молекулярных маркеров для идентификации аллельного состояния генов *Wx-A1*, *Wx-B1* и *Wx-D1* может стать эффективной основой для селекции с помощью молекулярных маркеров по данному признаку. На начальных этапах отбора для изучения аллельного состояния гена

Таблица 4. Номер комбинации скрещивания и количество линий с выявленным сочетанием аллелей генов *Wx*

№ комбинации скрещивания	Кол-во линий с выявленным сочетанием аллелей генов <i>Wx</i>				
	<i>Wx-A1b</i> + <i>Wx-B1e</i>	<i>Wx-A1b</i> + <i>Wx-D1b</i>	<i>Wx-B1e</i> + <i>Wx-D1b</i>	<i>Wx-A1b</i> + <i>Wx-B1e</i> + <i>Wx-D1b</i>	<i>Wx-A1b</i> + <i>Wx-B1b</i> + <i>Wx-D1b</i>
54	9			15	
55	17	2		22	
56					1
58		19			
61	5	3	1		
62		3			
70		2			
71		1	23		
Общее кол-во линий	26	30	24	37	1

Wx-B1 целесообразно дополнительно проводить скрининг с кодоминантным маркером, разработанным М. Saito с коллегами (2009), который позволяет идентифицировать гетерозиготные растения. Однако работа с этим маркером требует проведения электрофореза с высоким разрешением для более точного разделения между фрагментами ПЦР аллелей *Wx-B1e* и *Wx-B1a*. Привнесение нуль-аллеля *Wx-A1b* в линии комбинации скрещивания № 54, 55, 61, 62 могло произойти как от используемых в качестве доноров мутантных форм PI619381, PI619384 и PI619378, так и от сорта Старшина. По данным М.В. Климушиной с коллегами (2012), этот сорт служит носителем нуль-аллеля *Wx-A1b*. В случае линий, полученных при комбинации скрещивания № 56, 58, 70, 71, аллель *Wx-A1b* передан от доноров PI619376, PI619384, PI619381 и PI619377 соответственно. Показано, что сорт мягкой пшеницы Коротышка, в котором ранее ошибочно был идентифицирован нуль-аллель *Wx-B1b*, служит носителем функционального аллеля *Wx-B1e* (Дивашук и др., 2011). Следовательно, этот сорт может быть донором передачи аллеля *Wx-B1e* в линиях, полученных с его участием (комбинации скрещивания № 54, 55, 61). В мутантных формах PI619381, PI619384 и PI619386 нами был идентифицирован функциональный аллель *Wx-B1e*. Аллель *Wx-B1e* также мог быть передан от PI619381 и PI619384, а в случае комбинации скрещивания № 70 – только от PI619381. Участвовавшие в скрещиваниях сорта не являются носителями нуль-аллелей генов *Wx-B1* и *Wx-D1*. Таким образом, донорами привнесения аллеля *Wx-B1b* у 10 отобранных линий служат мутантные формы PI619376, PI619377 и PI619378, а в случае аллеля *Wx-D1b* – PI619381, PI619384, PI619386, PI619377, PI619378.

Отобранные линии с идентифицированными в них аллелями генов *Wx* представляют интерес для селекционных программ, направленных на улучшение технологических качеств зерна и получение сортов мягкой пшеницы с новыми свойствами крахмала. Линии с нуль-аллелем *Wx-B1b* перспективны для производства специальных видов лапши, таких как удон или рамен. Это связано с высокими показателями объема набухания и пиковой вязкости склеивания, которые наблюдаются у пшеницы с пониженным содержанием амилозы. Так, например, при-

годность австралийских сортов мягкой пшеницы для производства японской лапши удон частично обусловлена низким уровнем амилозы в этих сортах (Oda et al., 1980; Toyokawa et al., 1989). Установлено, что у большинства из них отсутствует белок *Wx-B1* (Yamamori et al., 1994). Свойства крахмала полностью *Wx*-пшениц, несущих нуль-аллели *Wx-A1b*, *Wx-B1b*, *Wx-D1b*, не подходят для использования в производстве лапши, но могут быть полезны для промышленных целей. Применение полностью *Wx*-пшениц в смесях обычной муки увеличивает весовой выход продукта и объем испеченного хлеба, а мука, полученная из сортов *Wx*-пшеницы в чистом виде, имеет низкий удельный объем и липкую структуру мякиша и не подходит для выпечки хлебобулочных изделий (Hayakawa et al., 2004). Максимальное содержание муки *Wx*-пшеницы без существенных отрицательных изменений качества хлебобулочного изделия составляет 30 %. В то же время мука *Wx*-пшеницы обладает потенциалом улучшителя, а также способствует длительному хранению готовой продукции (Hayakawa et al., 2004).

Заключение

Изучение аллельных вариантов генов *Wx* является важным этапом для селекции сортов мягкой пшеницы с измененным составом крахмала без его химической модификации. В результате проведенной работы отобран ценный исходный материал для селекции мягкой пшеницы с улучшенными технологическими качествами зерна.

Список литературы / References

- Дивашук М.Г., Климушина М.В., Карлов Г.И. Молекулярно-генетическая характеристика аллеля *Wx-B1e* мягкой пшеницы и применимость ДНК-маркеров для его идентификации. Генетика. 2011;47(12):1611-1615.
[Divashuk M.G., Klimushina M.V., Karlov G.I. Molecular genetic characteristics of the *Wx-B1e* allele from common wheat and applicability of the DNA markers for its identification. Russ. J. Genet. 2011;47(12):1428-1432.]
Климушина М.В., Гладких Н.И., Дивашук М.Г., Беспалова Л.А., Васильев А.В., Карлов Г.И. Распределение аллелей генов *Wx* в коллекции мягкой пшеницы Краснодарского НИИСХ им. П.П. Лукьяненко. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012;16(1):187-192.

- [Klimushina M.V., Gladkih N.I., Divashuk M.G., Bespalova L.A., Vasilyev A.V., Karlov G.I. Distribution of allelic variants of *Wx* genes in the common wheat collection made at the Krasnodar Lukyanenko Research Institute of Agriculture. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2012;16(1):187-192. (in Russian)]
- Chao S., Sharp P.J., Worland A.J., Warham E.J., Koeber R.M.D., Gale M.D. RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 1989;78(4):495-504.
- Hayakawa K., Tanaka K., Nakamura T., Endo S., Hoshino T. End use quality of waxy wheat flour in various grain-based foods. *Cereal Chem.* 2004;81(5):666-672.
- Kiribuchi-Otobe C., Nagamine T., Yanagisawa T., Phnishi M., Yamaguchi I. Production of hexaploid wheats with waxy endosperm character. *Cereal Chem.* 1997;74:72-74.
- Maningat C.C., Seib P.A. Update on wheat starch and its uses. In: *Proc. Int. Wheat Quality Conf.* J.L. Steele, O.K. Chung (Eds.). Manhattan, KS.: Grain Industry Alliance, 1997;261-284.
- Maningat C.C., Seib P.A., Bassi S.D., Woo K.S., Lasater G.D. Wheat starch: Production, properties, modification, and uses. In: *BeMiller J., Whistler R. (Eds.). Starch Chemistry and Technology*. New York: Academic Press, 2009;441-510.
- McLauchlan A., Ogbonnaya F.C., Hollingsworth B. Development of robust PCR-based DNA markers for each homeoallele of granule-bond starch synthase and their application in wheat breeding programs. *Aust. J. Agric. Res.* 2001;52:1409-1416.
- Nakamura T., Jamamori M., Hirano H., Hidaka S. Production of waxy (amylase-free) wheat. *Mol. Gen. Genet.* 1995;248:253-259.
- Nakamura T., Vrinten P., Saito M., Konda M. Rapid classification of partial waxy wheats using PCR-based markers. *Genome*. 2002;45:1150-1156.
- Oda M., Yasuda Y., Okazaki S., Yamauchi Y., Yokoyama Y. A method of flour quality assessment for Japanese noodles. *Cereal Chem.* 1980;57:253-259.
- Plaschke J., Ganai M.W., Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 1995;91:1001-1007.
- Saito M., Vrinten P., Ishikawa G., Graybosch R., Nakamura T. A novel codominant marker for selection of the null *Wx-B1* allele in wheat breeding programs. *Mol. Breed.* 2009;23:209-217.
- Shariflou M.R., Hassani M.E., Sharp P.J. A PCR-based DNA marker for detection of mutant and normal alleles of the *Wx-D1* gene of wheat. *Plant Breed.* 2001;120(2):121-124.
- Shure M., Wessler S., Fedoroff N. Molecular identification and isolation of the *Waxy* locus in maize. *Cell*. 1983;35(1):225-233.
- Toyokawa H., Rubenthaler G.L., Powers J.R., Schanus E.G. Japanese noodle qualities. 2. Starch components. *Cereal Chem.* 1989;66:387-391.
- Vanzetti L.S., Pflüger L.A., Rodríguez-Quijano M., Carrillo J.M., Helguera M. Genetic variability for waxy genes in Argentinean bread wheat germplasm. *Electronic J. Biotechnol.* 2009;12:1-9.
- Yamamori M., Nakamura T., Endo T.R., Nagamine T. Waxy protein deficiency and chromosomal location of coding genes in common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1994;89:179-184.
- Zeng M., Morris C.F., Batey I.I., Wrigley C.W. Sources of variation for starch gelatinization, pasting, and gelation properties in wheat. *Cereal Chem.* 1997;74:63-71.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 31.05.2019. После доработки 19.07.2019. Принята к публикации 22.07.2019.

Пятая международная научная конференция PlantGen2019

Фенотипическое проявление аллеля низкостебельности *Rht-B1p* (*Rht-17*) у яровой твердой пшеницы в двух климатических условиях

А.Г. Черноок^{1,2}✉, П.Ю. Крупин^{1,2}, Л.А. Беспалова³, В.В. Панченко³, В.Я. Ковтуненко³, М.С. Баженов^{1,2}, Л.А. Назарова¹, Г.И. Карлов^{1,2}, А.Ю. Крупина¹, М.Г. Дивашук^{1,2}

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, лаборатория прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений, Москва, Россия

² Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Центр молекулярной биотехнологии, Москва, Россия

³ Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко, Краснодар, Россия

✉ e-mail: lrbis-sibrl@yandex.ru

Аллели генов, определяющие низкостебельность, играют большую роль в селекции твердой пшеницы, так как не только снижают высоту растений, обеспечивая их устойчивость к полеганию, но и обладают рядом плеiotропных эффектов. Твердая пшеница несет два субгенома, А и В, что ограничивает использование аллелей генов субгенома D и требует расширения арсенала аллелей низкостебельности и изучения их влияния на высоту и агрономически важные признаки. В настоящей работе изучали фенотипическое проявление аллеля *Rht-B1p* (*Rht-17*) в семьях В₂F_{2:3}, полученных в результате скрещивания Chris Mutant/#517//LD222 в полевом опыте в Москве и Краснодаре. Показано, что растения, гомозиготные по аллелю *Rht-B1p*, по сравнению с растениями, несущими аллель дикого типа *Rht-B1a*, были ниже на 36.3 см (40 %) в Москве и на 49.5 см (48 %) в Краснодаре. В полевом опыте в Краснодаре у растений с *Rht-B1p* было на одно междоузлие меньше, чем у растений дикого типа, что также внесло вклад в снижение высоты растений. Масса зерна в главном колосе у растений с аллелем *Rht-B1p* была ниже, чем у растений с *Rht-B1a*, на 12 % в Москве и на 23 % в Краснодаре из-за снижения массы 1000 зерен в обоих регионах проведения полевого опыта. Число зерен в главном колосе у растений с *Rht-B1p* было выше по сравнению с растениями с *Rht-B1a* на 6.5 % в Москве благодаря увеличению числа колосков в главном колосе и на 11 % в Краснодаре вследствие большей озерненности колоска. Колошение у растений с аллелем низкостебельности *Rht-B1p* по сравнению с растениями с аллелем дикого типа *Rht-B1a* в Краснодаре наступило позже в среднем на семь дней. Обсуждаются возможность и перспективы использования *Rht-B1p* в селекции твердой пшеницы. Ключевые слова: твердая пшеница; молекулярные маркеры; плеiotропное действие гена; полевой опыт; гены низкостебельности; агрономически ценные признаки; высота растения.

Для цитирования: Черноок А.Г., Крупин П.Ю., Беспалова Л.А., Панченко В.В., Ковтуненко В.Я., Баженов М.С., Назарова Л.А., Карлов Г.И., Крупина А.Ю., Дивашук М.Г. Фенотипическое проявление аллеля низкостебельности *Rht-B1p* (*Rht-17*) у яровой твердой пшеницы в двух климатических условиях. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(7):916-925. DOI 10.18699/VJ19.567

Phenotypic effects of the dwarfing gene *Rht-17* in spring durum wheat under two climatic conditions

A.G. Chernook^{1,2}✉, P.Yu. Kroupin^{1,2}, L.A. Bepalova³, V.V. Panchenko³, V.Ya. Kovtunencko³, M.S. Bazhenov^{1,2}, L.A. Nazarova¹, G.I. Karlov^{1,2}, A.Yu. Kroupina¹, M.G. Divashuk^{1,2}

¹All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Laboratory of Applied Genomics and Crop Breeding, Moscow, Russia

²Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Centre for Molecular Biotechnology, Moscow, Russia

³National Center of Grain named after P.P. Lukyanenko, Krasnodar, Russia

✉ e-mail: lrbis-sibrl@yandex.ru

Alleles of the genes, conferring a dwarfing phenotype, play a crucial role in wheat breeding, as they not only reduce plant height, ensuring their resistance to lodging, but also have a number of positive and negative pleiotropic effects on plant productivity. Durum wheat carries only two subgenomes (A and B), which limits the use of the D-subgenome genes and requires the expansion of the arsenal of dwarfing alleles and the study of their effects on height and agronomically important traits. We studied the effect of the gibberellin-insensitive allele *Rht-B1p* in the В₂F_{2:3} families, developed by crossing Chris Mutant /#517//LD222 in a field experiment in Moscow and Krasnodar. In our experiments, plants homozygous for *Rht-B1p* were shorter than those homozygous for the wild-type allele *Rht-B1a* by 36.3 cm (40 %) in Moscow and 49.5 cm (48 %) in Krasnodar. In the field experiment in Krasnodar, each plant with *Rht-B1p* had one less internode than any plant with *Rht-B1a*, which additionally contributed to the decrease in plant height. Grain weight per main spike was lower in plants with *Rht-B1p* than in plants with *Rht-B1a* by 12 % in Moscow and by 23 % in Krasnodar due to a decrease in 1000 grain weight in both regions of the field experiment. The number of grains per main spike in plants with *Rht-B1p* was higher in comparison to that with *Rht-B1a* by 6.5 % in Moscow due to an increase in spikelet

number per main spike and by 11 % in Krasnodar due to an increase in grain number per spikelet. The onset of heading in plants with *Rht-B1p* in comparison with the plants with the wild-type allele *Rht-B1a* was 7 days later in Krasnodar. The possibility and prospects for the use of *Rht-B1p* in the breeding of durum wheat are discussed.

Key words: durum wheat; molecular markers; pleiotropic gene effect; plot experiment; dwarfing genes; valuable agronomic traits; plant height.

For citation: Chernook A.G., Kroupin P.Yu., Bespalova L.A., Panchenko V.V., Kovtunenkov V.Ya., Bazhenov M.S., Nazarova L.A., Karlov G.I., Kroupina A.Yu., Divashuk M.G. Phenotypic effects of the dwarfing gene *Rht-17* in spring durum wheat under two climatic conditions. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(7): 916-925. DOI 10.18699/VJ19.567 (in Russian)

Введение

Высота пшеницы – сложный признак, который определяется различными группами генов и связан с морфологией и фертильностью колоса, временем цветения, продуктивностью растения и качеством зерна (Chen et al., 2016; Würschum et al., 2018a, b). Одним из путей повышения урожайности пшеницы, особенно в условиях интенсивного земледелия, является оптимизация высоты растений за счет создания низкостебельных сортов (Лукьяненко, 1970; Беспалова, 2001; Divashuk et al., 2013; Grover et al., 2018). Наибольшее значение в создании форм пшеницы с оптимальной высотой растений в настоящее время имеют аллельные варианты генов, определяющих высоту растения, обладающие фенотипическим эффектом снижения высоты растений. Среди многообразия генетических факторов, отвечающих за высоту растения пшеницы, особое место занимают аллельные варианты гена *Rht* (Reduced height), представленного у мягкой пшеницы тремя гомеологами: *Rht-A1*, *Rht-B1* и *Rht-D1*. Эти гены кодируют белок DELLA, который подавляет рост клеток и репрессирует гиббереллиновый сигнал (Peng et al., 1999). Гиббереллин активизирует рост клеток, запуская деградацию DELLA и снимая репрессию с генов роста. Дикий тип аллелей генов *Rht-A1a*, *Rht-B1a* и *Rht-D1a* не имеет собственного фенотипического проявления. Мутации в этих генах могут приводить к образованию белков DELLA с повышенной стабильностью, которые не подвергаются гиббереллин-опосредованному протеолизу. Фенотипический эффект таких мутантных аллелей – растения со сниженной высотой, которую нельзя восстановить внешней обработкой гиббереллинами (гиббереллин-нечувствительный фенотип) (Chebotar et al., 2012; Билова и др., 2016; Van De Velde et al., 2017).

Умеренное снижение высоты растений как результат экспрессии таких аллелей позволяет повысить урожайность благодаря следующим факторам: низкорослые растения более устойчивы к полеганию, вследствие чего уменьшаются потери при уборке; у сортов, устойчивых к полеганию, можно увеличить норму высева по сравнению с неустойчивыми, а, следовательно, увеличить стеблестой на единицу площади; у низкорослых растений происходит перераспределение ассимилятов в пользу развивающегося колоса, а не вегетативных органов (Лукьяненко, 1970; Беспалова, 2001; Hedden, 2003). Аллели генов, определяющие низкостебельность, *Rht-B1b (Rht1)* и *Rht-D1b (Rht2)*, сыграли большую роль в Зеленой революции. Благодаря их использованию в селекции в Мексике, США и Европе были созданы продуктивные сорта, устойчивые к полеганию при высоких дозах удобрений и орошении, что позволило отказаться от применения ретардантов (Ку-

лаева, 2000; Hedden 2003; Borojevic K., Borojevic K., 2005; Knopf et al., 2008). Аллели *Rht-B1b* и *Rht-D1b* наряду с другими аллелями низкостебельности получили большое распространение среди отечественных сортов мягкой пшеницы (Беспалова и др., 2012; Divashuk et al., 2013; Миков и др., 2018). Что касается твердой пшеницы, то в отечественной селекции в последние 20 лет отмечен значительный рост продуктивности сортов благодаря интрогрессии *Rht-B1b* и *Rht-B1e* (Самофалова и др., 2014; Мудрова, Яновский, 2016), а в современных итальянских и испанских сортах наибольшее распространение получил аллель *Rht-B1b*, который увеличил урожайность за счет озерненности колоска (Alvaro et al., 2008). В современных сортах представлены преимущественно эти два аллеля, несмотря на разнообразие мутантных аллелей низкостебельности (Alvaro et al., 2008; Мальчиков, 2009).

Помимо преимуществ, которые дает *Rht-B1b*, он обладает и рядом недостатков. Так, растения твердой пшеницы, несущие этот аллель, имеют более короткий колеоптиль по сравнению с растениями с аллелем *Rht-B1a*, что ограничивает глубокую заделку семян с недостатком почвенной влаги в период посева (Trethowan et al., 2001). В условиях засухи высокорослые растения твердой пшеницы с аллелем *Rht-B1a* могут показать более высокую продуктивность, чем растения с *Rht-B1b* (Mathews et al., 2006). Вместе с тем растения твердой пшеницы с *Rht-B1b* давали зерно с меньшим весом и более низким содержанием белка, что может быть серьезной проблемой (McClung et al., 1986; Zaccari et al., 1987). Разнообразие аллелей гена *Rht-B1*, которые можно использовать для снижения высоты растений пшеницы твердой, задействовано в настоящее время не полностью. Продолжается активная работа по расширению разнообразия генов низкостебельности, вовлеченных в создание новых сортов твердой пшеницы, и изучению их влияния на хозяйственно ценные признаки (Watanabe, 2008; Мальчиков и др., 2017; Vikke et al., 2017, 2019). Сравнительно недавно с молекулярной точки зрения был описан аллель низкостебельности *Rht-B1p*, ранее обозначаемый как *Rht-17* (Bazhenov et al., 2015).

Московская область (Центральный район Нечерноземной зоны) и Краснодарский край являются важными для экономики с точки зрения производства зерна для нужд населения, животноводства и перерабатывающей промышленности. Они отличаются по почвенно-климатическим условиям и позволяют оценить фенотипическое проявление аллеля в различных условиях. Настоящее исследование направлено на изучение фенотипического эффекта аллеля *Rht-B1p* на высоту растений и другие хозяйственно ценные признаки у пшеницы твердой в полевом опыте, проведенном параллельно в Москве и Краснодаре.

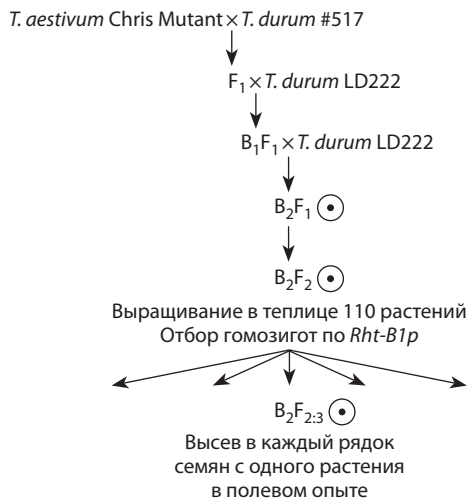


Рис. 1. Схема получения растительного материала для проведения полевого опыта.

Кружком с точкой внутри обозначено самоопыление.

Материалы и методы

Растительный материал. В качестве исходного материала нами использовалась популяция B_2F_2 Chris Mutant/#517//LD222, полученная от профессора N. Watanabe из Университета Ибаракы (факультет агрономии, Япония) (Bazhenov et al., 2015) (рис. 1). Низкостебельная линия мягкой пшеницы Chris Mutant служит донором аллеля *Rht-B1p*, она получена путем химического мутагенеза из сорта Chris (Heiner, Elsayed, 1974).

Растения популяции B_2F_2 выращивали в количестве 110 шт. в теплице Центра молекулярной биотехнологии (Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева) при дозированном поливе и внесении равных доз удобрений. У каждого индивидуального растения B_2F_2 с помощью молекулярного маркера (см. раздел Молекулярный анализ) определяли аллельное состояние гена *Rht-B1*, после чего отбирали растения-гомозиготы по аллелям *Rht-B1p* и *Rht-B1a*. Гомозиготные растения по достижении ими фазы полной спелости обмолачивали вручную, семена, собранные с отдельного растения B_2F_2 , принимали за одну семью. В результате для посева в полевом опыте были отобраны семена от растений, гомозиготных по аллелям *Rht-B1a* (25 семей)

и *Rht-B1p* (18 семей). Семена от каждой семьи были разделены на две части для посева в полевом опыте в двух регионах (Москва и Краснодар).

Полевой опыт с растениями $B_2F_{2,3}$ проводили в Москве на Полевой опытной станции РГАУ–МСХА им. К.А. Тимирязева (55°50' с. ш., 37°33' в. д.) и Краснодаре на земельном участке Национального центра зерна им. П.П. Лукьяненко (45°41' с. ш., 38°55' в. д.) в 2018 г. (далее Москва и Краснодар соответственно). Москва (Центральный район Нечерноземья, умеренно континентальный климат) отличается большим количеством осадков, умеренными температурами и дерново-подзолистыми почвами, а для Краснодарского края (Северо-Кавказский район, мягкий континентальный климат) типичны высокие температуры при обильных осадках и черноземные почвы, при этом для него характерны резкие погодные изменения. Погодные условия (температура и осадки) во время проведения полевого опыта от посева до окончательной уборки показаны в табл. 1. Длина светового дня в период выращивания растений в условиях Москвы составляла 15:35 на момент посева (5 мая), увеличивалась до 17:33 (24 июня), далее снижаясь до 14:49 ко дню окончательной уборки (18 августа); средняя длина дня составила 16:40 (длинный световой день). Длина светового дня в период выращивания растений в Краснодаре составляла 12:10 на момент посева (21 марта) и увеличивалась, достигнув 15:34, ко дню окончательной уборки (30 июня); средняя длина дня составила 14:23 (короткий световой день). Посев осуществляли в Москве 5 мая, в Краснодаре – 21 марта 2018 г. Посев в двух регионах производили кассетным способом селекционной сеялкой СКС-6-10 при следующих параметрах: длина делянки 1 м, в 4 рядка с расстоянием между рядками 30 см (Москва) или 40 см (Краснодар), расстояние между делянками 50 см. Сорняки выпалывали вручную, проводили необходимую обработку пестицидами для защиты растений от вредителей. Каждое растение убирали вручную отдельно, по достижению им фазы полной спелости; окончательный день уборки в Москве пришелся на 19 августа, в Краснодаре – на 30 июня. Обмолот проводили на колосовой молотилке МКС-1М (ВИМ-МЗОК, Москва, Россия).

Фенотипирование. Выполняли структурный анализ каждого индивидуального растения по следующим фенотипическим признакам: высота растений (см), длина

Таблица 1. Агрометеорологические условия в период проведения полевого опыта в Москве и Краснодаре в 2018 г.

Месяц	Москва 5 мая–19 августа 2018 г.			Краснодар 21 марта–30 июня 2018 г.		
	Сумма активных температур	Средняя температура	Сумма осадков	Сумма активных температур	Средняя температура	Сумма осадков
Март	–	–	–	142	6.4	38
Апрель	–	–	–	2845	13.8	26
Май	3288	16.1	105	4731	19.4	43
Июнь	3914	17.3	107	5407	24.1	11
Июль	5097	20.5	190	–	–	–
Август	2926	20.3	39	–	–	–
Сумма	15225	–	441	13125	–	118

каждого междоузлия (см), количество междоузлий, длина главного колоса (см), число колосков в главном колосе, масса зерна с главного колоса (г), число зерен с главного колоса (г), число зерен в колосе (отношение числа зерен в главном колосе к числу колосков в главном колосе); вегетативная масса надземной части главного побега до обмолота. На основании измеренных величин рассчитывали следующие показатели: плотность колоса (число колосков в главном колосе на 10 см длины колосового стресса), масса 1000 зерен (тысячекратная масса зерен с главного колоса по отношению к числу зерен с главного колоса), озерненность колоска (число зерен в главном колосе по отношению к числу колосков в главном колосе), уборочный индекс (Кхоз, отношение массы зерен с главного колоса к вегетативной массе надземной части главного побега до обмолота). Дату наступления колошения определяли в целом для отдельной семьи визуально. Из каждой семьи анализировали по 15 растений. Подсчет семян осуществляли с помощью приложения SeedCounter (Komyshev et al., 2017).

Молекулярный анализ. Из каждого индивидуального вегетирующего растения из листа была выделена ДНК и с помощью молекулярных маркеров установлено аллельное состояние гена *Rht-B1*. Геномную ДНК экстрагировали из индивидуальных вегетирующих растений СТАВ методом (Bernatzky, 1986). Аллельное состояние гена *Rht-B1* определяли методом ПЦР с применением двух пар праймеров для каждого из изучаемых аллелей: для выявления аллеля *Rht-B1a* использовали пару праймеров *Rht-B1-R1a* и *BF*; а аллеля *Rht-B1p* – пару праймеров *Rht-B1p-R* и *BF* (табл. 2). Праймеры синтезированы ООО «Синтол» (Москва, Россия). Таким образом, каждое растение проверяли дважды: на наличие *Rht-B1a* и на присутствие *Rht-B1p*.

Состав реакционной смеси и условия ПЦР соответствовали протоколу, описанному в (Bazhenov et al., 2015). Реакцию ПЦР проводили в приборе GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Фостер Сити, Калифорния, США). Размер ампликонов устанавливали методом электрофореза в 1.5 % агарозном геле с добавлением бромистого этидия в Трис-борат-ЭДТА буфере и последующей визуализацией геля в системе Gel Doc XR+ (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, Калифорния, США). В качестве маркера размеров применяли маркер GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Размер целевого продукта амплификации при использовании обеих пар праймеров составлял 226 п. н. (Bazhenov et al., 2015).

Статистический анализ. Для каждого фенотипического признака определяли среднее значение и стандартное отклонение. Полученные данные обрабатывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа: фактор 1 – аллельное состояние гена *Rht-B1*, фактор 2 – регион проведения полевого опыта. Значимость разности между средними значениями по всем изучаемым признакам у растений, гомозиготных по *Rht-B1a* и *Rht-B1p*, в двух регионах проведения полевого опыта выявляли посредством критерия наименьшей существенной разности на 95 % уровне доверительной вероятности ($HSP_{0.05}$). Для визуализации влияния *Rht-B1p* на высоту, массу зерен с главного колоса, числа зерен с главного колоса и массу

Таблица 2. Праймеры для определения аллелей *Rht-B1a* и *Rht-B1p*

Праймер	Нуклеотидная последовательность
BF	5'-GGT AGG GAG GCG AGA GGC GAG-3'
<i>Rht-B1a-R</i>	5'-CCA TCT CCA GCT GCT CCA GCT TAT G-3'
<i>Rht-B1p-R</i>	5'-CCA TCT CCA GCT GCT CCA GCT TAT A-3'

1000 зерен нами был проведен анализ методом главных компонент. Результаты анализа интерпретировали на основании учебных пособий по статистике (Доспехов, 1985; StatSoft, Inc., 2012). Все анализы осуществляли с помощью программы Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., Талса, Оклахома, США).

Фенотипический эффект *Rht-B1p* относительно *Rht-B1a* определяли как разницу между средними (C_p) для каждого фенотипического признака у групп растений, гомозиготных по аллелям *Rht-B1p* (генотип *Rht-B1p Rht-B1p*) и *Rht-B1a* (генотип *Rht-B1a Rht-B1a*). Значение фенотипического эффекта *Rht-B1p*, нормированное относительно *Rht-B1a* (НФЭ), определяли как указанную разницу относительно среднего значения изучаемого фенотипического признака у группы растений, гомозиготных по аллелю *Rht-B1a* (генотип *Rht-B1a Rht-B1a*), выраженную в процентах:

$$\text{НФЭ } Rht-B1p (\%) = \frac{C_p(Rht-B1p Rht-B1p) - C_p(Rht-B1a Rht-B1a)}{C_p(Rht-B1a Rht-B1a)} \cdot 100.$$

Результаты

Молекулярный анализ. В результате молекулярного анализа нами идентифицировано аллельное состояние гена *Rht-B1* у отдельных растений популяции B_2F_2 (Приложение 1)¹. На основании полученных данных были отобраны растения, гомозиготные по аллелям *Rht-B1a* (25 растений) и *Rht-B1p* (18 растений). Семена с этих растений были разделены на две части и высеваны в Москве и Краснодаре в полевом опыте. Проведено изучение фенотипического проявления *Rht-B1p* на основные агрономически ценные признаки у твердой пшеницы в условиях Москвы и Краснодара.

Высота и междоузлия. Дисперсионный анализ результатов полевого опыта в Москве и Краснодаре показывает значимость на 5 % уровне влияния аллельного состояния *Rht-B1*, региона проведения полевого опыта, а также их взаимодействия на высоту растений (Приложение 2). Оценка значимости разностей между средними значениями изучаемых признаков у растений, гомозиготных по *Rht-B1a* и *Rht-B1p*, с помощью критерия $HSP_{0.05}$ дала следующие результаты. Растения с аллелем дикого типа *Rht-B1a* значимо выше растений с аллелем дикого типа *Rht-B1a* в Москве – на 13.7 см. В то же время растения с аллелем низкостебельности *Rht-B1p* в Краснодаре и Москве существенно не отличаются друг от друга по высоте (табл. 3, Приложение 3). Растения с аллелем *Rht-B1p* по сравнению с растениями, несущими аллель дикого типа *Rht-B1a*, были ниже на 36.3 см (40 %) в Москве и на 49.5 см (48 %) в Краснодаре (см. табл. 3, Приложение 2). При

¹ Приложения 1–4 см. по адресу:

<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2019-23/appx21.pdf>

Таблица 3. Влияние аллеля *Rht-B1p* на основные агрономически значимые признаки в семьях твердой пшеницы B₂F_{2,3} (Chris M1/#517×LD222)

Признак	Москва		Краснодар	
	<i>Rht-B1a Rht-B1a</i>	<i>Rht-B1p Rht-B1p</i>	<i>Rht-B1a Rht-B1a</i>	<i>Rht-B1p Rht-B1p</i>
Высота, см	89.8±14.6a*	53.5±8.9c	103.5±5.6b	53.9±3.3c
Длина первого верхнего междоузлия, см	48.4±11.3a	26.0±7.3b	51.6±3.9c	24.6±1.9b
Длина второго верхнего междоузлия, см	17.0±3.1a	10.1±2.2b	17.7±1.2a	9.2±1.3b
Длина третьего верхнего междоузлия, см	9.5±1.6a	5.5±1.3b	12.7±1.2c	6.4±0.7d
Длина четвертого верхнего междоузлия, см	–	–	9.0±1.5a	5.0±0.7b
Длина второго нижнего междоузлия, см	6.82±1.37a	4.00±1.07b	5.11±2.35c	3.96±0.92b
Длина первого нижнего междоузлия, см	3.75±1.48a	2.81±2.09b	1.36±1.03c	1.42±0.83c
Количество междоузлий, шт.	4.6±0.5a	4.4±0.7b	5.7±0.5c	5.0±0.3d
Длина главного колоса, см	6.8±1.0d	7.0±0.8c	9.8±0.7a	9.5±0.6b
Число колосков в колосе, шт.	15.9±2.0a	16.5±1.7b	18.9±1.4c	18.2±1.6d
Плотность колоса	23.5±3.7a	23.6±2.5a	19.41±1.5b	19.15±1.5b
Масса зерна с главного колоса, г	1.32±0.45a	1.17±0.42b	1.62±0.25c	1.25±0.30d
Число зерен главного колоса, шт.	30.4±8.0a	32.4±9.5b	36.7±5.1c	40.9±7.7d
Масса 1000 зерен, г	42.9±7.0a	35.9±6.7b	44.5±5.5c	30.8±5.4d
Озерненность (число зерен в колоске)	1.91±0.02a	1.96±0.04a	1.94±0.02a	2.25±0.03b
Кхоз	0.50±0.11b	0.55±0.07a	0.37±0.04d	0.41±0.07c
Вегетативная масса растения	2.7±0.9a	2.1±0.6a	4.4±0.5a	3.0±0.5a
Дата колошения (кол-во дней от посева)	57.2±0.8a	58.9±1.8b	66.5±0.8c	73.7±1.2d

В таблице отражены средние значения ± стандартное отклонение. * Средние, отмеченные одинаковыми буквами, незначимо отличаются друг от друга по НСР_{0,05}.

сравнении длины междоузлий наибольшая абсолютная разность между растениями, гомозиготными по *Rht-B1p* и по *Rht-B1a*, была выявлена по первому верхнему междоузлию. Первое верхнее междоузлие у растений, гомозиготных по *Rht-B1p*, короче, чем у растений, гомозиготных по *Rht-B1a*, в Москве на 22.4 см (46 %), а в Краснодаре – на 27.0 см (52 %) (см. табл. 3, Приложение 3).

По результатам дисперсионного анализа показана значимость на 5 % уровне влияния аллельного состояния *Rht-B1*, региона проведения полевого опыта и их взаимодействия на количество междоузлий (см. Приложение 2). По сравнению с растениями, выращенными в Краснодаре, у растений с аллелем дикого типа *Rht-B1a* в Москве было в среднем на одно междоузлие меньше, а у низкорослых с аллелем *Rht-B1p* – в среднем на 0.6 междоузлий меньше (см. табл. 3, Приложение 3). У растений с *Rht-B1p* количество междоузлий в условиях Москвы было на 0.2 шт. меньше, чем у растений с *Rht-B1a*, а в Краснодаре – на 0.7 шт.; разница наблюдалась по четвертому верхнему междоузлию (см. табл. 3, Приложение 3). В опыте в Москве четвертое верхнее междоузлие было только у 1 % растений обоих генотипов (рис. 2). В опыте в Краснодаре четвертое верхнее междоузлие имели 69 % растений-гомозигот по *Rht-B1a*, и только 4 % гомозигот – по *Rht-B1p*.

Строение и продуктивность колоса. Результаты дисперсионного анализа данных полевого опыта показывают значимость на 5 % уровне влияния региона проведения полевого опыта и взаимодействия региона и аллельного

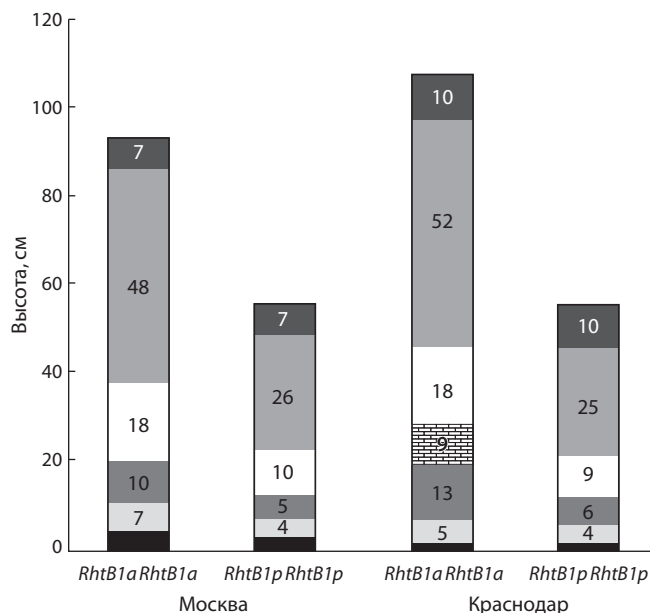


Рис. 2. Длина междоузлий соломины главного побега и главного колоса у растений твердой пшеницы B₂F_{2,3} (Chris M1/#517×LD222) в полевом опыте в Москве и Краснодаре.

По оси ординат – высота (см), по оси абсцисс – генотип (*Rht-B1a Rht-B1a* и *Rht-B1p Rht-B1p*). Сверху вниз показаны: главный колос, подколосовое (первое верхнее) междоузлие; второе верхнее междоузлие; третье верхнее междоузлие; четвертое верхнее междоузлие (только у растений *Rht-B1a Rht-B1a* в Краснодаре, на диаграмме показано текстурой); второе нижнее междоузлие; первое нижнее междоузлие.

состояния *Rht-B1* на длину колоса и число колосков, а также региона – на плотность колоса (см. Приложение 2). Колос у растений как с аллелем *Rht-B1a*, так и с аллелем *Rht-B1p*, в Краснодаре имеет значимо большую длину и число колосков и значимо меньшую плотность. Однако разница по числу колосков у низкостебельных растений с аллелем *Rht-B1p* между Москвой и Краснодаром заметно меньше (см. табл. 3, Приложение 3).

Хотя длина главного колоса у растений, гомозиготных по *Rht-B1p*, в Москве и Краснодаре значимо меньше длины главного колоса у растений, на 2 и 3 мм соответственно, однако это различие в условиях полевого опыта не играет существенной роли (см. табл. 3, Приложение 3). Число колосков у растений, гомозиготных по *Rht-B1p*, по сравнению с растениями, гомозиготными по *Rht-B1a*, было больше на 0.6 шт. (4 %) в Москве и меньше на 0.7 шт. (4 %) в Краснодаре (см. табл. 3, Приложение 3).

По результатам дисперсионного анализа показана значимость на 5 % уровне влияния аллельного состояния *Rht-B1*, региона проведения полевого опыта и их взаимодействия на массу 1000 зерен, озерненность колоска, массу и число зерен в колосе (см. Приложение 2). Растения с аллелем *Rht-B1a* в условиях опыта в Москве не отличаются от таковых в условиях опыта в Краснодаре по озерненности колоска, но существенно уступают им по числу зерен в колосе (за счет меньшего числа колосков в колосе) и массе 1000 зерен. Таким образом, масса зерен в главном колосе у растений с аллелем *Rht-B1a* на 18.4 % ниже в Москве, чем в Краснодаре. Анализ растений с аллелем *Rht-B1p* показывает, что в условиях опыта в Москве растения имеют значимо меньшую озерненность колоска и число зерен в колосе по сравнению с Краснодаром, но благодаря тому, что масса 1000 зерен у низкостебельных растений в Москве выше, чем в Краснодаре, разница по массе зерен в главном колосе между Москвой и Краснодаром почти в два раза меньше, чем между растениями с аллелем дикого типа *Rht-B1a*, и составляет 7 %. Таким образом, продуктивность колоса у растений в Краснодаре выше, чем в Москве, как у растений с аллелем *Rht-B1a*, так и с аллелем *Rht-B1p*, при этом различие между низкорослыми растениями меньше, чем между высокорослыми. Это объясняется тем, что снижение массы 1000 зерен под влиянием *Rht-B1p* более сильное в опыте в Краснодаре (до 30.8 г), чем в Москве (до 35.9 г) (см. табл. 3, Приложение 3).

Масса зерен главного колоса у растений, гомозиготных по *Rht-B1p*, была статистически значимо ниже, чем у растений, гомозиготных по *Rht-B1a*, в обоих регионах проведения полевого опыта: в Москве на 0.2 г (12 %), в Краснодаре на 0.4 г (23 %). Масса 1000 зерен у растений, гомозиготных по *Rht-B1p*, была статистически значимо ниже, чем у растений, гомозиготных по *Rht-B1a*, в обоих регионах проведения полевого опыта: в Москве на 7.0 г (16 %), в Краснодаре на 13.7 г (31 %). Число зерен в колоске (озерненность) в Москве не различалось между генотипами *Rht-B1p* и *Rht-B1a*; в Краснодаре у растений с *Rht-B1p* число зерен в колоске было на 0.3 больше, чем у растений с *Rht-B1a*. Число зерен главного колоса у растений, гомозиготных по *Rht-B1p*, было статистически значимо выше, чем у растений, гомозиготных по *Rht-B1a*,

в обоих регионах проведения полевого опыта: в Москве на 2.0 шт. (6.5 %), в Краснодаре на 4.2 шт. (11 %) (см. табл. 3, Приложение 3).

Таким образом, в результате влияния *Rht-B1p* в Москве наблюдалось увеличение числа зерен в колосе за счет увеличения числа колосков, а в Краснодаре – за счет увеличения озерненности колоска относительно растений с аллелем *Rht-B1a*. Позитивный фенотипический эффект *Rht-B1p* на число зерен с главного колоса и отрицательное его воздействие на массу зерна с колоса и массу 1000 зерен в Краснодаре примерно в два раза больше, чем в Москве (см. табл. 3, Приложение 3).

Дисперсионный анализ показал значимость на 5 % уровне влияния аллельного состояния *Rht-B1* и региона проведения полевого опыта на уборочный индекс (см. Приложение 2). Сравнение средних значений показало, что уборочный индекс растений в Москве значимо выше, чем в Краснодаре, у растений как с аллелями *Rht-B1a* (на 33 %), так и с *Rht-B1p* (на 34 %), хотя и масса зерен в колосе, и вегетативная масса растений в Москве были статистически меньше по обеим группам генотипов (см. табл. 3, Приложение 3). Таким образом, растения в полевом опыте в Москве оказались более эффективными по использованию накопленных ассимилятов.

Уборочный индекс растений, гомозиготных по *Rht-B1p*, был значимо выше, чем у растений, гомозиготных по *Rht-B1a*, в Москве на 11.3 %, в Краснодаре – на 10.1 %. При этом вегетативная масса была меньше у растений, гомозиготных по *Rht-B1p*, по сравнению с растениями, гомозиготными по *Rht-B1a*, на 22 и 30 % в Москве и Краснодаре соответственно. Таким образом, увеличение уборочного индекса произошло не за счет увеличения массы зерна (у низкостебельных растений она была меньше, чем у высокостебельных), а вследствие уменьшения непродуктивной биомассы (см. табл. 3, Приложение 3).

Сроки колошения. Дисперсионный анализ показал достоверное влияние (на 5 % уровне значимости) на сроки колошения как аллельного состояния *Rht-B1*, так и региона проведения полевого опыта, а также и их взаимодействия (см. Приложение 2). В полевом опыте в Москве растения, гомозиготные по *Rht-B1a* и *Rht-B1p*, выколашивались соответственно на 9 и 15 дней значимо раньше, чем в опыте в Краснодаре (см. табл. 3, Приложение 3).

В среднем период от посева до колошения в опыте в Москве был короче, чем в Краснодаре, что может быть обусловлено разницей в продолжительности и динамике изменения светового дня. Колошение у растений с *Rht-B1p* в опыте в Москве наступило в среднем на 2 дня позже, чем у растений с *Rht-B1a*; в опыте в Краснодаре колошение наступило в среднем на 7.2 дня позже по сравнению с растениями с *Rht-B1a* (см. табл. 3, Приложение 3).

Оценка плейотропных эффектов аллеля *Rht-B1p* методом главных компонент. В результате анализа методом главных компонент нами было выделено два фактора: фактор 1 имеет наиболее высокую корреляцию с высотой, аллельным состоянием *Rht-B1p*, массой зерен в колосе и массой 1000 зерен, сроками колошения, фактор 2 – с массой зерен в главном колосе, числом зерен в главном колосе и уборочным индексом (Кхоз) в обоих регионах проведения полевого опыта (см. Приложение 4).

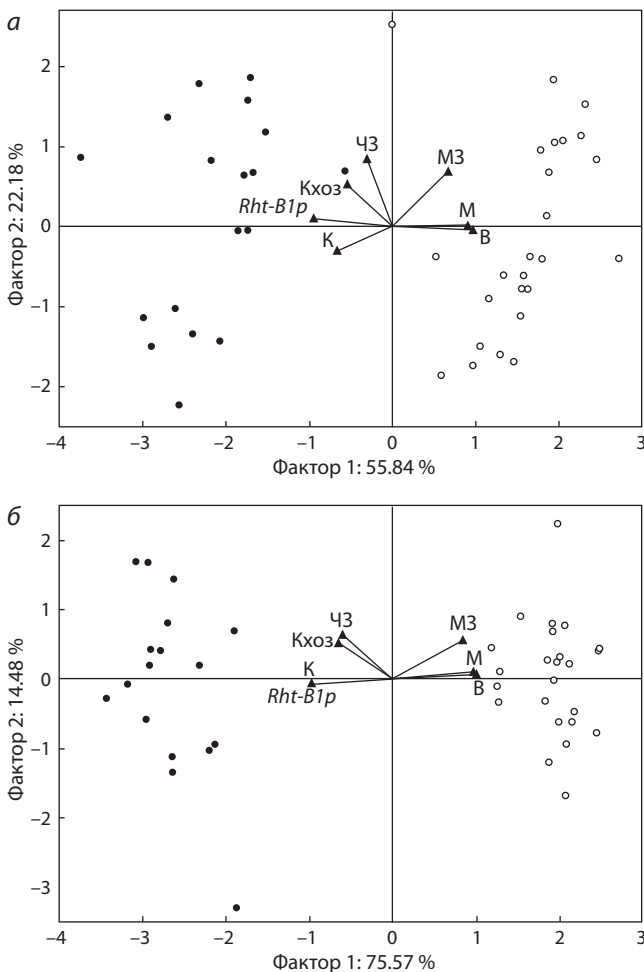


Рис. 3. Результат анализа главных компонент влияния *Rht-B1p* на основные агрономически значимые признаки у растений твердой пшеницы, по результатам полевого опыта в семьях $V_2F_{2,3}$ Chris M1/#517 × LD222 в Москве (а) и Краснодаре (б).

В – высота; МЗ – масса зерен главного колоса; ЧЗ – число зерен главного колоса; М – масса 1000 зерен; К – срок колошения (дней от посева до колошения). Черными точками обозначены семьи, несущие аллель *Rht-B1p*, белыми – семьи, несущие аллель *Rht-B1a*.

Фактор 1 объясняет 56 % и 76 % дисперсии, в то время как фактор 2 – 22 % и 15 % дисперсии в Москве и Краснодаре соответственно. Семьи сгруппировались по горизонтальной оси по высоте растений, а по вертикальной оси наблюдается тенденция группировки по элементам продуктивности. На диаграмме на рис. 3 показано, что в обоих регионах вектор *Rht-B1p* имеет направление, противоположное высоте (В) и массе 1000 зерен (М), более слабое отрицательное влияние *Rht-B1p* оказывает на массу зерен в колосе; имеет одно направление с вектором сроков колошения (К) и уборочного индекса (Кхоз) и более слабое положительное влияние *Rht-B1p* на число зерен в колосе.

Обсуждение

Аллели генов, определяющие низкостебельность, не только снижают высоту растения, но и обладают плейотропным эффектом на агрономически ценные признаки (Rebetzke et al., 2011; Liu et al., 2017; Kroupin et al., 2019). Нами было изучено фенотипическое проявление *Rht-B1p*

на одних и тех же семьях $V_2F_{2,3}$ твердой пшеницы в Москве и Краснодаре. При этом показано, что в Краснодаре влияние *Rht-B1p* на высоту, параметры зерна и период до колошения более выражено, чем в Москве. Общие тенденции воздействия аллеля *Rht-B1p* на изучаемые признаки, определенные методом дисперсионного анализа и методом главных компонент, совпадали между регионами проведения полевого опыта.

Влияние одного из наиболее распространенных аллелей, определяющих нечувствительность к гиббереллину, *Rht-B1b*, на высоту может варьировать от 10 до 25 % у мягкой пшеницы и от 30 до 40 % у твердой пшеницы по сравнению с аллелем дикого типа *Rht-B1a* (Mathews et al., 2006; Rebetzke et al., 2012; Subira et al., 2016; Liu et al., 2017). Снижение высоты растений в полевых опытах, вызванное наличием в геноме *Rht-B1p*, в наших исследованиях в опыте в Москве составило 41 %, в Краснодаре – 55 %, что сопоставимо с данными других исследований, полученных в вегетационных опытах (Ellis et al., 2004; Vazhenov et al., 2015). Сравнение данных полевого опыта с помощью дисперсионного анализа между регионами позволило выявить следующие тенденции. Растения с *Rht-B1a* в условиях полевого опыта в Краснодаре были значимо выше таковых в Москве, а с аллелем *Rht-B1p* значимо не различались. У растений с аллелем *Rht-B1a* можно предполагать разную реакцию клеток и тканей на факторы роста (в частности, гибберелловой кислоты) в различных условиях среды (освещение, температура, влажность). В то же время у растений с аллелем *Rht-B1p* эти факторы роста блокируются из-за мутации в гене, при этом нами отмечено, что растения значимо по высоте не различаются. Таким образом, в этом эксперименте различия в условиях среды не повлияли на фенотипический эффект *Rht-B1p* на высоту растений.

Снижение высоты в двух регионах происходит за счет уменьшения длины междоузлий (прежде всего, подколосового). Но при этом в Краснодаре длина междоузлий меняется непропорционально, а высота растений снижается дополнительно за счет уменьшения количества междоузлий. Явление непропорционального уменьшения подколосового междоузлия было описано у растений с аллелем *Rht-13* (Rebetzke et al., 2011), а снижение числа междоузлий в результате влияния аллелей низкостебельности в литературе практически не описано. Интересно, что этот фенотипический эффект был отмечен только в одном из регионов проведения полевого опыта. Возможно, что это связано со взаимодействием аллеля низкостебельности *Rht-B1p* с другими генами, например генов чувствительности к фотопериоду.

Влияние *Rht-B1p* на число колосков сопоставимо между регионами проведения полевого опыта по силе, но противоположно по направлению: в Москве число колосков возрастает, в Краснодаре уменьшается; общее число зерен в колосе в двух регионах возросло, что может быть обусловлено увеличением числа цветков, фертильности и завязываемостью. Меньшая разница между низкорослыми и высокорослыми растениями, выращенными в опыте в Москве и Краснодаре, по длине колоса и числу колосков в главном колосе может быть обусловлена тем, что при отсутствии внутренних факторов роста (гормоны, белки),

вызванного мутацией в аллеле *Rht-B1p*, снижается восприимчивость клеток и тканей колоса к внешним условиям (температура, освещенность, влажность).

Число зерен в колосе определяется числом колосков и озерненностью каждого колоска. В нашем полевом опыте в Краснодаре у растений с *Rht-B1p* число колосков было на 4 % меньше, чем у растений с аллелем дикого типа, а в Москве – на 4 % больше. Похожая разнонаправленность в проявлении аллеля *Rht-B1b* относительно числа колосков наблюдалась в работе (Álvarez et al., 2008): у итальянских сортов твердой пшеницы с *Rht-B1b* число колосков в колосе на 7 % больше, чем у сортов с аллелем дикого типа, а у испанских наоборот – на 2 % меньше. Число зерен в колосе в наших опытах у растений с *Rht-B1b* оказалось выше, чем у растений с аллелем дикого типа в Москве за счет увеличения числа колосков, а в Краснодаре – за счет более высокой озерненности колоска по сравнению с растениями с аллелем *Rht-B1a*. В исследовании (Álvarez et al., 2008) у низкорослых итальянских и испанских сортов число зерен также было выше, чем у высокорослых (на 20 и 13 % соответственно), что объяснялось их более высокой озерненностью (на 11 и 16 % соответственно).

Гиббереллин-нечувствительные фенотипы с аллелями низкостебельности гена *Rht*, как правило, имеют большее число зерен в колосе и меньшую массу 1000 зерен (или эквивалент этого показателя – массу одного зерна) по сравнению с растениями, несущими аллель дикого типа, что связано с меньшим количеством клеток в перикарпе (Miralles et al., 1998; Zhang et al., 2013). Как было показано (Álvarez et al., 2008), в целом у современных итальянских и испанских сортов твердой пшеницы масса одного зерна ниже, чем у стародавних, что также может быть обусловлено внедрением аллелей низкостебельности. По литературным данным, разница в массе одного зерна между низкостебельными растениями с аллелем *Rht-B1b* и растениями с аллелем дикого типа *Rht-B1a* составляет 5–10 % (Liu et al., 2017). По сравнению с *Rht-B1b*, в наших экспериментах наблюдалась большая разница: разность между растениями с *Rht-B1p* и растениями с аллелем дикого типа *Rht-B1a* составила 17 и 32 % в Москве и Краснодаре соответственно. При этом в Краснодаре отмечается более сильное снижение массы 1000 зерен, чем в Москве. В ряде исследований было продемонстрировано, что высокостебельные формы в засушливых условиях имеют преимущество перед низкостебельными в отношении массы и натуры зерна (Richards, 1992a, b; Butler et al., 2005). Таким образом, более выраженный негативный плейотропный эффект *Rht-B1p* в отношении массы 1000 зерен в полевом опыте в Краснодаре по сравнению с опытом в Москве также может быть связан с разницей в количестве осадков между регионами проведения полевого опыта (см. табл. 1).

Нами продемонстрировано, что растения с аллелем дикого типа *Rht-B1a* и с аллелем низкостебельности *Rht-B1p* в условиях опыта в Краснодаре более продуктивны, чем в Москве. Однако при этом масса 1000 зерен у растений с *Rht-B1p* в Москве была выше, чем в Краснодаре. Полученные нами данные говорят о том, что условия опыта в Москве были более благоприятны, чем в Краснодаре, для формирования отдельной зерновки и ее налива для рас-

тений, не чувствительных к гибберелловой кислоте. Это может говорить о возможности получения в условиях, близких к условиям проведения опыта в Москве, меньшего количества зерна, но более крупного.

Яровая пшеница – растение длинного дня, и в условиях длинного светового дня в Москве она переходит к колошению быстрее, чем в условиях короткого дня в Краснодаре. В Краснодаре низкостебельные растения отставали от высокостебельных на неделю, что может быть критичным в условиях наступления летней засухи. Как отмечают R. Motzo и F. Giunta (2007), *Rht-B1b* в целом никак не влияет на темпы развития у пшеницы, хотя были отдельные сообщения о том, что *Rht-B1b* ускоряет заложение соцветий. В нашем исследовании в двух регионах проведения полевого опыта результатом фенотипического проявления *Rht-B1p* стало более позднее колошение по сравнению с растениями, гомозиготными по *Rht-B1a*. Этот плейотропный эффект аллелей низкостебельности *Rht-B1* ранее не был отмечен.

Негативное влияние *Rht-B1p* на массу зерна компенсируется увеличением числа зерен в колосе и уборочного индекса. Низкостебельные сорта более устойчивы к полеганию, их можно высевать с большей нормой посева. Это позволит увеличить стеблестой на единицу площади и сбор зерна, как показывает опыт использования сортов с наиболее распространенными аллелями низкостебельности *Rht-B1b* и *Rht-B1e* (Беспалова, 2001). Кроме того, возможно комбинирование *Rht-B1p* с аллелями низкостебельности, приводящими к формированию гиббереллин-чувствительного фенотипа (Rebetzke et al., 2012; Liu et al., 2017), и аллелями генов яровизации и чувствительности к фотопериоду, в том числе и вновь выявленными (Shcherban et al., 2012; Kiseleva et al., 2016; Chen et al., 2018; Okada et al., 2019).

Таким образом, сравнение наших данных и опубликованных научных исследований показывает, что, несмотря на ряд отличий, *Rht-B1p* по своему фенотипическому эффекту сопоставим с *Rht-B1b* и может быть использован в селекции твердой пшеницы наравне с ним. *Rht-B1p* также может оказаться эффективен при создании гетерозисных гибридов твердой пшеницы. В южных регионах нашей страны внедрение *Rht-B1p* в геном твердой пшеницы может быть более перспективным, так как этот аллель не только снижает высоту растений, обеспечивая их устойчивость к полеганию, но и обладает рядом плейотропных эффектов, а именно – под его влиянием увеличивается число зерен в колосе, что потенциально может дать больший урожай, несмотря на более мелкое зерно.

Заключение

Нами изучено фенотипическое проявление аллеля низкостебельности *Rht-B1p* в семьях твердой пшеницы B₂F_{2:3} в условиях полевого опыта в Москве и Краснодаре. Показано, что растения, несущие этот аллель, обладают низкостебельным фенотипом, масса зерна в колосе была меньше по сравнению с растениями с *Rht-B1a*, количество зерен было больше за счет увеличения колосков в полевом опыте в Москве и озерненности колоска в полевом опыте в Краснодаре. Растения с аллелем низкостебельности *Rht-B1p* по сравнению с высокорослыми растениями

характеризовались более высоким уборочным индексом и более поздним сроком колошения. Более перспективным использование аллеля *Rht-B1p* может быть в южных регионах, так как этот аллель не только снижает высоту растений, обеспечивая устойчивость к полеганию, но и обладает рядом плейотропных эффектов, потенциально способных дать больший урожай.

Список литературы / References

- Беспалова Л.А. Реализация модели полукарликового сорта академика П.П. Лукьяненко и ее дальнейшее развитие. В: Пшеница и тритикале: Матер. науч.-практ. конф. «Зеленая революция П.П. Лукьяненко». Краснодар, 2001;60-71.
[Bespalova L.A. The implementation of the semi-dwarf variety model of Academician P.P. Lukyanenko and its further development. In: Wheat and Triticale: Proceedings of the Scientific-Practical Conf. "P.P. Lukyanenko: Green Revolution". Krasnodar, 2001;60-71. (in Russian)]
- Беспалова Л.А., Васильев А.В., Аблова И.Б., Филобок В.А., Худокормова Ж.Н., Давоян Р.О., Давоян Э.Р., Карлов Г.И., Соловьев А.А., Дивашук М.Г., Майер Н.К., Дудников М.В., Мироненко Н.В., Баранова О.А. Применение молекулярных маркеров в селекции пшеницы в Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012;16(1): 37-43.
[Bespalova L.A., Vasilyev A.V., Ablova I.B., Filobok V.A., Khudokormova Z.N., Davoyan R.O., Davoyan E.R., Karlov G.I., Soloviev A.A., Divashuk M.G., Mayer N.K., Dudnikov M.V., Mironenko N.V., Baranova O.A. The use of molecular markers in wheat breeding at the Lukyanenko Agricultural Research Institute. Russ. J. Genet.: Appl. Res. 2012;2(4):286-290.]
- Билова Т.Е., Рябова Д.Н., Анисимова И.Н. Молекулярные основы признака карликовости у культурных растений. Сообщение II. Della-белки, их структура и функции. С.-х. биология. 2016; 51(5):571-584. DOI 10.15389/agrobiology.2016.5.571rus.
[Bilova T.E., Ryabova D.N., Anisimova I.N. Molecular basis of the dwarfism character in cultivated plants. II. Della proteins: their structure and functions. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2016;51(5):571-584. DOI 10.15389/agrobiology. 2016.5.571rus. (in Russian)]
- Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. М.: Агропромиздат, 1985.
[Dospikhov B.A. Methodology of Field Experiment. Moscow: Agropromizdat Publ., 1985. (in Russian)]
- Кулаева О.Н. Карликовые мутанты и их роль в «Зеленой революции». Сорос. образоват. журн. 2000;6(8):18-23.
[Kulaeva O.N. Dwarf mutants and their role in "Green Revolution". Sorosovskiy Obrazovatel'nyy Zhurnal = Soros Educational Journal. 2000;6(8):18-23. (in Russian)]
- Лукьяненко П.П. Выведение новых сортов интенсивного типа. Аграр. наука. 1970;4:54.
[Lukyanenko P.P. Breeding of new intensive type varieties. Agrarnaya Nauka = Agricultural Science. 1970;4:54. (in Russian)]
- Мальчиков П.Н. Доноры генов редукции высоты растений твердой пшеницы. Достижения науки и техники АПК. 2009;9:8-11.
[Malchikov P.N. Donors of genes of a reduction of height of plants wheat durum. Dostizheniya Nauki i Tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC. 2009;9:8-11. (in Russian)]
- Мальчиков П.Н., Сидоренко В.С., Мясникова М.Г., Розова М.А., Мудрова А.А., Цыганков В.И., Мухитов Л.А., Тугарева Ф.В. Результаты селекции сортов яровой твердой пшеницы с укороченной соломиной. Зернобобовые и крупяные культуры. 2017; 4(24):97-106.
[Malchikov P.N., Sidorenko V.S., Myasnikova M.G., Rozova M.A., Mudrova A.A., Tsygankov V.I., Mukhitov L.A., Tugareva F.V. Results of breeding of durum wheat cultivars with shorted stem. Zerno-
- bobovye i Krupyanye Kultury = Legumes and Cereals. 2017;4(24): 97-106. (in Russian)]
- Миков Д.С., Давоян Э.Р., Болдаков Д.М., Зубанова Ю.С. Применение молекулярных маркеров для идентификации генов хозяйственно ценных признаков мягкой пшеницы. В: XVIII Всероссийская конференция молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». М.: Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии. 2018;49.
[Mikov D.S., Davoyan E.R., Boldakov D.M., Zubanova Yu.S. Application of molecular markers to identify genes for economically valuable traits of bread wheat. In: XVIII All-Russian Conference of Young Scientists "Biotechnology in Crop Production, Animal Husbandry, and Veterinary Medicine." Moscow: All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology. 2018;49. (in Russian)]
- Мудрова А.А., Яновский А.С. Результативность использования исходного материала при селекции сортов пшеницы твердой озимой в условиях Кубани. Зерновое хозяйство России. 2016;1: 24-27.
[Mudrova A.A., Yanovsky A.C. The results of use of the initial material during durum winter wheat breeding in the Kuban conditions. Zernovoe Khozyaystvo Rossii = Grain Economy of Russia. 2016;1: 24-27. (in Russian)]
- Самофалова Н.Е., Иличкина Н.П., Лещенко М.А., Дубинина О.А., Ионова Е.В. Достижения и проблемы в селекции твердой озимой пшеницы. Зерновое хозяйство России. 2014;6:15-22.
[Samofalova N.E., Ilichkina N.P., Leshchenko M.A., Dubinina O.A., Ionova E.V. Achievements and problems in selection of durum winter wheat. Zernovoe Khozjaistvo Rossii = Grain Economy of Russia. 2014;6:15-22. (in Russian)]
- Álvaro F., Isidro J., Villegas D., García del Moral L., Royo C. Old and modern durum wheat varieties from Italy and Spain differ in main spike components. Field Crop. Res. 2008;106(1):86-93. DOI 10.1016/j.fcr.2007.11.003.
- Bazhenov M.S., Divashuk M.G., Amagai Y., Watanabe N., Karlov G.I. Isolation of the dwarfing *Rht-B1p* (*Rht17*) gene from wheat and the development of an allele-specific PCR marker. Mol. Breed. 2015; 35(11):213. DOI 10.1007/s11032-015-0407-1.
- Bernatzky R., Tanksley S. Genetics of actin-related sequences in tomato. Theor. Appl. Genet. 1986;72(32):314-321. DOI 10.1007/BF0028 8567.
- Borojevic K., Borojevic K. The transfer and history of "reduced height genes" (*Rht*) in wheat from Japan to Europe. J. Hered. 2005;96(4): 455-459. DOI 10.1093/jhered/esi060.
- Butler J., Byrne P., Mohammadi V., Chapman P., Haley S. Agronomic performance of alleles in a spring wheat population across a range of moisture levels. Crop Sci. 2005;45(3):939. DOI 10.2135/cropsci 2004.0323.
- Chebotar G.A., Chebotar S.V., Sivolap Yu.M. DELLA mutations in plants with special emphasis on wheat. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2012;16(1): 170-177.
- Chen H., Moakhar N., Iqbal M., Pozniak C., Hucl P., Spaner D. Genetic variation for flowering time and height reducing genes and important traits in western Canadian spring wheat. Euphytica. 2016;208: 377-390. DOI 10.1007/s10681-015-1615-9.
- Chen L., Yang Y., Cui C., Lu S., Lu Q., Du Y., Su R., Chai Y., Li H., Chen F., Yu F., Hu Y. Effects of *Vrn-B1* and *Ppd-D1* on developmental and agronomic traits in *Rht5* dwarf plants of bread wheat. Field Crop. Res. 2018;219:24-32. DOI 10.1016/j.fcr.2018.01.022.
- Divashuk M., Bespalova L., Vasilyev A., Fesenko I., Puzyrnaya O., Karlov G. Reduced height genes and their importance in winter wheat cultivars grown in southern Russia. Euphytica. 2013;190(1):137-144. DOI 10.1007/s10681-012-0789-7.
- Ellis M., Rebetzke G., Chandler P., Bonnett D., Spielmeier W., Richards R. The effect of different height reducing genes on the early growth of wheat. Funct. Plant Biol. 2004;31(6):583-589. DOI 10.1071/FP03207.

- Grover G., Sharma A., Gill H.S., Srivastava P., Bains N.S. *Rht8* gene as an alternate dwarfing gene in elite Indian spring wheat cultivars. *PLoS One*. 2018;13(6):e0199330. DOI 10.1371/journal.pone.0199330.
- Hedden P. The genes of the Green revolution. *Trends Genet.* 2003; 19(1):5-9. DOI 10.1016/S0168-9525(02)00009-4.
- Heiner R.E., Elsayed F.A. Registration of MN6616M wheat germplasm (Reg. No. GP 36). *Crop Sci.* 1974;14:342. DOI 10.2135/cropsci1974.0011183X001400020065x.
- Kiseleva A., Shcherban A., Leonova I., Frenkel Z., Salina E. Identification of new heading date determinants in wheat 5B chromosome. *BMC Plant Biol.* 2016;16:35-46. DOI 10.1186/s12870-015-0688-x.
- Knopf C., Becker H., Ebmeyer E., Korzun V. Occurrence of three dwarfing *Rht* genes in German winter wheat varieties. *Cereal Res. Commun.* 2008;36(4):553-560. DOI 10.1556/CRC.36.2008.4.4.
- Komyshv E., Genaev M., Afonnikov D. Evaluation of the Seed-Counter, a mobile application for grain phenotyping. *Front. Plant Sci.* 2017;7:1990. DOI 10.3389/fpls.2016.01990.
- Kroupin P., Chernook A., Karlov G., Soloviev A., Divashuk M. Effect of dwarfing gene *Ddw1* on height and agronomic traits in spring triticale in greenhouse and field experiments in a Non-Black Earth Region of Russia. *Plants.* 2019;8(5):131. DOI 10.3390/plants8050131.
- Liu Y., Zhang J., Hu Y., Chen J. Dwarfing genes *Rht4* and *Rht-B1b* affect plant height and key agronomic traits in common wheat under two water regimes. *Field Crop. Res.* 2017;204:242-248. DOI 10.1016/j.fcr.2017.01.020.
- Mathews K., Chapman S., Trethowan R., Singh R., Crossa J., Pfeiffer W., van Ginkel M., DeLacy I. Global adaptation of spring bread and durum wheat lines near-isogenic for major reduced height genes. *Crop Sci.* 2006;46:603. DOI 10.2135/cropsci2005.05-0056 10.2135/cropsci2005.05-0056.
- McClung A.M., Cantrell R.G., Quick J.C., Gregory R.S. Influence of the *Rht1* semidwarf gene on yield, yield components, and grain protein in durum wheat. *Crop Sci.* 1986;26:1095. DOI 10.2135/cropsci1986.0011183x002600060001x.
- Miralles D., Calderini D., Pomar K., D'Ambrogio A. Dwarfing genes and cell dimensions in different organs of wheat. *J. Exp. Bot.* 1998; 49(324):1119-1127. DOI 10.1093/jxb/49.324.1119.
- Motzo R., Giunta F. The effect of breeding on the phenology of Italian durum wheats: From landraces to modern cultivars. *Eur. J. Agron.* 2007;26:462-470. DOI 10.1016/j.eja.2007.01.007.
- Okada T., Jayasinghe J., Eckermann P., Watson-Haigh N., Warner P., Hendrikse Y., Baes M., Tucker E., Laga H., Kato K., Albertsen M., Wolters P., Fleury D., Baumann U., Whitford R. Effects of *Rht-B1* and *Ppd-D1* loci on pollinator traits in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2019. DOI 10.1007/s00122-019-03329-w.
- Peng J., Richards D.E., Hartley N.M., Murphy G.P., Devos K.M., Flintham J.E., Beales J., Fish L.J., Worland A.J., Pelica F., Sudhakar D., Christou P., Snape J.W., Gale M.D., Harberd N.P. 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature.* 1999;400:256-261. DOI 10.1038/22307.
- Rebetzke G., Bonnett D., Ellis M. Combining gibberellin acid-sensitive and insensitive dwarfing genes in breeding of higher-yielding, semi-dwarf wheats. *Field Crop. Res.* 2012;127:17-25. DOI 10.1016/j.fcr.2011.11.003.
- Rebetzke G., Ellis M., Bonnett D., Condon A., Falk D., Richards R. The *Rht13* dwarfing gene reduces peduncle length and plant height to increase grain number and yield of wheat. *Field Crop. Res.* 2011; 124(3):323-331. DOI 10.1016/j.fcr.2011.06.022.
- Richards R. The effect of dwarfing genes in spring wheat in dry environments. I. Agronomic characteristics. *Aust. J. Agric. Res.* 1992a; 43(3):517-527. DOI 10.1071/ar9920517.
- Richards R. The effect of dwarfing genes in spring wheat in dry environments. II. Growth, water use and water-use efficiency. *Aust. J. Agric. Res.* 1992b;43(3):529-539. DOI 10.1071/ar9920529.
- Shcherban A., Efremova T., Salina E. Identification of a new *Vrn-B1* allele using two near-isogenic wheat lines with difference in heading time. *Mol. Breed.* 2012;29(3):675-685. DOI 10.1007/s11032-011-9581-y.
- StatSoft, Inc.: Электронный учебник по статистике. М.: StatSoft, 2012. WEB: <http://www.statsoft.ru/home/textbook/default.htm>.
- Subira J., Ammar K., Álvaro F., García del Moral L., Dreisigacker S., Royo C. Changes in durum wheat root and aerial biomass caused by the introduction of the *Rht-B1b* dwarfing allele and their effects on yield formation. *Plant Soil.* 2016;403(1-2):291-304. DOI 10.1007/s11104-015-2781-1.
- Trethowan R., Singh R., Huerta-Espino J., Crossa J., Ginkel M. van. Coleoptile length variation of near-isogenic *Rht* lines of modern CIMMYT bread and durum wheats. *Field Crop. Res.* 2001;70:167-176. DOI 10.1016/s0378-4290(00)00153-2.
- Van de Velde K., Ruelens P., Geuten K., Rohde A., van der Straeten D. Exploiting DELLA signaling in cereals. *Trends Plant Sci.* 2017; 22(10):880-893. DOI 10.1016/j.tplants.2017.07.010.
- Vikhe P., Patil R., Chavan A., Oak M., Tamhankar S. Mapping gibberellin-sensitive dwarfing locus *Rht18* in durum wheat and development of SSR and SNP markers for selection in breeding. *Mol. Breed.* 2017;37(3):28. DOI 10.1007/s11032-017-0641-9.
- Vikhe P., Venkatesan S., Chavan A., Tamhankar S., Patil R. Mapping of dwarfing gene *Rht14* in durum wheat and its effect on seedling vigor, internode length and plant height. *Crop. J.* 2019;7(2):187-197. DOI 10.1016/j.cj.2018.11.004.
- Watanabe N. Genetic collection and development of near-isogenic lines in durum wheat. *Informatsionny Vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists.* 2008; 12(4):636-643.
- Würschum T., Langer S., Longin C., Tucker M., Leiser W. A three-component system incorporating *Ppd-D1*, copy number variation at *Ppd-B1*, and numerous small-effect quantitative trait loci facilitates adaptation of heading time in winter wheat cultivars of worldwide origin. *Plant Cell Environ.* 2018a;41:1407-1416. DOI 10.1111/pce.13167.
- Würschum T., Leiser W., Langer S., Tucker M., Longin C. Phenotypic and genetic analysis of spike and kernel characteristics in wheat reveals long-term genetic trends of grain yield components. *Theor. Appl. Genet.* 2018b;131:2071-2084. DOI 10.1007/s00122-018-3133-3.
- Zaccari M., Pinthus M., Levy A. The effect of the *Rht1* gene on grain protein content in tetraploid wheat *Triticum turgidum*. *J. Cereal Sci.* 1987;6:27-32. DOI 10.1016/s0733-5210(87)80037-1.
- Zhang J., Dell B., Biddulph B., Drake-Brockman F., Walker E., Khan N., Wong D.B., Hayden M., Appels R. Wild-type alleles of *Rht-B1* and *Rht-D1* as independent determinants of thousand-grain weight and kernel number per spike in wheat. *Mol. Breed.* 2013;32(4):771-783. DOI 10.1007/s11032-013-9905-1.

ORCID ID

L.A. Bespalova orcid.org/0000-0003-3844-9682

Благодарности. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда, соглашение 17-76-20023.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 01.06.2019. После доработки 24.09.2019. Принята к публикации 25.09.2019.

Пятая международная научная конференция PlantGen2019

Формирование и изучение коллекционного генофонда ресурсных видов рода *Miscanthus* Anderss. в условиях лесостепи Западной Сибири

О.В. Дорогина¹✉, О.Ю. Васильева¹, Н.С. Нуждина¹, Л.В. Буглова¹, Е.В. Жмудь¹, Г.А. Зуева¹, О.В. Комина¹, И.С. Кубан¹, А.С. Гусар², Р.В. Дудкин³

¹ Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

³ Ботанический сад-институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

✉ e-mail: olga-dorogina@yandex.ru

В настоящее время особый интерес представляют растения, характеризующиеся высокой скоростью нарастания надземной вегетативной массы и имеющие практическое применение в качестве источника биоэтанола и целлюлозы, например, виды рода *Miscanthus* Anderss. (веерник). Цель данного исследования – молекулярно-генетическая идентификация и гистохимический анализ видов рода *Miscanthus*: *M. sacchariflorus* (Maxim.) Benth., *M. sinensis* Anderss. и *M. purpurascens* Anderss. коллекционного генофонда Центрального сибирского ботанического сада СО РАН для выявления перспективных технических сырьевых растений. Для формирования, изучения и идентификации коллекционного генофонда рода *Miscanthus* применялся мультидисциплинарный подход, заключающийся в следующем: при сборе образцов в природе использовались традиционные методы классической систематики и геоботаники (сравнительно-морфологический и фитоценологический); при выделении форм под конкретные ресурсные (биоэнергетические), технологические задачи применялись биоморфологические подходы и проводилось описание микроэкологических условий с акцентом на наименее благоприятные для произрастания факторы. Молекулярно-генетические исследования были направлены на уточнение таксономической принадлежности и анализ генетических дистанций между представителями трех видов *Miscanthus*. По результатам ISSR-анализа изученные образцы трех видов мискантуса разделились на две клады: *Sinensis* и *Sacchariflorus*, что хорошо согласуется с видовой принадлежностью большинства образцов. Исключение составили растения *M. purpurascens*_I и II, которые по данным молекулярно-генетического анализа отнесены к кладе *Sacchariflorus*, что может служить подтверждением гибридного происхождения данного вида. Клада *Sinensis* разделилась на две субклады. В субкладу I вошли образцы, произраставшие в наименее благоприятных микроэкологических условиях – на более засоленных почвах, а в субкладу II сосредоточены наиболее габитуально мощные образцы. Эти данные позволяют предположить, что среди образцов субклады I могут оказаться доноры устойчивости, а среди образцов субклады II – доноры продуктивности. Известно, что из-за повышенного содержания лигнина снижается технологическая ценность сырья. Согласно проведенному нами гистохимическому анализу, мощность механической лигнин-содержащей ткани различается у разных растений мискантуса, поэтому наиболее целесообразен селективный отбор особей, накапливающих меньше лигнина (с наименее развитой склеренхимой). Выявленные молекулярные признаки разных видов мискантуса могут быть использованы для идентификации и паспортизации перспективных форм и линий в качестве альтернативного источника биотоплива и целлюлозы.

Ключевые слова: род *Miscanthus*; ISSR-анализ; гистохимический анализ; биоморфология; микроэкология; кластерная дендрограмма; биоэтанол.

Для цитирования: Дорогина О.В., Васильева О.Ю., Нуждина Н.С., Буглова Л.В., Жмудь Е.В., Зуева Г.А., Комина О.В., Кубан И.С., Гусар А.С., Дудкин Р.В. Формирование и изучение коллекционного генофонда ресурсных видов рода *Miscanthus* Anderss. в условиях лесостепи Западной Сибири. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(7): 926-932. DOI 10.18699/VJ19.568

The formation and the study of a collection of the *Miscanthus* resource species gene pool in the conditions of the West Siberian forest steppe

O.V. Dorogina¹✉, O.Yu. Vasilyeva¹, N.S. Nuzhdina¹, L.V. Buglova¹, E.V. Zhmud¹, G.A. Zueva¹, O.V. Komina¹, I.S. Kuban¹, A.S. Gusar², R.V. Dudkin³

¹ Central Siberian Botanical Garden, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

³ Botanical Garden-Institute, FEB RAS, Vladivostok, Russia

✉ e-mail: olga-dorogina@yandex.ru

Several species of the genus *Miscanthus* Anderss. (elephant grass) characterized by a high rate of growth of the above-ground vegetative mass are currently in the focus of attention due to their high practical application as a source of bioethanol and cellulose. The main goals of this study were: (1) molecular genetic identification and (2) histochemical analysis of

the genus *Miscanthus* Anderss. species in the collection of Central Siberian Botanical Garden SB RAS in order to identify the most perspective and technically valuable individuals. To study the collection of *Miscanthus* samples, a multi-disciplinary approach was applied. To collect the samples of different species from native habitats, traditional systematic and geobotanical methods (comparative morphological and phytocenological) were used. According to the results of the ISSR-analysis, 16 samples of three *Miscanthus* species were divided into two clades: Sinensis and Sacchariflorus, the former including two subclades. For the samples of *M. purpurascens*_I and II, a hybrid origin of this species was confirmed by ISSR data. The molecular data obtained from the study allowed us to hypothesize that the samples involved in the subclade I of the Sinensis clade could be used as donors of resistance to adverse environments, and the samples of the subclade II, as donors of high biomass productivity. Based on histochemical analysis, sclerenchyma cells were characterized by the most lignin-rich thickened membranes, so the most appropriate direction in *Miscanthus* selection should be based on identification and using less lignin-containing samples.

Key words: *Miscanthus*; ISSR analysis; histochemical analysis; biomorphology; microecology; cluster dendrogram; bioethanol.

For citation: Dorogina O.V., Vasilyeva O.Yu., Nuzhdina N.S., Buglova L.V., Zhmud E.V., Zueva G.A., Komina O.V., Kuban I.S., Gусar A.S., Dudkin R.V. The formation and the study of a collection of the *Miscanthus* resource species gene pool in the conditions of the West Siberian forest steppe. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(7):926-932. DOI 10.18699/VJ19.568 (in Russian)

Введение

Среди представителей растительного мира нашей планеты *Miscanthus* (веерник) считается одним из наиболее эффективных аккумуляторов солнечной энергии (Dohleman, Long, 2009). Высокое содержание целлюлозы и значительная биомасса растений позволяют рассматривать его как перспективный альтернативный источник энергии (Lewandowski et al., 2000; McCalmont et al., 2017; Van Der Weijde et al., 2017). Физиологи и биохимики считают виды мискантуса уникальными высокопродуктивными источниками возобновляемого сырья для получения этилена и целлюлозы (Слынько и др., 2013).

Веерник является также ценной мелиоративной культурой. Высокие темпы роста растений, неприхотливость к почвенным условиям, выраженная засухоустойчивость способствовали широкому применению мискантуса для стабилизации и снижения интенсивности процессов эрозии почв (Kahle et al., 1999, 2001).

В конце прошлого века многие отечественные и зарубежные ботанические сады начали вводить в культуру *M. sacchariflorus* и *M. sinensis* в качестве декоративных злаков. Соответственно перспективам их использования в ландшафтной архитектуре разрабатывались критерии отбора *ex situ* – ритмологический и онтогенетический. В XXI в. вышеназванные виды, а также *M. × giganteus* были признаны мировым научным сообществом основными ресурсными видами для разработок в области альтернативной энергетики.

В Центральном сибирском ботаническом саду СО РАН (ЦСБС СО РАН, Новосибирск) изучение видов веерника проводилось с конца 1990-х гг. в составе коллекции газонных и декоративных злаков. В последнее время формирование и исследование коллекционного генофонда родового комплекса *Miscanthus* в соответствии с мировыми тенденциями ведется в двух направлениях: декоративном и биоэнергетическом. Поиск в природе перспективных форм и дальнейшее изучение их биоэнергетического потенциала за пределами естественного ареала потребовали разработки дополнительных критериев отбора, оценки хозяйственно-биологических признаков и свойств.

Регион наших экспедиционных работ по изучению внутривидового полиморфизма видов *Miscanthus* и поиску перспективных образцов – российский Дальний Восток,

где *M. sacchariflorus* приурочен к северным местообитаниям, а *M. sinensis* произрастает южнее. Так, в 2013 г. коллекционный генофонд пополнился образцами *M. sinensis* с п-ова Гамова (Хасанский район Приморского края). В 2017 г. *M. sacchariflorus* был собран в Чугуевском, а *M. sinensis* и, предположительно, *M. purpurascens* – в Хасанском районе Приморского края. Кроме того, собран живой материал на островах Курильской гряды – Шикотане, Кунашире, Итурупе.

В качестве критериев отбора образцов в природе нами выделены биоморфологический и микроэкологический. Во время экспедиций проведен отбор вегетативных частей (часть корневища) у растений с наиболее мощной надземной вегетативной массой. Одновременно отмечались микроэкологические условия произрастания. К неблагоприятным были отнесены: засоленная зона заплеска; участки с засушливой уплотненной почвой; открытые, подверженные ветрам вершины холмов. Растения, отличающиеся в данных местообитаниях нормальным побегообразованием, вполне могут обладать высоким адаптивным потенциалом в более суровых климатических условиях культивирования.

Накопленное в коллекционном генофонде внутривидовое и формовое разнообразие потребовало изучения генетического полиморфизма и проведения ДНК-идентификации. Целью настоящего исследования была молекулярно-генетическая идентификация и гистохимический анализ коллекционного генофонда ЦСБС СО РАН видов рода *Miscanthus* для выявления перспективных форм в качестве технических сырьевых растений.

Материалы и методы

В работе применялся комплексный мультидисциплинарный подход к формированию и паспортизации коллекционного генофонда. При выборе районов исследований и сборе образцов различных видов в природе использовались традиционные методы классической систематики и геоботаники. В естественных местообитаниях при выделении форм для решения конкретных ресурсных задач применялись биоморфологические подходы и проводилось описание микроэкологических условий. У образцов, выбранных для молекулярно-генетических исследований, учитывались фитоценотическая приуроченность, коор-

Таблица 1. Происхождение образцов трех видов *Miscanthus*, проанализированных в работе

Название образца	Место сбора, геогр. координаты
<i>M. sinensis</i>	
<i>M. sinensis_I</i>	П-ов Гамова, Хасанский район. Смотровая площадка по дороге на бухту Витязь. 42°36'24" с. ш., 131°09'56" в. д.
<i>M. sinensis_II</i>	П-ов Гамова, Хасанский район. По дороге на маяк
<i>M. sinensis_III</i>	П-ов Гамова, Хасанский район. По дороге на маяк
<i>M. sinensis_IV</i>	П-ов Гамова, Хасанский район. Бухта Витязь. 42°60'65" с. ш., 131°16'59" в. д.
<i>M. sinensis_V</i>	П-ов Гамова, Хасанский район, 2017. Плато над бухтой Витязь. 42°60'88" с. ш., 131°19'48" в. д.
<i>M. sinensis_VI</i>	П-ов Гамова, Хасанский район. Плато над бухтой Витязь. 42°61'51" с. ш., 131°17'89" в. д.
<i>M. sinensis_VII</i>	П-ов Гамова, Хасанский район, 2017. Зона заплеска в бухте Теляковского. 42°35'25" с. ш., 131°17'74" в. д.
<i>M. sinensis_VIII</i>	П-ов Гамова, Хасанский район
<i>M. sinensis_IX</i>	П-ов Гамова, Хасанский район
<i>M. sinensis_X</i>	П-ов Гамова, Хасанский район. Заправка на повороте на с. Андреевка. 42°40'33" с. ш., 131°06'17" в. д.
<i>M. sacchariflorus</i>	
<i>M. sacchariflorus_I</i>	Сихотэ-Алинь. Одна из самых северных точек ареала. Чугуевский район, не доезжая до р. Покровка. Трасса А181. 44°51'21" с. ш., 134°52'95" в. д.
<i>M. sacchariflorus_II</i>	Сихотэ-Алинь. В той же популяции
<i>M. sacchariflorus_III</i>	Сихотэ-Алинь. Окрестности национального парка «Зов тигра». 43°33'3" с. ш., 134°66'7" в. д.
<i>M. sacchariflorus_IV</i>	Сихотэ-Алинь. 43°53'24" с. ш., 134°12'57" в. д.
<i>M. purpurascens</i>	
<i>M. purpurascens_I</i>	Российский Дальний Восток. Коллекция живых растений ЦСБС (УНУ № USU 440534)
<i>M. purpurascens_II</i>	П-ов Гамова, Хасанский район, гора Туманная. 42°33'54" с. ш., 131°12'34" в. д.

динаты и высота над уровнем моря. В ряде случаев дана характеристика микроэкологических условий.

В исследование был взят материал 16 образцов трех видов: *M. sinensis*, *M. sacchariflorus* и *M. purpurascens* (табл. 1). Образцы *M. sacchariflorus* были привезены из Чугуевского района Сихотэ-Алиня, а также из окрестностей северной части национального парка «Зов тигра», территория которого включает участки Чугуевского, Ольгинского и Лазовского районов. Этот вид растет здесь на открытых ровных пространствах и залежах, являющихся вторичными сукцессиями.

Сборы *M. sinensis* и *M. purpurascens* проводились в Хасанском районе Приморского края, где виды произрастали в составе кустарниково-разнотравных группировок. Отдельные образцы были взяты в редкостойном кустарниково-разнотравном дубняке (*Quercus dentata* Thunb.) на склоне к бухте Теляковского. Основные работы выполнялись на п-ове Гамова, на абсолютных высотах от 14 до 112 м, где наблюдался широкий спектр микроэкологических условий.

Для молекулярно-генетического анализа с целью уточнения таксономического положения и идентификации образцов использовали высушенные листья растений трех видов мискантуса: *M. sinensis*, *M. sacchariflorus* и *M. purpurascens*, собранные с 15 растений, произрастающих в естественных природных популяциях (см. табл. 1). Кроме того, проанализирован образец *M. purpurascens* из Коллекции живых растений ЦСБС СО РАН (см. табл. 1, *M. purpurascens_I*, УНУ № USU 440534).

Экстракцию ДНК проводили с помощью NucleoSpin Plant II kit (Macherey and Nagel, США). Чистоту и концентрацию полученных экстрактов ДНК определяли спектрофотометрически с помощью Spectrophotometer kinetic и микрокуветы μ -cuvette (Eppendorf, Германия). Чистоту ДНК рассчитывали как соотношение величин оптической силы раствора при длине волн 260 и 280 нм.

Реакционная ПЦР-смесь объемом 25 мкл состояла из: 2.7 mM MgCl₂, 1.25 mM праймера, 0.4 mM мононуклеотидов, 1x PCR-буфера, 1.5 ед. Taq ДНК-полимеразы («Медиген», Россия) и 20–30 нг матрицы. В программу амплификации входили следующие этапы: денатурация ДНК: 90 с при 94 °С; 35 циклов амплификации: 40 с при 94 °С, 45 с при 41–58 °С (отжиг праймера) и 90 с при 72 °С; 5 мин при 72 °С. Амплификация выполнялась в С 1000 Thermal Cycler (BioRad Laboratories, США). Продукты амплификации разделяли методом электрофореза в 0.8 % агарозном геле в 1x TBE-буфере. Полученные ISSR-фрагменты окрашивали SYBR-Green («Медиген»), визуализировали с помощью системы гель-документирования Gel Doc XR+ и анализировали с помощью программного обеспечения Image Lab Software (Bio-Rad Laboratories).

Размер идентифицированных ISSR-фрагментов определяли с помощью молекулярного маркера массы («Медиген»). Каждый амплифицированный фрагмент рассматривался как доминантный маркер, и для каждого из сравниваемых образцов отмечалось его наличие (1) либо отсутствие (0).

Статистическая обработка данных, построение кластерной дендрограммы и анализ главных компонент (Principal Components, PCO) выполнены в программе PAST (Hammer et al., 2001).

Для гистохимического анализа были отобраны сухие вегетативные побеги на заключительной стадии вегетации от трех образцов (IV, V и VI) *M. sinensis* и одного образца (II) *M. purpurascens*, привезенных живыми корневищами из четырех популяций Хасанского района и Приморского края России. Последующая вегетация проходила в однотипных условиях в составе биоресурсной научной коллекции ЦСБС – USU № 440534. Для анализа брали части стебля длиной 10 см от минимальной промышленной высоты – 10 см от уровня почвы.

Дальнейшие исследования проводили в центре коллективного пользования ЦСБС СО РАН. Побеги, начиная от нижней стороны, продольно нарезали скальпелем на бруски длиной около 3 мм, помещали на замораживающий микротом и выполняли продольные сечения 60–90 мкм. Окрашивание осуществляли флороглюцином в соляной кислоте и алциановым синим в уксусной кислоте по стандартным методикам (Барыкина и др., 2004). Кроме того, проверяли возможность дифференцированной окраски этими красителями.

Микроскопирование с фотосъемкой выполняли на световом микроскопе Carl Zeiss Axio Scope A1.

Результаты

Молекулярно-генетический анализ

В исследовании было предварительно испытано 16 ISSR-праймеров, из которых для выполнения анализа в дальнейшем использовали девять (табл. 2), отличавшихся наибольшим количеством и полиморфизмом амплифицированных фрагментов и пригодных для изучения генетической изменчивости растений рода *Miscanthus* на внутри- и межвидовом уровне.

В экстрактах ДНК мискантуса, полученных из высушенных листьев, концентрация равнялась 3–24 нг/мкл. Чистота экстрактов ДНК, выраженная соотношением

Таблица 2. Характеристики ISSR-праймеров, испытанных и выбранных (выделены жирным шрифтом) для исследования генетического полиморфизма видов рода *Miscanthus*

Праймер	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'	$T_{отж.}$ °C
814	(CT) ₈ TG	51
17898A	(CA) ₆ AC	45
17898B	(CA) ₆ GT	48
17899A	(CA) ₆ AG	48
17899B	(CA) ₆ GG	42
844A	(CT) ₈ AC	44
844B	(CT) ₈ GC	42
M1	(AC) ₈ CG	56
M2	(AC) ₈ YG	58
M7	(GAC) ₅	46
M11	(CA) ₆ AR	39
M14	(GACA) ₄	47
HB10	(GA) ₆ CC	48
HB12	(CAC) ₃ GC	41
HB14	(CTC) ₃ GC	42
UBS826	(AC) ₈ C	53

A_{260}/A_{280} , варьировала в пределах от 1.25 до 1.83. Анализ межмикросателлитных участков ДНК исследованных образцов с помощью девяти ISSR-праймеров позволил идентифицировать 177 амплифицированных фрагментов длиной от 270 до 1800 п. н. о. На рис. 1 представлен ISSR-профиль образцов, полученный при амплификации с праймером 17899B.

По результатам ISSR-анализа 16 образцов мискантуса разделились на две клады: *Sinensis* и *Sacchariflorus* (рис. 2), что согласуется с видовой принадлежностью каждого

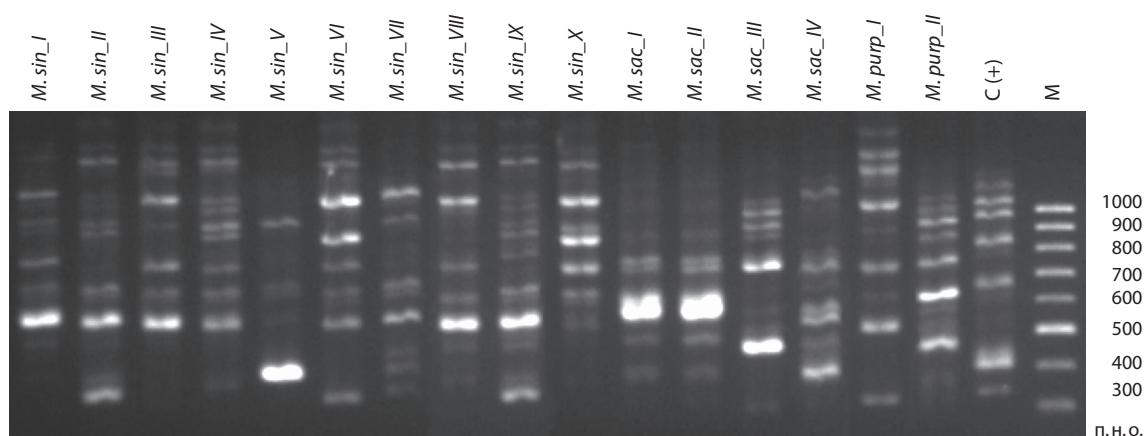


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных при амплификации ДНК трех видов *Miscanthus* и ISSR-праймера 17899B.

C(+) – положительный контроль; M – маркер веса. Обозначения образцов *Miscanthus* см. в табл. 1.

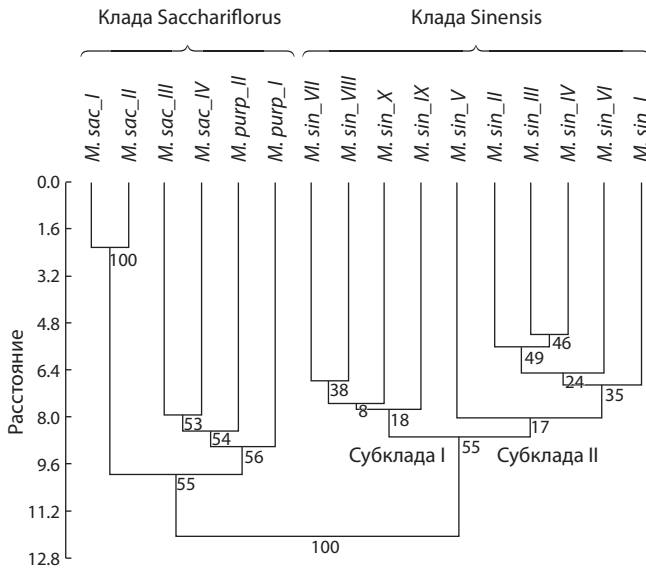


Рис. 2. Кластерная дендрограмма, отражающая величину генетических дистанций между 16 образцами трех видов *Miscanthus*.

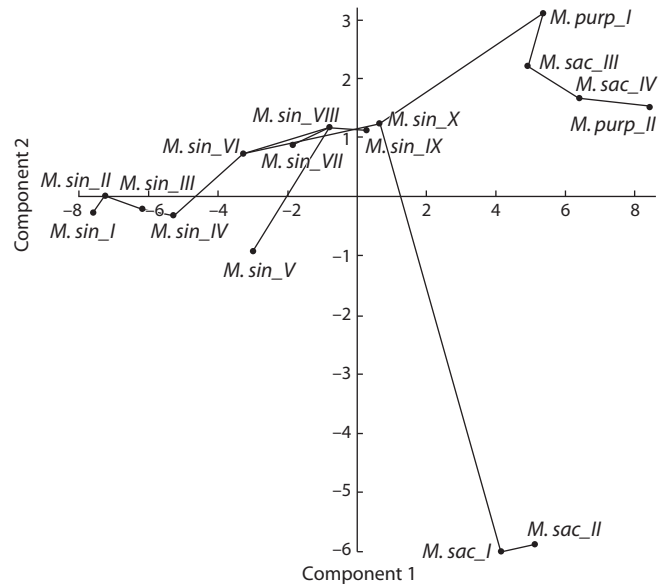


Рис. 3. Распределение 16 образцов трех видов *Miscanthus* по результатам ISSR-маркирования методом главных компонент (PCO).

образца (величина бутстреп-поддержки равна 55). При этом *M. purpurascens* I и II распределились внутри клады Sacchariflorus (см. рис. 2). Принимая во внимание предположительно гибридное происхождение вида *M. purpurascens*, мы склонны оценить полученные данные как подтверждение гипотезы (Jiang et al., 2013).

Примечательно крайне тесное генетическое родство образцов *M. sacchariflorus* I и II (см. рис. 1 и 2). Эти образцы были собраны из одной популяции и имеют почти идентичные ISSR-паттерны, что может свидетельствовать о происхождении обеих особей в результате вегетативного размножения исходного растения.

На основании анализа данных ISSR-маркирования методом главных компонент (PCO) определена дистанция между двумя группами образцов внутри клады

Sacchariflorus (рис. 3). Первая группа включает *M. sacchariflorus* I и II, вторая – *M. sacchariflorus* III, IV и *M. purpurascens* I и II.

Гистохимический анализ

С целью изучения сезонной динамики и особенностей одревеснения соломин были предприняты гистохимические исследования. Результаты химического анализа, выполненного ранее в Институте проблем химико-энергетических технологий СО РАН (г. Бийск), выявили у ряда образцов повышенное содержание лигнина, достигающее $28.1 \pm 0.5\%$ в пересчете на а.с.с. (Дорогина и др., 2018). Обнаружено, что при повышенном содержании лигнина снижается технологическая ценность сырья (Дорогина и др., 2018).

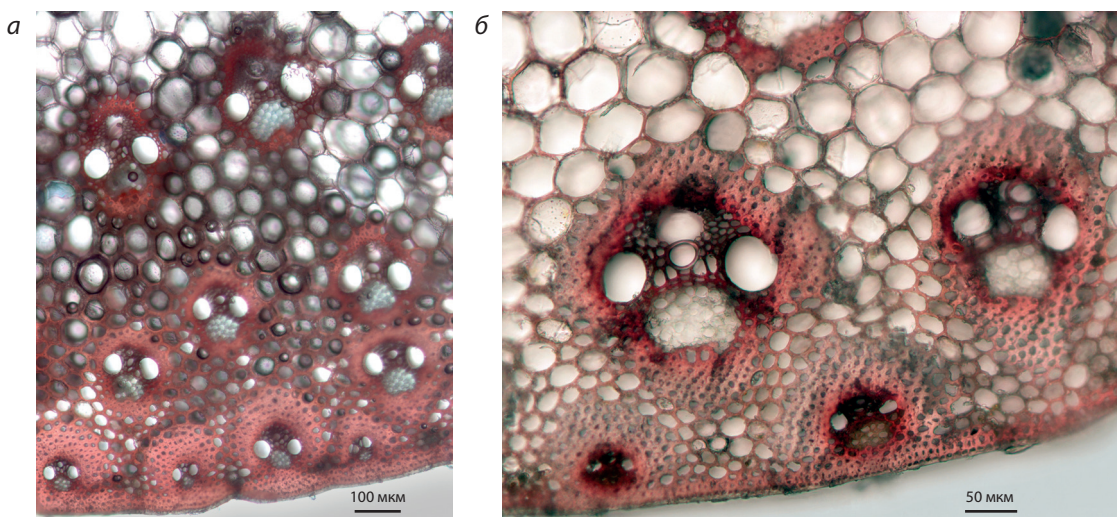


Рис. 4. Срез стебля образцов *M. sinensis*_VI (а) и *M. sinensis*_IV (б).
Окрашивание флороглюцином – альциановым синим.

Проведенный гистохимический анализ показал, что строение побегов у представителей *M. sinensis* сходно с таковым у представителей семейства Poaceae. Соломина снаружи покрыта тонким однослойным эпидермисом, присутствуют слои из радиально расположенной механической ткани с толстыми лигнифицированными оболочками клеток (рис. 4). Наиболее богаты лигнином утолщенные оболочки клеток склеренхимы, расположенные в два слоя вокруг проводящих пучков (см. рис. 4). Мощность механической лигнинсодержащей ткани различается у разных растений: у растения из популяции № 3 лигнифицированная склеренхима менее выражена по сравнению с образцом из популяции № 24 (см. рис. 4, а, б).

Обсуждение

Клада *Sinensis* разделилась на две субклады (см. рис. 2), причем в субкладу I вошли образцы, произраставшие в наименее благоприятных микроэкологических условиях. Так, образец *M. sinensis_VII* собран в бухте Теляковского в зоне заплеска или супралиторали, находящейся на границе моря и суши, выше уровня максимального прилива, что подразумевает более засоленные микроэкологические условия (рис. 5).

Образец *M. sinensis_X* был собран в техногенно нарушенном местообитании, в районе автозаправки при повороте на с. Андреевка, где возможно повышенное воздействие выхлопных газов (см. табл. 1).

Примечательно, что образцы, вошедшие в субкладу II, представляют собой наиболее габитуально мощные растения. По своим морфологическим параметрам особо выделялись *M. sinensis_V* и *M. sinensis_VI*, произраставшие в кустарниково-разнотравной группировке на плато над бухтой Витязь (рис. 6).

Заключение

Проведенный кластерный анализ позволяет предположить, что среди образцов субклады I могут оказаться растения, характеризующиеся устойчивостью и потому являющиеся донорами устойчивости, а среди образцов субклады II – доноры продуктивности. Выявленные молекулярные признаки разных видов мискантуса



Рис. 5. Местообитание *M. sinensis_VII* в зоне заплеска в бухте Теляковского.



Рис. 6. Общий вид *M. sinensis_V* и *M. sinensis_VI*, произрастающих в кустарниково-разнотравной группировке на плато над бухтой Витязь, Приморский край.

могут быть использованы для идентификации и паспортизации форм и линий, перспективных для получения экономически доступного растительного сырья, пригодного для применения в качестве экологически безопасного альтернативного варианта биотоплива.

На основании гистологического анализа побегов *M. sinensis* можно предположить, что некоторые экземпляры накапливают большое количество лигнина в сухих, завершивших вегетацию соломинах, что, вероятно, затруднит промышленную переработку. Поэтому необходимы дополнительные исследования молодых побегов для изучения динамики накопления лигнина. В связи с этим,

возможно, продуктивнее будет ранняя уборка вегетативной массы, а наиболее целесообразен селективный отбор особей, накапливающих меньше лигнина (с наименее развитой склеренхимой).

Список литературы / References

Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г., Джалилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М., 2004.
[Barykina R.P., Veselova T.D., Devyatov A.G., Dzhililova H.H., I'ina G.M., Chubatova N.V. Handbook of Botanical Microtechnique. Basics and methods. Moscow, 2004. (in Russian)]
Дорогина О.В., Васильева О.Ю., Нуждина Н.С., Буглова Л.В., Гисматулина Ю.А., Жмудь Е.В., Зуева Г.А., Комина О.В., Цыбченко Е.А. Ресурсный потенциал некоторых видов рода *Miscanthus* Anderss. в условиях континентального климата лесостепи Западной Сибири. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(5):553-559. DOI 10.18699/VJ18.394.
[Dorogina O.V., Vasilyeva O.Yu., Nuzhdina N.S., Buglova L.V., Gismatulina Yu.A., Zhmud E.V., Zueva G.A., Komina O.V., Tsybchenko E.A. Resource potential of some species of the genus *Miscanthus* Anderss. under conditions of continental climate of West Siberian forest-steppe. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(5):553-559. DOI 10.18699/VJ18.394. (in Russian)]
Слынько Н.М., Горячковская Т.Н., Шеховцов С.В., Банникова С.В., Бурмакина Н.В., Старостин К.В., Розанов А.С., Нечипоренко Н.Н., Вепрев С.Г., Шумный В.К., Колчанов Н.А., Пельтек С.Е. Биотехнологический потенциал новой технической культуры – мискантус сорт Сорановский. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013;17(4/1):765-771.
[Slynko N.M., Goryachkovskaya T.N., Shekhovtsov S.V., Bannikova S.V., Burmakina N.V., Starostin K.V., Rozanov A.S., Nechiporen-

ko N.N., Veprev S.G., Shumny V.K., Kolchanov N.A., Peltek S.E. The biotechnological potential of the new crop, miscanthus cv. Soranovskii. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2013;17(4/1):765-771. (in Russian)]
Dohleman F.G., Long S.P. More productive than maize in the Midwest: how does *Miscanthus* do it? Plant Physiol. 2009;150(4):2104-2115. DOI 10.1104/pp.109.139162.
Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. Palaeontol. Electron. 2001;4(1):9. Available at: https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf
Jiang J., Zhu M., Ai X., Xiao L., Deng G., Yi Z. Molecular evidence for a natural diploid hybrid between *Miscanthus sinensis* (Poaceae) and *M. sacchariflorus*. Plant Syst. Evol. 2013;299:1367-1377.
Kahle P., Beuch S., Boelcke B., Leinweber P., Schulten H.R. Cropping of *Miscanthus* in Central Europe: biomass production and influence on nutrients and soil organic matter. Eur. J. Agron. 2001;15:171-184.
Kahle P., Boelcke B., Zacharias S. Effects of *Miscanthus* × *giganteus* cultivation on chemical and physical soil properties. J. Plant Nutr. Soil Sci. 1999;162(1):27-32.
Lewandowski I., Clifton-Brown J.C., Scurlock J.M.O., Huisman W. *Miscanthus*: European experience with a novel energy crop. Biomass Bioenergy. 2000;19(4):209-227.
McCalmont J.P., Hastings A., McNamara N.P., Richter G.M., Robson P., Donnison I.S., Clinton-Brown J. Environmental costs and benefits of growing *Miscanthus* for bioenergy in the UK. Glob. Change Biol. Bioenergy. 2017;9(3):489-507. DOI 10.1111/gcbb.12294.
Van Der Weijde T., Kiesel A., Iqbal Y., Muylle H., Dolstra O., Vissler R.G.F., Lewandowski I., Trindade L.M. Evaluation of *Miscanthus sinensis* biomass quality as feedstock for conservation into different bioenergy products. Glob. Change Biol. Bioenergy. 2017;9:176-190. DOI 10.1111/gcbb.12355.

ORCID ID

O.V. Dorogina orcid.org/0000-0001-5729-3594

Благодарности. Исследования выполнены по комплексной программе фундаментальных научных исследований СО РАН II.1. Блок проекта «Исследование морфогенетического потенциала рода веерник (*Miscanthus* Anderss.) и возможности его использования в интродукции и селекции в условиях Западной Сибири», номер гос. регистрации АААА-А17-117120640059-4, и с использованием материалов биоресурсной научной «Коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте» USU 440534. Авторы благодарят заведующего лабораторией криптогамной биоты БСИ ДВО РАН, д.б.н. В.А. Бакалина за большую помощь при проведении экспедиционных работ и консультации по определению видовой принадлежности веерников.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 27.05.2019. После доработки 14.06.2019. Принята к публикации 23.06.2019.

Пятая международная научная конференция PlantGen2019

Особенности ресурсного вида *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack. при интродукции в Западной Сибири

Ю.А. Гисматулина¹✉, В.В. Будаева¹, Г.В. Сакович¹, О.Ю. Васильева², Г.А. Зуева², А.С. Гусар³, О.В. Дорогина²

¹ Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук, Бийск, Россия

² Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: julja.gismatulina@rambler.ru

В настоящей работе представлено научно-теоретическое обоснование и экспериментальное подтверждение выбора легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья – *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack. – с целью получения из него доброкачественных питательных сред для биосинтеза бактериальной целлюлозы. Отбор форм, перспективных для селекции, проводили в условиях интродукции Центрального сибирского ботанического сада Сибирского отделения Российской академии наук. Цель наших исследований – изучение онтогенеза, массовой доли целлюлозы и нецеллюлозных компонентов, включая лигнин, а также процессов одревеснения вегетативных (сырьевых) органов в течение сезонного развития. Сравнительный анализ особенностей онтогенеза полного типа у растений, выращенных из семян, собранных в естественных местообитаниях, показал, что образцы *M. sacchariflorus* и *M. sinensis* Anderss. отличаются продолжительным пребыванием в наиболее уязвимых онтогенетических состояниях – проростках и ювенильных растениях. Поэтому более успешное выращивание сеянцев лучше проводить в условиях защищенного грунта, а производственные площади целесообразно закладывать за счет более устойчивого вегетативного клонированного материала. При анализе химического состава растения в целом, а также листа и стебля отдельно семи урожаев *M. sacchariflorus* обнаружено, что по мере взросления плантации увеличивается массовая доля целлюлозы и уменьшается содержание нецеллюлозных компонентов. Выявлено, что вне зависимости от возраста растения в стебле мискантуса присутствует более высокая массовая доля целлюлозы, чем в листе. Массовая доля целлюлозы в целом составляет 48–53 %, что свидетельствует об актуальности изучения биосинтеза бактериальной целлюлозы на питательной среде из растений *M. sacchariflorus*. Поскольку для технологических процессов, касающихся биосинтеза бактериальной целлюлозы, высокое содержание лигнина нежелательно, нами были проведены гистохимические исследования поперечных срезов соломин для определения сезонной динамики лигнификации. На основании полученных результатов предложено при установлении конкретных сроков заготовки надземной массы в качестве технологического сырья подтверждать их данными гистохимического анализа сезонной динамики лигнификации побегов *M. sacchariflorus*. Таким образом, изучение химического состава *M. sacchariflorus*, выращенного в климатических условиях Сибири, представило перспективность его использования с целью получения глюкозного субстрата – основного компонента доброкачественных питательных сред для биосинтеза бактериальной целлюлозы.

Ключевые слова: мискантус; *Miscanthus sacchariflorus*; онтогенез; химический состав; целлюлоза; бактериальная целлюлоза; гистохимический анализ.

Для цитирования: Гисматулина Ю.А., Будаева В.В., Сакович Г.В., Васильева О.Ю., Зуева Г.А., Гусар А.С., Дорогина О.В. Особенности ресурсного вида *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack. при интродукции в Западной Сибири. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(7):933-940. DOI 10.18699/VJ19.569

Features of the resource species *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack. when introduced in West Siberia

Yu.A. Gismatulina¹✉, V.V. Budaeva¹, G.V. Sakovich¹, O.Yu. Vasilyeva², G.A. Zueva², A.S. Gusar³, O.V. Dorogina²

¹ Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies, SB RAS, Biysk, Russia

² Central Siberian Botanical Garden, SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: julja.gismatulina@rambler.ru

Here we provide a scientific justification and experimental support for the choice of easily renewable cellulosic feedstock *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack. in order to obtain high-quality nutrient broths therefrom for bacterial cellulose biosynthesis. The plant life-forms promising for breeding were screened under introduction conditions at the Central Siberian Botanical Garden, SB RAS, and this study was thus aimed at investigating the full and reduced ontogenetic patterns; cellulose and noncellulosic contents, including lignin; and duraminization of vegetative (feedstock source) organs throughout the seasonal development. The full ontogenetic patterns of the plants grown from

seeds that had been collected in native habitats were compared to show that *M. sacchariflorus* and *M. sinensis* Anders. accessions are distinguished by longer being at the most vulnerable developmental stages: seedlings and plantlets. Hence, it is preferable to cultivate seedlings on protected ground, and plantations are advisable to establish with more stable cloned vegetative material. The chemical compositions of the whole plant, leaf and stem separately, from seven *M. sacchariflorus* harvests were examined to reveal a rise in cellulose content and a drop in noncellulosic content with plantation age. The *Miscanthus* stem was found to contain more cellulose than the leaf, regardless of the plant age. The overall cellulose content was 48–53 %, providing a rationale for studies of bacterial cellulose biosynthesis in a *M. sacchariflorus*-derived nutrient medium. Since high lignin content is undesirable for technological processes concerned with biosynthesis of bacterial cellulose, we performed histochemical assays of transverse sections of the culms to monitor the seasonal course of lignification. Our results suggest that the specific time limits for harvesting the aboveground biomass as a feedstock be validated by histochemical data on the seasonal course of lignification of *M. sacchariflorus* sprouts. To sum up, the examined chemical composition of *M. sacchariflorus* grown in the Siberian climate conditions demonstrated its prospects as a source of glucose substrate, the basic component of good-quality nutrient media for biosynthesis of bacterial cellulose.

Key words: *Miscanthus*; *Miscanthus sacchariflorus*; ontogeny; chemical composition; cellulose; bacterial cellulose; histochemical analysis.

For citation: Gismatulina Yu.A., Budaeva V.V., Sakovich G.V., Vasilyeva O.Yu., Zueva G.A., Gusar A.S., Dorogina O.V. Features of the resource species *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack. when introduced in West Siberia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(7):933-940. DOI 10.18699/VJ19.569 (in Russian)

Введение

В настоящее время весьма актуальны задачи по поиску экологически безопасных и экономически доступных источников энергии для многоцелевого использования (Jones, Walsh, 2001; Шумный и др., 2010; Дорогина и др., 2018; Schroder et al., 2018). Особый интерес представляют многолетние виды травянистых растений с высокой скоростью роста, характеризующиеся высокими значениями нарастания надземной вегетативной массы, так как они имеют ряд экологических преимуществ перед однолетними (Zhang et al., 2011; Iqbal et al., 2015). Наряду с известными видами в практику активно внедряются новые растения, в том числе мискантус.

Мискантус, *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack., – многолетняя экологически эффективная злаковая культура с высоким приростом биомассы, на уровне 10–15 т/га/год на протяжении 15–25 лет (Слынько и др., 2013; Булаткин и др., 2015, 2017; Капустянчик и др., 2016; Gismatulina, Budaeva, 2017). Для мискантуса характерен особый, С4-путь фотосинтеза, что позволяет ему оставаться одним из самых эффективных аккумуляторов солнечной энергии на планете и обеспечивать высокую ежегодную продуктивность даже на неплодородных землях (Слынько и др., 2013; Анисимов и др., 2016; Morandi et al., 2016; Xue et al., 2017).

В связи с поиском непищевых источников углерода для получения уникальных продуктов микробиального синтеза *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack. мог бы стать перспективным сырьем для получения доброкачественных питательных сред и конкретно для биосинтеза бактериальной целлюлозы (БЦ). Особенности этого вида, выращенного в условиях Западной Сибири, являются способность накапливать биомассу в краткосрочную вегетативную фазу в суровом континентальном климате с коротким засушливым летом, морозостойкость, устойчивость к вредителям и заболеваниям и отсутствие необходимости в удобрении плантации во время вегетативной фазы.

Лесостепь Западной Сибири относится к зоне рискованного земледелия для многих сельскохозяйственных культур, поэтому при подборе методов исследования

акцент должен быть сделан на изучении комплексной устойчивости, продуктивности (урожай плодов, семян, вегетативной массы) и качестве растительного сырья. Кроме того, учитывая короткий вегетационный период, для растений семенного и вегетативного происхождения необходимо оценить скорость прохождения различных онтогенетических состояний с выявлением наиболее уязвимых.

В рамках родового комплекса *Miscanthus*, изучаемого в Центральном сибирском ботаническом саду (ЦСБС) СО РАН и Институте проблем химико-энергетических технологий (ИПХЭТ) СО РАН, особый интерес представляет биоэнергетический вид *M. sacchariflorus*. Поскольку введение его в культуру и выделение форм, перспективных для селекции, проводятся за пределами естественного ареала и климатической зоны, наши исследования были сосредоточены на изучении онтогенеза полного и сокращенного типа, содержании целлюлозы и нецеллюлозных компонентов, а также проведении гистохимических исследований процессов одревеснения вегетативных (сырьевых) органов в процессе сезонного развития.

Настоящая работа посвящена изучению онтогенеза, химического состава и процессов одревеснения вегетативных органов *M. sacchariflorus* с целью получения доброкачественных питательных сред и последующего микробиологического синтеза бактериальной целлюлозы.

Материалы и методы

В качестве объекта в исследовании использованы особи *M. sacchariflorus* (Maxim.) Hack. и для сравнения в процессе онтогенеза – особи *M. sinensis* Anderss. Растения этих двух видов были отобраны с территории Дальнего Востока России и интродуцированы в ЦСБС с 2012 г. Качественные признаки онтогенетических состояний описывали с помощью шкалы периодизации онтогенеза (Уранов, 1967, 1975; Ценопопуляция растений, 1976, 1988), а также работ, посвященных изучению онтогенеза злаков (Онтогенетический атлас..., 1997, 2013).

Химический состав был определен в семи урожаях мискантуса: в целом растении, листе и стебле отдельно. Для установления химического состава мискантус еже-

годно собирали (срезали ножницами надземную часть растения с отступом 10–15 см от земли) в период с 3-го по 8-е октября в течение семи лет (с 2011 по 2017 гг.). После сбора урожая жизнеспособные корневища оставались в почве зимовать. Таким образом, плантация была заложена один раз в 2011 г., а сбор урожая производили многократно (через год после среза предыдущего урожая). Перед определением химического состава мискантуса сырье было высушено на воздухе до влажности не более 8 % и измельчено ножницами до размера фракции 5–10 мм.

Определение химического состава целлюлозы по Кюршнеру (обработка навески пробы этанольным раствором азотной кислоты); нецеллюлозных компонентов – пентозанов (нагревание навески пробы с раствором соляной кислоты и выявление отогнанного фурфурола спектрофотометрическим методом) проводили по стандартным методикам анализа растительного сырья (Оболенская и др., 1991); зольности (сжигание навески пробы в фарфоровом тигле и прокаливание остатка в муфельной печи); кислотонерастворимого лигнина – по TAPPI T222 om-83; жировосковой фракции (экстрагирование навески пробы хлористым метиленом, выпаривание экстракта и сушка нелетучего остатка) – по TAPPI 204 cm-97. Влажность образцов сырья определяли на анализаторе влажности OHAUS MB-25 (США). Химический состав сырья был выявлен с использованием приборной базы Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, Бийск).

Для проведения гистохимического анализа были отобраны вегетативные побеги в конце августа и сухие – на заключительной стадии вегетации в конце сентября – от растений, привезенных ранее из природных популяций живыми корневищами из трех популяций Чугуевского и Хасанского районов Приморского края. Их последующая вегетация проходила в однотипных условиях в составе биоресурсной научной коллекции ЦСБС – USU № 440534. Для анализа брали части стебля от минимальной промышленной высоты – 10 см от уровня почвы длиной 10 см.

Дальнейшие исследования осуществляли в центре коллективного пользования ЦСБС СО РАН. Побеги продольно нарезали скальпелем на бруски около 3 мм, помещали на замораживающий микротом и выполняли продольные сечения 60–90 мкм, окрашивали флороглюцином по стандартной методике (Барыкина и др., 2004). Микроскопирование с фотосъемкой выполняли на световом микроскопе Carl Zeiss Axio Scope A1.

Результаты

Исследовали особенности онтогенеза *M. sacchariflorus* в сравнении с особями другого вида – *M. sinensis*, поскольку в естественных местообитаниях в Приморском крае эти виды представлены различными биоморфами. Изучение становления жизненной формы в онтогенезе в новых условиях произрастания позволяет разработать комплекс приемов возделывания, определить оптимальные сроки заготовки сырья.

Поскольку литературные данные об особенностях онтогенеза рода *Miscanthus* отсутствуют, нами впервые проведено подробное изучение онтогенеза особей *M. sacchariflorus* в сравнении с особями *M. sinensis*. Установлено, что латентный период *M. sacchariflorus* представлен семенами, находящимися в состоянии вынужденного неглубокого покоя. Зерновки очень мелкие, длиной от 2.3 до 2.6 мм, узкоэллипсоидальные, свободные, зародыш в два раза короче семени.

Прегенеративный период. При посеве в лабораторных условиях всходы появляются на третьи-четвертые сутки. Энергия прорастания и всхожесть свежесобранных (в естественных местообитаниях) семян очень высокие: 80.0–85.5 %. Проростки представлены первичным побегом и зародышевым корешком. Через семь дней возникает второй лист. Дальнейшее образование очередных листьев приостанавливается, но при этом активно развивается корневая система, состоящая из придаточных корней. В состоянии проростка растения находятся очень длительное время: до 2.5 мес.

У ювенильных растений теряется связь с зерновкой. Первичный побег и корни сохраняются и развиваются. Зеленых ассимилирующих листьев на-

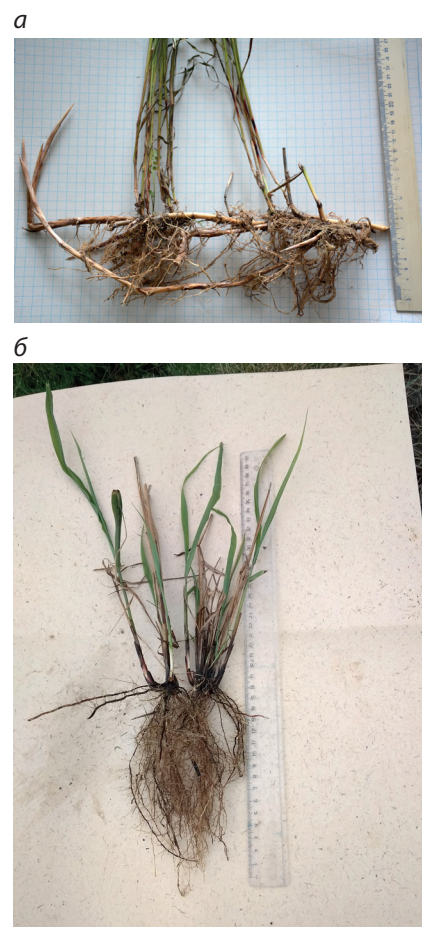


Рис. 1. Фрагменты корневищ имматурных растений: а – *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack.; б – *Miscanthus sinensis* Anders.

считывается 9–10, они более мелкие и узкие, чем у взрослых растений. У *M. sinensis* чешуевидные листья у основания побега плотно прижаты. Продолжительность онтогенетического состояния – более двух месяцев. Следует отметить, что проростки и ювенильные растения до начала вегетационного периода развивались в теплице.

Побеговая и корневая системы имматурных растений (рис. 1, а, б) приобретают переходные признаки от ювенильных к взрослым. Тип листьев также переходный, они активно растут, увеличиваются длина и ширина. Основным маркерным диагностическим признаком данного состояния у злаков – растения переходят в фазу кущения. Нижние листья отклоняются от стебля, принимая горизонтальное положение, отмирают, вырастают внутривлагалищные боковые побеги. У *M. sacchariflorus* побегообразова-

ние идет более активно (см. рис. 1, а), что в дальнейшем дает ему преимущество в накоплении вегетативной сырьевой массы, развиваются боковые побеги в числе 2–3, а у растений *M. sinensis* – лишь по одному боковому побегу (см. рис. 1, б). Продолжительность этого онтогенетического состояния 4–4.5 мес.

Виргинильные растения. Диаметр дернины *M. sinensis* (15–20 см) значительно уступает диаметру *M. sacchariflorus* (25–30 см). Стебли, листья и корни – взрослого типа. Боковые побеги развиваются быстро, догоняя по высоте главный побег. Нижние листья главного побега отмирают, к этому моменту зеленых ассимилирующих листьев насчитывается 7–9. Отмечается становление жизненной формы, типичной для взрослого растения: многолетний летнезеленый, травянистый, короткокорневищный, рыхло-дерновинный, симподиально нарастающий поликарпик с полурозеточным прямостоячим побегом у *M. sinensis* и многолетний летнезеленый, травянистый, тонко-длиннокорневищный, симподиально нарастающий поликарпик с удлиненным прямостоячим побегом у *M. sacchariflorus*. Генеративных побегов у большинства растений нет. В сентябре к концу вегетационного периода первого года жизни у растений образуется от 8 до 20 вегетативных побегов. Среднее количество побегов на растение – более 10, средняя высота растений – 57.5 см. Корневая система хорошо развита, длина ее превышает 15 см.

Единичные образцы перешли в генеративный период. Однако на молодых генеративных растениях формировалось лишь по одному генеративному побегу, на которых семена не вызрели. Этот факт был установлен нами ранее для веерника в условиях континентального климата лесостепи Западной Сибири, так как не хватало тепла для формирования семян в октябре, в отличие от условий муссонного климата юга Приморья.

Таким образом, изучение особенностей онтогенеза полнотипа у растений, выращенных из семян, собранных в естественных местообитаниях, показало, что образцы двух видов веерника отличаются продолжительным пребыванием в наиболее уязвимых онтогенетических состояниях – проростков и ювенильных растений.

По экспертным оценкам, в ближайшем будущем сырье, характеризующееся массовостью, доступностью, ежегодной возобновляемостью, низкой себестоимостью, высокой экологической эффективностью и стабильностью при хранении, станет основным для ряда биотехнологических производств (Mussatto et al., 2010). Мискантус полностью соответствует этим критериям.

Изучение химического состава *M. sacchariflorus*, выращенного в условиях Сибири, позволит оценить целесообразность его переработки для биосинтеза БЦ. Бактериальная целлюлоза – органический наноматериал, синтезируемый внеклеточно микроорганизмами в статических (на поверхности питательной среды) или динамических (при перемешивании) условиях. Описаны разнообразные питательные среды для культивирования БЦ (Goelzer et al., 2009; Hong et al., 2012; Chen et al., 2013; Sakovich et al., 2017; Velázquez-Riaño, Bojacá, 2017; Revin et al., 2018; Hussain et al., 2019), преимуществом среди них обладают отходы пищевой промышленности и аграрного хозяйства. Мировым трендом считается обоснование использования

низкостоимостных питательных сред для синтеза БЦ. Но мискантус в списках потенциальных питательных сред – достаточно редкое явление. Химический состав семи урожаев *M. sacchariflorus* – целого растения, листа и стебля отдельно – приведен в таблице.

Известно, что содержание химических элементов в различных органах растений изменчиво и зависит от вида и возраста растения, региональных климатических особенностей, сезонного развития и лесорастительных условий местопроизрастаний (Торлопова, Робакидзе, 2012). Массовый урожай мискантуса также зависит от многих факторов: генотипа, типа почвы, используемых питательных веществ, возраста посадки, биоклиматического местоположения и погоды в течение сельскохозяйственного сезона (Brosse et al., 2012).

Работы по изучению зависимости химического состава от возраста растения на примере трех урожаев (возрастом плантации 2, 3 и 4 года) для 244 генотипов мискантуса установили отсутствие существенных изменений по всем компонентам, кроме зольности (Allison et al., 2011; Arnoult, Brancourt-Hulmel, 2015). Проведены также исследования по изучению зависимости химического состава от морфологической части растения (Кроткевич, 1983 и др.; Bergs et al., 2019). Однако эти работы проводились в умеренных климатических условиях, а не в условиях резко континентального климата Сибири. Поэтому изучение влияния возраста плантации и морфологической части на химический состав мискантуса, выращенного в Сибири, остается актуальным.

На примере семи урожаев *M. sacchariflorus* (см. таблицу) установлена зависимость химического состава не только от возраста растения, но и от его морфологической части. Целое растение мискантуса характеризуется химическим составом в следующих диапазонах: массовая доля целлюлозы по Кюршнеру 41.7–53.6 %; зольность 3.2–6.3 %; массовая доля кислотонерастворимого лигнина 20.1–23.8 %; массовая доля пентозанов 18.6–25.3 %; массовая доля жировосковой фракции 2.8–5.7 %. Полученные результаты согласуются с зарубежными данными для различных генотипов мискантуса в части основных компонентов – целлюлозы и лигнина (Jones, Walsh, 2001; Somerville et al., 2010; Brosse et al., 2012). Содержание жировосковой фракции превышает зарубежные данные: 0.5–0.6 % (Villaverde et al., 2009).

Согласно приведенным источникам, основные компоненты мискантуса – целлюлоза, формирующая каркас растения (40–60 %); гемицеллюлоза – матричное вещество, состоящее из различных полисахаридов (20–40 %); лигнин, обеспечивающий жесткость и целостность структуры (10–30 %). Нами установлено, что по мере взросления плантации увеличивается массовая доля целлюлозы и уменьшается содержание нецеллюлозных компонентов. Значительный рост массовой доли целлюлозы прослеживается с первого (41.7 %) по пятый (53.6 %) год жизни плантации – практически на 12 %. После пятилетнего возраста плантации значительное увеличение массовой доли целлюлозы в растениях не наблюдается, 50 % содержание целлюлозы впоследствии стабильно сохраняется на протяжении двух лет (урожаи мискантуса возрастом плантации 6 и 7 лет). Таким образом, установлено, что максимальной

Химический состав семи урожаев *M. sacchariflorus*: целого растения, листа и стебля отдельно

Год урожая, возраст плантации	Морфологическая часть мискантуса	Массовая доля компонентов*, %				
		целлюлоза по Кюршнеру	зола	лигнин	пентозаны	ЖВФ**
2011 г., 1 год	Целое растение	41.7	6.3	22.2	25.3	5.7
	Лист	38.7	11.5	23.9	20.7	7.7
	Стебель	48.1	3.0	20.5	27.9	4.3
2012 г., 2 года	Целое растение	44.5	6.2	23.8	23.6	4.8
	Лист	40.5	8.7	25.3	20.7	6.1
	Стебель	50.2	2.1	18.4	26.6	4.0
2013 г., 3 года	Целое растение	47.8	4.6	21.1	25.1	2.8
	Лист	43.7	7.5	23.9	20.8	4.6
	Стебель	50.7	2.0	17.2	27.4	1.8
2014 г., 4 года	Целое растение	53.1	5.9	22.0	21.0	5.0
	Лист	43.3	9.2	23.6	20.3	6.3
	Стебель	55.7	2.1	14.9	23.0	2.7
2015 г., 5 лет	Целое растение	53.6	3.6	20.1	18.6	3.6
	Лист	43.6	6.7	22.8	17.0	6.1
	Стебель	56.6	2.2	16.0	20.9	2.1
2016 г., 6 лет	Целое растение	50.1	3.2	22.3	20.4	4.5
	Лист	43.8	9.9	26.6	19.5	6.7
	Стебель	55.9	1.7	18.9	21.5	2.5
2017 г., 7 лет	Целое растение	50.2	5.1	23.1	20.4	4.9
	Лист	45.2	7.5	27.2	19.5	5.7
	Стебель	53.6	1.5	18.7	22.5	3.1

* В пересчете на а.с.с., ** ЖВФ – жировосковая фракция.

массовой долей целлюлозы характеризуется мискантус с пятилетней плантации (53.6 %).

Среди нецеллюлозных компонентов высокое содержание лигнина оказывает отрицательное влияние при переработке для биосинтеза БЦ. Поэтому необходимо контролировать содержание лигнина, обеспечивающего жесткость и целостность структуры. В связи с этим нами были проведены гистохимические исследования поперечных срезов соломин для определения сезонной динамики лигнификации.

Представители рода *Miscanthus* относятся к однодольным растениям семейства Poaceae, у большинства из которых сосудисто-волокнистые пучки закрытого типа разбросаны по всей толще стебля. Строение стебля верника ближе к таковому у ржи и ячменя – паренхимные клетки и проводящие пучки расположены ближе к периферии (рис. 2, а).

Между пучками находится основная паренхимная ткань. А под эпидермисом по периферии отчетливо видно интенсивно розовое кольцо склеренхимы, придающей прочность соломине, в том числе и за счет постепенного одревеснения. Именно процесс лигнификации создает трудности при дальнейшей переработке сырья и получении целлюлозы. На рис. 2, б клетки и ткани, имеющие розовую окраску различной интенсивности, окрашены

флороглюцином, определяющим степень одревеснения. Каждый сосудисто-волокнистый пучок состоит из сосудов ксилемы, окруженных древесинной паренхимой, а также флоэмы и склеренхимных волокон. Обкладка пучка также имеет высокую степень одревеснения (см. рис. 2, б).

Однако следует отметить, что эти срезы были сделаны по завершении вегетационного периода, когда процесс лигнификации выражен наиболее сильно во всех тканях. Исследования, проведенные на более ранней стадии заготовки сырья, показали, что одревеснение соломины находится в начальной стадии (см. рис. 2, в).

Обсуждение

Изучение особенностей онтогенеза полного типа у растений, выращенных из семян, собранных в естественных местообитаниях, выявило, что образцы двух видов верника отличаются продолжительным пребыванием в наиболее уязвимых онтогенетических состояниях – проростках и ювенильных растениях. Из этого следует вывод, что семенной способ размножения представляет интерес для работы с селекционным материалом в условиях высоко-агрофона, включая выращивание сеянцев в условиях защищенного грунта. Производственные и полупроизводственные площади должны закладываться за счет более устойчивого вегетативного клонированного материала.

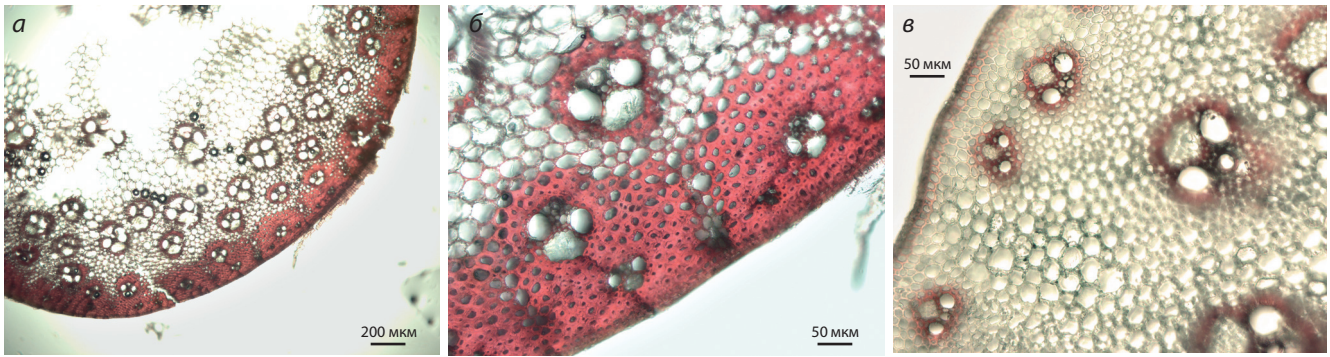


Рис. 2. Анатомическое строение поперечного среза стебля *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack.: а – типичное (общий вид); б – в конце сентября; в – в конце августа.

Анализ химического состава семи урожаев *M. sacchariflorus* – целого растения, листа и стебля отдельно – показал, что по мере взросления плантации увеличивается массовая доля целлюлозы и уменьшается содержание нецеллюлозных компонентов в биомассе. После пятилетнего возраста плантации роста массовой доли целлюлозы не наблюдается. Содержание целлюлозы от 50.2 до 53.6 % определяет данный вид мискантуса как перспективное целлюлозосодержащее сырье. Следовательно, для переработки целесообразно использовать зрелое растение, так как выход целлюлозы из него будет выше. Плантации мискантуса возрастом 4–7 лет характеризуются высокой массовой долей целлюлозы и наиболее предпочтительны для различных химических и биотехнологических трансформаций.

Увеличение массовой доли целлюлозы в целом растении в течение пяти лет связано с тем, что плотность всходов мискантуса год от года становится больше и доля листа, содержащего меньшее количество целлюлозы, в целом уменьшается. Выявлено, что независимо от возраста плантации более высокая массовая доля целлюлозы наблюдается в стебле мискантуса (48.1–56.6 %), чем в листе (38.7–45.2 %). Несмотря на ранние рекомендации для различных генотипов мискантуса (Brosse et al., 2012) переработки растения в целом (без удаления листа), нами установлено, что целесообразнее использовать стебель мискантуса для получения более высокого выхода целлюлозы (и/или) глюкозы. Преимущественное содержание целлюлозы в стебле злаковых культур описано для соломы пшеницы, овса, ячменя и риса в (Lengyel, Morvay, 1973; Sun, 2010).

В результате гистохимического анализа лигнина выявлено, что поскольку срезы были сделаны по завершении вегетационного периода, то процесс лигнификации выражен наиболее сильно во всех тканях. Данные более ранней заготовки сырья (см. рис. 2, в) показывают, что одревеснение соломины находится в начальной стадии в августе. Поскольку гидротермические условия вегетационных периодов в пункте интродукции значительно варьируют по годам, нами впервые предложено при определении конкретных сроков заготовки надземной массы в качестве технологического сырья ежегодно проводить гистохимический анализ сезонной динамики лигнификации побегов веерника.

Заключение

Изучение химического состава *M. sacchariflorus*, выращенного в климатических условиях Сибири, показало перспективность его использования с целью получения глюкозного субстрата – основного компонента доброкачественных питательных сред для биосинтеза бактериальной целлюлозы. Это предложение является инновационным и исключает использование пищевых углеродных источников для микробиологического синтеза.

Полученные результаты свидетельствуют об актуальности изучения биосинтеза бактериальной целлюлозы на питательной среде из *M. sacchariflorus* – наукоемкого инженерного решения в технологии бактериальной целлюлозы. Мискантус с воспроизводимым высоким значением содержания целлюлозы на уровне 48–53 % обладает значительным сырьевым потенциалом для производства бактериальной целлюлозы. Необходимо провести дальнейшие исследования для максимального решения ряда ключевых технологических вопросов. Они включают разработку рентабельных режимов предварительной химической и ферментативной обработки мискантуса с высоким выходом глюкозы, гарантирующим эффективное применение этой глюкозной питательной среды для синтеза бактериальной целлюлозы.

Список литературы / References

- Анисимов А.А., Хохлов Н.Ф., Тараканов И.Г. Мискантус (*Miscanthus* spp.) в России: возможности и перспективы. Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. 2016; 12:3-5.
- [Anisimov A.A., Khokhlov N.F., Tarakanov I.G. *Miscanthus* (*Miscanthus* spp.) in Russia: opportunities and prospects. *Novye i Netraditsionnye Rasteniya i Perspektivy ikh Ispolzovaniya = New and Unconventional Plants and their Application Prospects*. 2016;12:3-5. (in Russian)]
- Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г., Джалилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М., 2004.
- [Barykina R.P., Veselova T.D., Devyatov A.G., Dzhaliylova Kh.Kh., Il'ina G.M., Chubatova N.V. *Handbook of Botanical Microtechniques. Basics and Methods*. Moscow, 2004. (in Russian)]
- Булаткин Г.А., Митенко Г.В., Гурьев И.Д. Энергетическая и экологическая эффективность выращивания растительной биомассы мискантуса китайского в ЦФО России. Использование и охрана природных ресурсов в России. 2015;6(144):39-45.

- [Bulatkin G.A., Mitenko G.V., Guriev I.D. Energy and ecological efficiency of growing Chinese silver grass (*Miscanthus sinensis* Anders.) in central federal district of Russia. Ispolzovanie i Okhrana Prirodnikh Resursov v Rossii = Natural Resource Management and Conservation in Russia. 2015;6(144):39-45. (in Russian)]
- Булаткин Г.А., Митенко Г.В., Гурьев И.Д. Альтернативная энергетика: новые ресурсы биотоплива из растительного сырья. Теоретическая и прикладная экология. 2017;2:88-92.
- [Bulatkin G.A., Mitenko G.V., Guriev I.D. Alternative power engineering: vegetation materials as new resources. Teoreticheskaya i Prikladnaya Ekologiya = Theoretical and Applied Ecology. 2017;2:88-92. (in Russian)]
- Дорогина О.В., Васильева О.Ю., Нуждина Н.С., Буглова Л.В., Гисматулина Ю.А., Жмудь Е.В., Зуева Г.А., Комина О.В., Цыбченко Е.А. Ресурсный потенциал некоторых видов рода *Miscanthus* Anders. в условиях континентального климата лесостепи Западной Сибири. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(5):553-559. DOI 10.18699/VJ18.394.
- [Dorogina O.V., Vasilyeva O.Yu., Nuzhdina N.S., Buglova L.V., Gismatulina Yu.A., Zhmud E.V., Zueva G.A., Komina O.V., Tsybchenko E.A. Resource potential of some species of the genus *Miscanthus* Anders. under conditions of continental climate of West Siberian forest-steppe. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(5):553-559. (in Russian)]
- Капустянчик С.Ю., Лихенко И.Е., Данилова А.А. Продуктивность мискантуса сорта Сорановский первого года вегетации и дыхательная активность почвы. Перм. аграр. вестник. 2016;4(16):82-87.
- [Kapustyanchik S.Yu., Likhenko I.E., Danilova A.A. Productivity of *Miscanthus* variety Soranovskiy of the first year of vegetation and soil respiratory activity. Permskiy Agrarnyy Vestnik = Perm Agrarian Journal. 2016;4(16):82-87. (in Russian)]
- Кроткевич П.Г., Шумейко К.И., Волошина Л.А., Нестерчук Е.Н., Петрунь И.И. Морфологические особенности и химический состав *Miscanthus sinensis* Anders. как сырья для целлюлозно-бумажной промышленности. Раст. ресурсы. 1983;19(3):321-323.
- [Krotkevich P.G., Shumejko K.I., Voloshina L.A., Nesterchuk E.N., Petrun' I.I. Morphological features and chemical composition of *Miscanthus sinensis* Anders. as a feedstock for pulp and paper industry. Rastitelnye Resursy = Plant Resources. 1983;19(3):321-323. (in Russian)]
- Оболенская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы. М., 1991.
- [Obolenskaya A.V., El'nitskaya Z.P., Leonovich A.A. Laboratory Course on the Chemistry of Wood and Cellulose. Moscow, 1991. (in Russian)]
- Онтогенетический атлас лекарственных растений. Йошкар-Ола: МарГУ, 1997.
- [Ontogenetic Atlas of Medicinal Plants. Yoshkar-Ola: Mari State University, 1997. (in Russian)]
- Онтогенетический атлас растений. Йошкар-Ола: МарГУ, 2013.
- [Ontogenetic Atlas of Plants. Yoshkar-Ola: Mari State University, 2013. (in Russian)]
- Слынько Н.М., Горячковская Т.Н., Шеховцов С.В., Банникова С.В., Бурмакина Н.В., Старостин К.В., Розанов А.С., Нечипоренко Н.Н., Вепрев С.Г., Шумный В.К., Колчанов Н.А., Пельтек С.Е. Биотехнологический потенциал новой технической культуры – мискантус сорт Сорановский. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013;17(4/1):765-771.
- [Slynko N.M., Goryachkovskaya T.N., Shekhovtsov S.V., Bannikova S.V., Burmakina N.V., Starostin K.V., Rozanov A.S., Nechiporenko N.N., Veprev S.G., Shumny V.K., Kolchanov N.A., Peltek S.E. The biotechnological potential of the new crops, *Miscanthus* s.v. Soranovskii. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2013;17(4/1):765-771. (in Russian)]
- Торлопова Н.В., Робакидзе Е.А. Химический состав хвои сосны обыкновенной в условиях аэротехногенного загрязнения Сыктывкарского лесопромышленного комплекса. Сиб. экол. журнал. 2012;19(3):415-422.
- [Torloпова N.V., Robakidze E.A. Chemical composition of pine needles under the influence of aerial technogenic pollution from the Syktyvkar Timber Industry Complex. Sibirskiy Ekologicheskii Zhurnal = Siberian Journal of Ecology. 2012;5(3):307-313. (in Russian)]
- Уранов А.А. Онтогенез и возрастной состав популяций. Онтогенез и возрастной состав популяций цветковых растений. М., 1967; 3-8.
- [Uranov A.A. Ontogenesis and age composition of populations. Ontogenesis and the Age Composition of Flowering Plant Populations. Moscow, 1967;3-8. (in Russian)]
- Уранов А.А. Возрастной спектр фитоценопопуляций как функция времени и энергетических волновых процессов. Биол. науки. 1975;2:7-34.
- [Uranov A.A. Age spectrum of phytocenopopulations as a function of time and energy wave processes. Biologicheskie Nauki = Biological Sciences. 1975;2:7-34. (in Russian)]
- Ценопопуляции растений: Основные понятия и структура. М., 1976.
- [Plant Cenopopulations: Basic Concepts and Structure. Moscow, 1976. (in Russian)]
- Ценопопуляции растений: Очерки популяционной биологии. М., 1988.
- [Plant Cenopopulations: Population Biology Essays. Moscow, 1988. (in Russian)]
- Шумный В.К., Колчанов Н.А., Сакович Г.В., Пармон В.Н., Вепрев С.Г., Нечипоренко Н.Н., Горячковская Т.Н., Брянская А.В., Будаева В.В., Железнов А.В., Железнова Н.Б., Золотухин В.Н., Митрофанов Р.Ю., Розанов А.С., Сорокина К.Н., Слынько Н.М., Яковлев В.А., Пельтек С.Е. Поиск возобновляемых источников целлюлозы для многоцелевого использования. Информационный вестник ВОГиС. 2010;14(3):569-578.
- [Shumny V.K., Kolchanov N.A., Sakovich G.V., Parmon V.N., Veprev S.G., Nechiporenko N.N., Goryachkovskaya T.N., Bryanskaya A.V., Budaeva V.V., Zheleznov A.V., Zheleznova N.B., Zolotukhin V.N., Mitrofanov R.Yu., Rozanov A.S., Sorokina K.N., Slynko N.M., Yakovlev V.A., Peltek S.E. Search for renewable sources of multi-purpose cellulose. Informatsionny Vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists. 2010;14(3):569-578. (in Russian)]
- Allison G.G., Morris C., Clifton-Brown J., Lister S.J., Donnison I.S. Genotypic variation in cell wall composition in a diverse set of 244 accessions of *Miscanthus*. Biomass Bioener. 2011;35(11):4740-4747. DOI 10.1016/j.biombioe.2011.10.008.
- Arnoult S., Brancourt-Hulmel M. A review on *Miscanthus* biomass production and composition for bioenergy use: Genotypic and environmental variability and implications for breeding. BioEnergy Res. 2015;8:502-526. DOI 10.1007/s12155-014-9524-7.
- Bergs M., Völkerling G., Kraska T., Pude R., Tung X.D., Kusch P., Monakhova Yu., Konow C., Schulze M. *Miscanthus* × *giganteus* stem versus leaf-derived lignins differing in monolignol ratio and linkage. Int. J. Mol. Sci. 2019;20(5):1200. DOI 10.3390/ijms20051200.
- Brosse N., Dufour A., Meng X., Sun Q., Ragauskas A. *Miscanthus*: a fast-growing crop for biofuels and chemicals production. Biofuels Bioprod. Bioref. 2012;6(5):580-598. DOI 10.1002/bbb.1353.
- Chen L., Hong F., Yang X.X., Han S.F. Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism. Bioresour. Technol. 2013;135:464-468. DOI 10.1016/j.biortech.2012.10.029.
- Gismatulina Yu.A., Budaeva V.V. Chemical composition of five *Miscanthus sinensis* harvests and nitric-acid cellulose therefrom. Ind. Crop. Prod. 2017;109:227-232. DOI 10.1016/j.indcrop.2017.08.026.
- Goelzer F.D.E., Faria-Tischer P.C.S., Vitorino J.C., Sierakowski M.R., Tischer C.A. Production and characterization of nanospheres of

- bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed rice bark. Mater. Sci. Eng. 2009;29:546-551. DOI 10.1016/j.msec.2008.10.013.
- Hong F., Guo X., Zhang S., Han S., Yang G., Jonsson L.J. Bacterial cellulose production from cotton-based waste textiles: enzymatic saccharification enhanced by ionic liquid pretreatment. Bioresour. Technol. 2012;104:503-508. DOI 10.1016/j.biortech.2011.11.028.
- Hussain Z., Sajjad W., Khan T., Wahid F. Production of bacterial cellulose from industrial wastes: a review. Cellulose. 2019;26(5):2895-2911. DOI 10.1007/s10570-019-02307-1.
- Iqbal Y., Gauder M., Claupen W., Graeff-Honninger S., Lewandowski I. Yield and quality development comparison between miscanthus and switchgrass over a period of 10 years. Energy. 2015;89:268-276. DOI 10.1016/j.energy.2015.05.134.
- Jones M.B., Walsh M. Miscanthus: For Energy and Fibre. London: James & James, 2001.
- Lengyel P., Morvay S. Chemie und Technologie der Zellstoffherstellung. Budapest: Akademiai Kiado, 1973.
- Morandi F., Perrin A., Østergård H. *Miscanthus* as energy crop: Environmental assessment of a miscanthus biomass production case study in France. J. Clean. Prod. 2016;137:313-321. DOI 10.1016/j.jclepro.2016.07.042.
- Mussatto S.I., Dragone G., Guimaraes P.M.R., Silva J.P.A., Carneiro L.M., Roberto I.C., Vicente A., Domingues L., Teixeira J.A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. Biotechnol. Adv. 2010;28:817-830. DOI 10.1016/j.biotechadv.2010.07.001.
- Revin V.V., Liyaskina E.V., Nazarkina M.I., Bogatyreva A.O., Shchankin M.V. Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products. Braz. J. Microbiol. 2018;49(1):151-159. DOI 10.1016/j.bjm.2017.12.012.
- Sakovich G.V., Skiba E.A., Budaeva V.V., Gladysheva E.K., Ale-shina L.A. Technological fundamentals of bacterial nanocellulose production from zero prime-cost feedstock. Dokl. Biochem. Biophys. 2017;477(1):357-359. DOI 10.1134/S1607672917060047.
- Schroder P., Beckers B., Daniels S., Gnädinger F., Maestri E., Marmiroli N., Menchd M., Millan R., Obermeier M.M., Oustriere N., Persson T., Poschenrieder C., Rineau F., Rutkowska B., Schmid T., Szulc W., Witters N., Sæbø A. Intensify production, transform biomass to energy and novel goods and protect soils in Europe – A vision how to mobilize marginal lands. Sci. Total Environ. 2018;616-617:1101-1123. DOI 10.1016/j.scitotenv.2017.10.209.
- Somerville C., Youngs H., Taylor C., Davis S.C., Long S.P. Feedstocks for lignocellulosic biofuels. Science. 2010;329:790-792. DOI 10.1126/science.1189268.
- Sun R.C. Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels: Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicelluloses and Cellulose. Oxford: Elsevier, 2010.
- Velásquez-Riaño M., Bojacá V. Production of bacterial cellulose from alternative low-cost substrates. Cellulose. 2017;24:2677-2698. DOI 10.1007/s10570-017-1309-7.
- Villaverde J.J., Domingues R.M.A., Freire C.S.R., Silvestre A.J.D., Pascoal Neto C., Ligerio P., Vega A. *Miscanthus × giganteus* extractives: a source of valuable phenolic compounds and sterols. J. Agric. Food Chem. 2009;57:3626-3631.
- Xue S., Lewandowski I., Kalinina O. Miscanthus establishment and management on permanent grassland in southwest Germany. Ind. Crop. Prod. 2017;108:572-582.
- Zhang Y., Li Y., Jiang L., Tian C., Li J., Xiao Z. Potential of perennial crop on environmental sustainability of agriculture. Proc. Environ. Sci. 2011;10:1141-1147.

ORCID ID

Y.A. Gismatulina orcid.org/0000-0001-5480-7449
V.V. Budaeva orcid.org/0000-0002-1628-0815
G.V. Sakovich orcid.org/0000-0001-6208-2329
O.V. Dorogina orcid.org/0000-0001-5729-3594

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-19-01054) с использованием материалов биоресурсной научной «Коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте» USU 440534.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 18.06.2019. После доработки 25.07.2019. Принята к публикации 09.08.2019.

Пятая международная научная конференция PlantGen2019

Влияние условий выращивания различных генотипов гуара (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) на свойства камеди семян

И.В. Кручина-Богданов¹, Е.В. Мирошниченко², Р.А. Шаухаров², Е.Н. Кантемирова², М.А. Головина², К.М. Абдуллаев², А.В. Балашов³, Е.В. Русинова³, П.Г. Русинов³, Е.К. Потокина²✉

¹ ООО «АМТ», Санкт-Петербург, Россия

² Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

³ ООО «НИКА Петротэк», Екатеринбург, Россия

✉ e-mail: e.potokina@vir.nw.ru

Галактоманнан (камедь) – растворимый в воде полисахарид, используется в качестве гелеобразующего агента в жидкостях, в том числе в нефте- и газодобывающей промышленности для гидравлического разрыва пласта. Самым эффективным источником этого ценного растительного сырья (гуаровой камеди) являются семена гуара (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.), новой для Российской Федерации сельскохозяйственной культуры. Хотя за последние годы были достигнуты определенные успехи в селекции сортов гуара, адаптированных к условиям РФ, вопрос о наиболее подходящем регионе возделывания этой культуры остается открытым. Цель проведенных исследований заключалась в том, чтобы установить, в какой степени регион и технология выращивания гуара могут влиять на основные показатели конечного целевого продукта – содержание и вязкость камеди в семенах различных генотипов гуара. Для решения этого вопроса в 2017–2018 гг. были проведены эколого-географические испытания образцов гуара коллекции ВИР на опытных станциях института, климатические условия которых отвечают критериям теплообеспеченности этой культуры. Для сравнительного изучения свойств камеди в семенах различных генотипов гуара впервые предложен ускоренный лабораторный метод получения вытяжек камеди для вискозиметрической оценки. Разработанный метод позволяет проводить ускоренный скрининг исходного материала для селекции сортов гуара, перспективных с точки зрения использования камеди из их семян в нефтедобывающей промышленности. В результате лабораторной оценки содержания и вязкости камеди, содержащейся в семенах 13 образцов гуара, обнаружено, что выход и свойства камеди одного и того же сорта сильно варьируют в зависимости от условий произрастания. Эксперимент 2018 г. по выращиванию одного и того же набора 13 образцов на Волгоградской, Астраханской, Дагестанской и Кубанской опытных станциях ВИР показал, что максимальные показатели удельной вязкости получены для семян репродукции Астраханской ОС ВИР, где гуар выращивался на поливе. С другой стороны, максимальное процентное содержание камеди в семенах у всех образцов гуара было зафиксировано при их выращивании в условиях Волгоградской ОС ВИР на капельном орошении. Результаты дополнительного тестирования образцов порошковой формы гуаровой камеди, полученной из семян сортов отечественной селекции, позволяют сделать вывод о пригодности продукта для использования в качестве гелеобразователя в процессах интенсификации добычи нефти методом гидравлического разрыва пласта. Данный опыт является уникальным для России. Ключевые слова: гуар; камедь; содержание и вязкость; методика оценки; сорта; экологические испытания; регионы выращивания.

Для цитирования: Кручина-Богданов И.В., Мирошниченко Е.В., Шаухаров Р.А., Кантемирова Е.Н., Головина М.А., Абдуллаев К.М., Балашов А.В., Русинова Е.В., Русинов П.Г., Потокина Е.К. Влияние условий выращивания различных генотипов гуара (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) на свойства камеди семян. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(7):941-948. DOI 10.18699/VJ19.570

Impact of growing conditions on the gum properties of different genotypes of guar (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.)

I.V. Kruchina-Bogdanov¹, E.V. Miroshnichenko², R.A. Shaukharov², E.N. Kantemirova², M.A. Golovina², K.M. Abdullaev², A.V. Balashov³, E.V. Rusinova³, P.G. Rusinov³, E.K. Potokina²✉

¹ AMT, Ltd., St. Petersburg, Russia

² Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

³ NIKA PetroTech, Ekaterinburg, Russia

✉ e-mail: e.potokina@vir.nw.ru

Galactomannan (gum), a water-soluble polysaccharide, is widely used as a gelling agent in liquids, including in the oil and gas industry for hydraulic fracturing. The most effective source of this valuable plant material is seeds of guar (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.), a legume crop new for Russia. Although in recent years progress has been made in the selection of guar varieties adapted to the conditions of the Russian Federation, the question of the most appropriate region for the cultivation of this crop remains open. The purpose of the study was to investigate how a region and technology of guar cultivation can affect the main indicators of the final target product: the content and viscosity of guar gum extracted from the seeds of various guar genotypes. To understand this, ecogeographical tests of 13 guar accessions from the VIR collec-

tion were conducted at the experimental stations of the Vavilov Institute (VIR), where climatic conditions correspond to the temperature requirements of the crop. To compare the properties of gum extracted from the seeds of various genotypes, a fast-tracked laboratory method was suggested allowing gum extracts to be obtained for assessing their viscosity. The method allows fast screening of the breeding material and selecting guar genotypes with beneficial properties of guar gum which are in demand by the oil industry. Applying the fast laboratory method for assessing the properties of gum in seeds of 13 guar varieties showed that the content and viscosity of gum of the same variety vary greatly depending on growing conditions. The same set of 13 guar accessions was grown in 2018 at the Volgograd, Astrakhan, Dagestan and Kuban VIR experimental stations. As a result, the maximum viscosity values were obtained for the seeds reproduced at the Astrakhan region, where the guar was grown on irrigated lands. On the other hand, the maximum gum content in the seeds of all accessions was recorded when they were grown in the Volgograd region. The results showed that the guar gum extracted from seeds of guar plants grown in the Russian Federation can be used as a gelling agent in the processes of intensification of oil production by the method of hydraulic fracturing. This experience is new to the Russian Federation. Key words: *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.; guar; method for assessing guar gum content and viscosity; guar varieties; ecological testing; regions of propagation.

For citation: Kruchina-Bogdanov I.V., Miroshnichenko E.V., Shaukharov R.A., Kantemirova E.N., Golovina M.A., Abdullaev K.M., Balashov A.V., Rusinova E.V., Rusinov P.G., Potokina E.K. Impact of growing conditions on the gum properties of different genotypes of guar (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(7):941-948. DOI 10.18699/VJ19.570 (in Russian)

Введение

Семена гуара (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.), новой для Российской Федерации сельскохозяйственной культуры, являются источником ценного растительного сырья – гуаровой камеди. Последняя представляет собой полисахарид галактоманнан, способный значительно увеличивать вязкость водного раствора, даже в малых концентрациях. Галактоманнан, наряду с целлюлозой, крахмалом, ксиллоглюканом, ксантановой камедью, декстраном, относится к экономически наиболее востребованным полисахаридам. Он содержится в эндосперме многих растений, и хотя в качестве возможного источника получения этого вещества рассматриваются несколько видов, для промышленного получения растительной камеди используют только три вида бобовых – гуар, рожковое дерево (*Ceratonia siliqua* L.) и цезальпиния колючая, или тара (*Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze) (Thombare et al., 2016). При этом гуаровая камедь добывается наиболее простым и дешевым способом, что вызывает повышенный интерес к гуару как сельскохозяйственной культуре (McArdle et al., 2011).

Гуар относится к редкой группе бобовых растений, семена которых содержат эндосперм и лишены крупных семядолей, присущих большинству зернобобовых культур (Hanson, 2015). В клеточных стенках эндосперма гуара, а также в межклеточном пространстве этой запасующей ткани концентрируются включения галактоманнана, который служит для питания развивающегося растения. Используются все части семени гуара, и получаемое из них сырье имеет специфическое название: семенная кожура (churi) покрывает две половинки эндосперма семени гуара (splits), в клетках которого запасается галактоманнан. Эндосперм, в свою очередь, скрывает под собой две семядоли с зародышем (kotma).

Технология получения порошковой камеди из семян гуара является ноу-хау различных коммерческих производств. Общая схема этого процесса сводится к нескольким этапам: семена разделяют на две половинки (split), подсушивают их при высокой температуре, после чего семядоли с зародышем отделяются от эндосперма. Отделенные доли эндосперма нагревают, в результате чего семенная кожура размягчается и затем отделяется от

эндосперма с помощью различных устройств – механических шлифовальных машин, шаровых и истирающих мельниц. Как только эндосперм освобожден от других тканей семени, его размалывают в муку, из которой галактоманнан экстрагируют и несколько раз пересаживают этанолом, а затем высушивают. Полученный таким образом продукт – гуаровая камедь – представляет собой однородный порошок белого цвета, похожий по текстуре на пшеничную муку. Основные показатели качества порошковой камеди – размер частиц и вязкость водного раствора, причем для оценки последней обычно используют вискозиметр Брукфильда (Abidi et al., 2015). Уровень вязкости связан с концентрацией и молекулярно-массовым распределением фракции галактоманнана, которые могут сильно варьировать в зависимости от сорта и условий выращивания растений гуара (Ellis et al., 2001). Отсюда следует, что правильный подбор регионов и условий возделывания этой культуры на территории РФ является таким же важным фактором для его успешной интродукции, как и выведение новых сортов.

Во всех регионах РФ основной лимитирующий фактор для культуры гуара – это сумма эффективных температур за период вегетации. Из результатов анализа температурных и влажностных параметров агроклиматических зон РФ следует, что для выращивания гуара на территории РФ подходит ряд районов Крыма, Краснодарского края, Дагестана, Ставропольского края, Ростовской области и Нижнего Поволжья, где сумма эффективных температур воздуха $>10\text{ }^{\circ}\text{C}$ составляет не менее 3400–3500 $^{\circ}\text{C}$ (Лебедев и др., 2017).

Хотя в России селекция гуара началась сравнительно недавно, в 2018 г. в Государственном реестре селекционных достижений уже было зарегистрировано пять сортов, допущенных к возделыванию на территории РФ. Однако вопрос о наиболее подходящем регионе возделывания этой культуры остается открытым, в том числе из-за отсутствия информации о качестве гуаровой камеди, получаемой из семян разной географической репродукции. Для решения этой задачи в ВИР им. Н.И. Вавилова в 2017–2018 гг. проводились эколого-географические испытания образцов коллекции гуара на опытных станциях, климатические условия которых отвечают критериям теплообеспечен-

ности культуры. Цель испытаний состояла прежде всего в том, чтобы установить, в какой степени регион и технология выращивания могут влиять на основные показатели конечного целевого продукта – содержание и вязкость камеди в семенах различных генотипов гуара.

В настоящее время не существует единого общепринятого стандарта или арбитражного метода непосредственной оценки перспективности семян различных генотипов гуара как сырья для получения камеди той или иной заданной вязкости. Во всех опубликованных работах описаны два независимых процесса: 1) выделение и очистка камеди из семян для оценки выхода последней и 2) приготовление раствора полученной камеди с измерением удельной вязкости (Serqueira et al., 2009; Eldirany et al., 2015). Эти методики, как правило, выполняются разными исполнителями и разделены во времени. В нашей работе впервые предложен метод оценки качества семян гуара по показателям как выхода, так и удельной вязкости камеди в одну экспресс-стадию, что открывает возможность для обширного скрининга сортов компактными доступными средствами.

Материал и методы

В эколого-географическое изучение были включены образцы, перспективные с точки зрения их хозяйственно ценных характеристик по результатам первичной оценки образцов коллекции в Кубанском филиале ВИР в 2017 г. В 2018 г. во все географические пункты изучения был отправлен один и тот же набор образцов единой репродукции Кубанского филиала ВИР с числом семян, достаточным для изучения на площади 10 м² (табл. 1).

Определение содержания и вязкости камеди из семян гуара. Массовый скрининг проводили согласно экспресс-методике лабораторной оценки содержания и вязкости камеди в семенах гуара. Среднюю пробу семян, отобранную в количестве 2.0 г (точная навеска) помещали в широкий лабораторный стакан вместимостью 150 см³. Семена в стакане заливали 15 см³ дистиллированной воды и помещали в автоклав. Разваривание осуществляли путем выдерживания замоченных семян в течение 30 мин при температуре 121 °С.

После отделения замочной воды разваренные семена помещали в химический стакан с 50 см³ дистиллированной воды и перемешивали на магнитной мешалке в течение 2 ч при комнатной температуре. Полученный экстракт отделяли центрифугированием при 7000 мин⁻¹ в течение 15 мин. Отделенный осадок повторно экстрагировали в 50 см³ дистиллированной воды на магнитной мешалке в течение 1 ч при комнатной температуре. Процедуру центрифугирования и экстракции повторяли еще один раз, причем осветленные растворы после центрифугирования объединяли, получая конечный объем экстракта 140–160 см³. При помощи мерного цилиндра измеряли полученный конечный объем экстракта камеди с точностью 1 мл.

Динамическую вязкость полученного осветленного раствора измеряли при комнатной температуре на ротационном вискозиметре Брукфильда. Используемый шпindel – L2, скорость вращения 100 мин⁻¹. Величину вязкости регистрировали в течение 40 мин, отмечая на-

Таблица 1. Список образцов гуара коллекции ВИР, участвующих в экологических испытаниях 2018 г.

№ п/п	Номер в каталоге ВИР	Откуда получен материал	Название
1	52568	Аргентина	Без названия
2	52569	Пакистан	Без названия
3	52571	Крым	Без названия
4	52572	Краснодарский край	Вавиловский 130
5	52573	»	Кубанский
6	52574	»	Вектор
7	52575	»	Синус
8	52580	Ростовская область	Без названия
9	52581	»	Без названия
10	52584	США	Santa Cruz
11	52585	»	Kinman
12	52586	»	Lewis
13	52742	Краснодарский край	Кубанский юбилейный

чалное и конечное значение. В растворе после измерения вязкости определяли концентрацию «сырой камеди» как содержание сухих веществ согласно ГОСТ 33977–2016.

За окончательный результат принимали значения вязкости в конце измерений. По измеренным значениям вязкости и концентрации камеди рассчитывали показатель приведенной вязкости:

$$\eta_{пр} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 c},$$

где η и η_0 – вязкость раствора камеди и растворителя, мПа·с, соответственно (для воды $\eta_0 = 1$ мПа·с); c – концентрация камеди в экстракте, %.

Содержание камеди в зерне (в %) рассчитывали как отношение количества камеди, перешедшего в раствор, к исходной массе семян:

$$ГК = \frac{c \cdot \rho \cdot V}{a},$$

где ρ – плотность экстракта камеди (при концентрации камеди менее 0.6 % следует принять $\rho = 1$ г/см³); V – измеренный конечный объем экстракта камеди, см³; a – навеска семян, взятая для экстракции, г.

Изучение производственных свойств образцов порошковой гуаровой камеди, включая стабильность и параметры работы в качестве гелеобразователя для жидкости гидроразрыва пласта, проводили в лаборатории ООО «НИКА-Петротэк». Использовали общепринятый в нефтедобывающей промышленности метод измерения вязкости 0.48 % раствора гуара. Этот раствор обычно называют «гелем 40 фунтов», так как он содержит 40 фунтов гуара, смешанного с 1000 галлонов воды и при оборотах шпинделя 511 с⁻¹ дает вязкость 30–45 мПа·с, в зависимости от качества гуаровой камеди (Abidi et al., 2015).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 12.

Результаты

Эколого-географические посевы образцов гуара в филиалах ВИР

Испытания единого набора 13 образцов гуара (см. табл. 1) проводились в 2018 г. в четырех филиалах ВИР: на Кубанской опытной станции (ОС) (пос. Ботаника, Гулькевичский район Краснодарского края), Астраханской ОС (г. Астрахань), Волгоградской ОС (г. Волгоград), Дагестанской ОС (г. Дербент). Особенности агроклиматических условий этих четырех географических пунктов приведены ниже.

Кубанская ОС. Посев был произведен в последней декаде мая. Орошение не применялось. В период всходов и далее с 28 мая по 26 июля наблюдались аномально высокие температуры воздуха – от 30 до 37.6 °С, при полном отсутствии осадков и сильных суховеях, которые привели к иссушению почвенного горизонта на глубину 20–25 см. Температура почвы на глубине 20 см в первой декаде июня составила 21.8 °С, во второй – 23.8 °С, вызвав растрескивание почвенного пахотного горизонта с широкими расщелинами (до 2–5 см) на глубину 50–60 см. Такие показатели имеют отклонение от средних многолетних данных с периодичностью повторения один раз в 15–20 лет и считаются аномальными для проведения посевов культуры гуара.

Дагестанская ОС. В почвенно-климатических условиях Дагестанской ОС (полусухие субтропики) в 2018 г. гуар выращивался впервые. Использовался полив (поливные борозды). До фазы созревания растения развивались быстро и дружно, однако в середине августа выпали сильные осадки, после чего у растений, находящихся в фазе начала созревания нижних бобов, было зафиксировано поражение альтернариозом, которое к сентябрю переросло в эпифитотию (4–5 баллов поражения по 5-балльной шкале). Это отрицательно сказалось на всех показателях урожайности.

Волгоградская ОС. Климат Нижнего Поволжья, где располагается опытная станция, – резко континентальный. Весна сухая, с быстрым нарастанием дневных температур и частыми ветрами. Лето сухое знойное (температура воздуха более 40 °С), практически без осадков. В течение всего периода вегетации гуара использовали систему капельного орошения. Семена гуара высевали в середине мая в хорошо прогретую почву, предварительно пролив бороздки водой. Глубина заделки 2–3 см. В конце мая–начале июня наблюдалось резкое похолодание, которое отрицательно сказалось на развитии гуара (растения пожелтели, были частичные выпадки). Тем не менее в дальнейшем, при довольно засушливой погоде, высокой температуре воздуха и капельном поливе растения выросли мощные и ветвистые (до 123 см). В период вегетации гуара вели мониторинг на заселенность растений тлей и альтернариоз – было отмечено лишь незначительное поражение единичных растений.

Астраханская ОС расположена в южной части Астраханской области в дельте р. Волги. Климат Астраханской области – самый засушливый на территории России, в целом характеризуется как резко континентальный. Срок посева – первая декада мая. Посев был произведен в по-

ливную борозду, семена заделывали во влажную почву по центру борозды, вручную. В целях сохранения влаги и предотвращения появления почвенной корки было проведено ручное боронование рядков на 5–6-й день после посева. В дальнейшем уход за посевами заключался в своевременных ручных прополках, междурядных культивациях и поливе путем капельного орошения.

Ускоренная лабораторная оценка содержания и вязкости камеди в семенах гуара

С целью массового скрининга исходного материала для селекции гуара на содержание и качество камеди нами был предложен ускоренный лабораторный метод получения вытяжек камеди из семян гуара для вискозиметрической оценки без выделения самой камеди в чистом виде. Разработанный метод основан на экстракции камеди из предварительно разваренных семян гуара. Условия разваривания (120 °С, 30 мин) были подобраны экспериментально так, чтобы обеспечить достаточное набухание полисахаридов эндосперма для перфорации оболочки семян, но при этом предотвратить потери камеди из-за растворения в замочной воде. Таким образом, вместо многочасовой замочки семян с препарированием и сушкой эндосперма (Eldirany et al., 2015) вся процедура укладывается в 6 ч, включая измерение вязкости и расчет содержания сухих веществ.

Вязкость полученного экстракта с концентрацией сухих веществ 0.35–0.55 % измеряют при помощи ротационного вискозиметра. Измеренную величину приводят к концентрации сухих веществ экстракта, получая значение приведенной удельной вязкости. Определению не мешают другие растворимые в воде компоненты семян гуара.

Общепринятая оценка вязкости растворов гуаровой камеди предполагает использование ротационной вискозиметрии при концентрациях камеди около 0.5 % (см. FAO JECFA Monographs 5, 2008). Взятые для анализа количество семян (2.0 г) из расчета содержания камеди в семенах от 30 до 50 % и конечного объема экстракта 150–200 см³ позволяет обеспечить концентрацию камеди в водной вытяжке на уровне искомым 0.5 %.

Доступность полисахаридов эндосперма для экстракции определяется полнотой их гидратации. Из данных литературы известно, что для гидратирующей обработки семян требуется замочка продолжительностью примерно 16 ч (Eldirany et al., 2015). В ходе постановки методики нами экспериментально установлено, что степень гидратации семян (по объему и остаточной твердости набухшей фазы), соответствующая 16 ч замочки при комнатной температуре, может быть достигнута за 2 ч кипячения при атмосферном давлении или за 30 мин варки при 121 °С.

Выход полисахаридов камеди в раствор оценивали по изменению вязкости экстракта в зависимости от продолжительности экстракции (рис. 1).

Найденные экспериментально условия экстракции (три цикла за 4 ч) обеспечивают выход камеди не менее 95 % от определенного весовым методом после препарирования семян и позволяют выполнить всю процедуру анализа, включая разваривание и измерение вязкости, за 6 ч. Масса камеди в очищенном центрифугированном растворе составляет не менее 90–95 % от содержания сухих веществ, что позволяет с достаточной для экспресс-метода

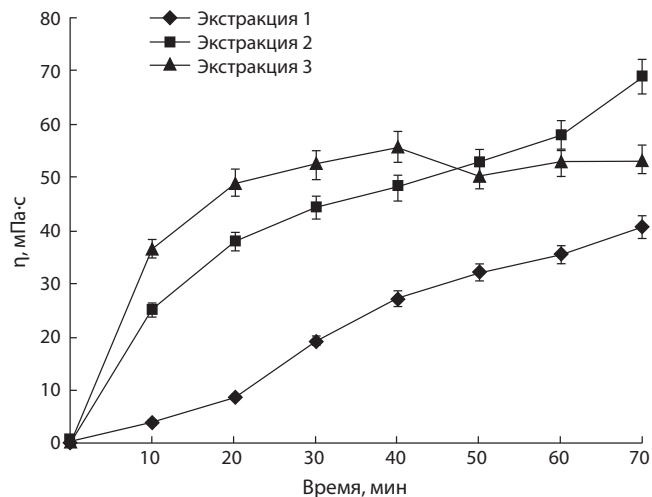


Рис. 1. Кинетика изменения вязкости (η) трех последовательных вытяжек из разваренных семян гуара.

точно приравнять ее содержание в вытяжке к общему содержанию сухих веществ.

Предлагаемая методика дает возможность по данным двух измерений – вязкости и содержания сухих веществ в экстракте – при известной массе образца, взятого для анализа, и объеме полученного экстракта рассчитать два показателя семян: содержание камеди и ее приведенную удельную вязкость. Последний показатель безразмерен, при его расчете учитывается концентрация сухих веществ в экстракте, динамическая вязкость которого измеряется ротационным вискозиметром (в сП или мПа·с), что позволяет свести в единую шкалу для сравнительной оценки данные неизвестных образцов с различным содержанием искомой камеди и, соответственно, различной ее концентрацией в получаемых экстрактах.

В качестве оценки эффективности метода для сортов Кубанский и Кубанский юбилейный была проведена оценка вязкости камеди традиционным способом, после выделения очищенного сухого препарата последней. Результаты совпали с полученными по предлагаемой авторами методике в пределах метрологической относительной погрешности $\pm 10\%$, что может служить веским доводом для внедрения экспресс-метода в повседневную лабораторную практику.

Показатели камеди в семенах гуара, выращенного в различных эколого-географических условиях

Разработанная методика оценки содержания и вязкости вытяжек камеди из семян гуара позволила провести анализ 13 образцов, выращенных в четырех географических пунктах экологических испытаний. Среднее процентное содержание камеди в семенах испытываемых образцов варьировало от 35.4 % (Кубанская ОС) до 40.7 % (Волгоградская ОС). По результатам примененного критерия Стьюдента (*t*-test for dependent samples), семена гуара, выращенные в условиях Волгоградской ОС, содержали достоверно больше камеди по сравнению с семенами, выращенными на Астраханской ($p < 0.008$), Дагестанской ($p < 0.011$) и Кубанской ($p < 0.009$) опытных станциях

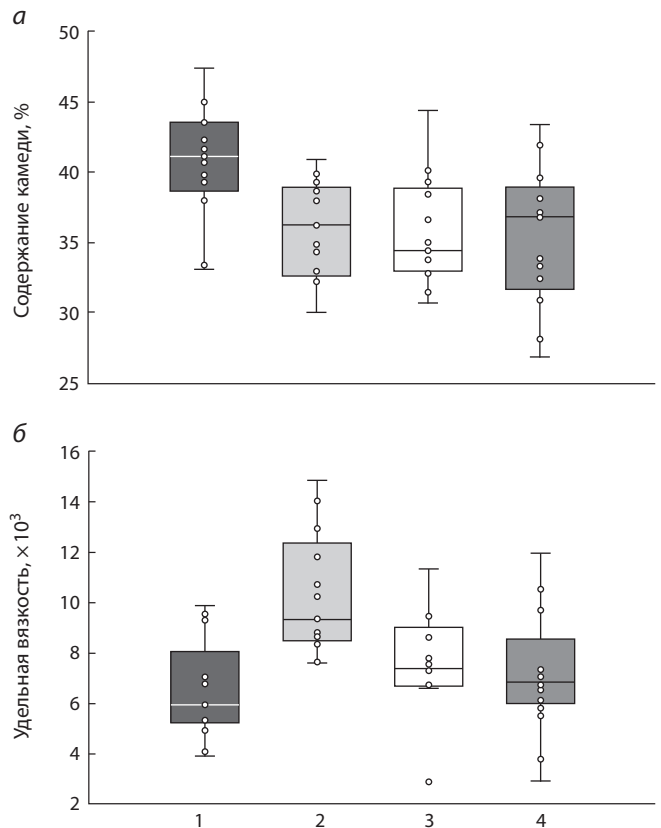


Рис. 2. Сравнение средних показателей процентного содержания камеди (а) и удельной (приведенной) вязкости вытяжек камеди (б) в семенах 13 образцов гуара, выращенных на Волгоградской (1), Астраханской (2), Дагестанской (3) и Кубанской (4) опытных станциях ВИР.

(рис. 2, а). Среднее значение приведенной удельной вязкости вытяжек камеди было максимальным у семян репродукции Астраханской ОС (10305) и достоверно превышало этот показатель у семян, полученных на Волгоградской ($p < 0.0005$), Дагестанской ($p < 0.003$) и Кубанской ($p < 0.001$) опытных станциях (см. рис. 2, б).

При сравнении семян одних и тех же образцов, выращенных в разных условиях, степень корреляции как по показателю содержания камеди, так и по приведенной удельной вязкости камеди оказалась недостоверной (рис. 3, а, б). Таким образом, внешние условия культивирования существенно влияют на уровень накопления и свойства камеди как резервного полисахарида семян гуара.

Получение образцов порошковой камеди сортов гуара в лабораторных условиях

Помимо лабораторной оценки содержания и вязкости вытяжек камеди из семян гуара разработанным экспресс-методом, авторы также предприняли попытку получить в лабораторных условиях образцы порошковой камеди из семян трех из 13 испытанных образцов гуара. Это одни из первых сортов гуара отечественной селекции: сорта Кубанский, Кубанский юбилейный и Синус. Исследовались семена репродукции Астраханской ОС.

На первом этапе получения порошковой камеди семена гуара после замачивания фракционировали путем отделе-

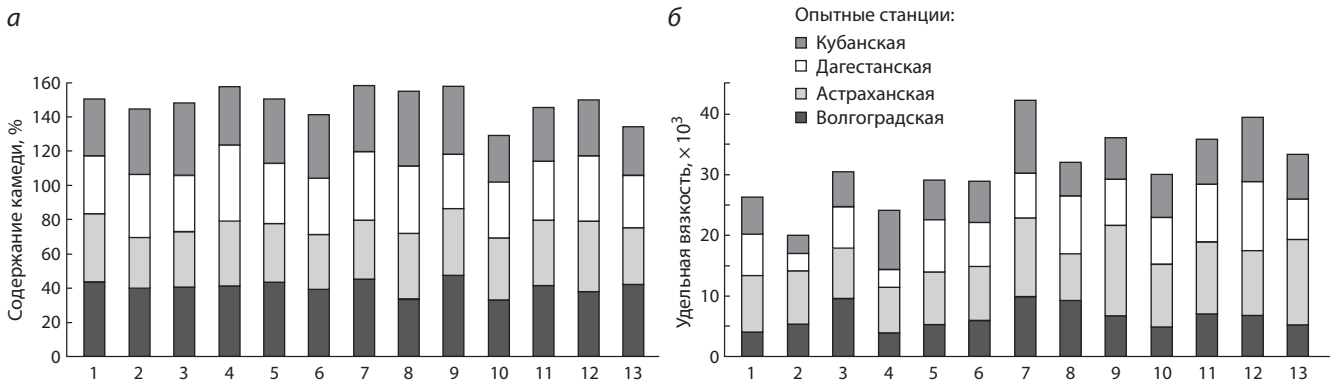


Рис. 3. Сравнение показателей количества и качества камеди в семенах отдельных образцов, выращенных на разных опытных станциях ВИР: а – содержание камеди (%) в семенах образцов; б – приведенная удельная вязкость вытяжек камеди из семян образцов.

Номера 1–13 соответствуют номерам образцов в табл. 1.



Рис. 4. Получение образцов порошковой камеди сортов гуара в лабораторных условиях: а – фракции зародыша (korma), семенной оболочки (shugi) и эндосперма, содержащего камедь; б – вид полученной в лабораторных условиях порошковой камеди после одной (1), двух (2) и трех (3) стадий очистки.

ния семядолей от оболочки и зародыша и высушивания весовым способом (Sabahelkheir et al., 2012) (рис. 4, а). Дальнейшее выделение камеди из эндосперма проводили после разваривания 100 г зерен (30 мин при 121 °С) и трех стадий экстракции при комнатной температуре (по 1 ч). Нерастворимые остатки удаляли центрифугированием. После каждой экстракции фракцию камеди высаживали ацетоном, сушили при 105 °С на воздухе и измельчали (см. рис. 4, б). Полученные лабораторным путем для трех образцов семян гуара (№ 5, 7 и 13) навески порошковой камеди были переправлены в лабораторию ООО «НИКА-Петротэк» для дальнейшего анализа.

Оценка камеди гуара как гелеобразователя для жидкости гидроразрыва пласта

Одним из наиболее эффективных методов повышения продуктивности добывающих скважин является гидравлический разрыв пласта (ГРП), в результате которого увеличивается его конечная нефтеотдача (Силин и др., 2013). Гидравлическим разрывом пласта называется процесс, при котором давление жидкости воздействует непосредственно на породу пласта вплоть до ее разрушения и возникновения трещины.

Для создания гидравлических трещин в пласте и переноса расклинивающего наполнителя (проппанта) при ГРП используют водный полисахаридный гель. В качестве загустителей при получении линейных гелей уже более 50 лет употребляются жидкости на гуаровой основе и гуаровые производные. С конца 1960-х гг. и до настоящего времени применяют так называемые сшитые жидкости ГРП – растворы полисахаридов, «сшитых» бор-содержащими сшивателями. При взаимодействии линейных систем со сшивателем образуются комплексные связи между цепочками полимеров. Благодаря этому появляется сшитая система: жидкость с низкой вязкостью (линейный гель) превращается в высоковязкий структурированный флюид, способный удерживать и транспортировать расклинивающий агент (проппант) в пласт для повышения проводимости.

В лаборатории ООО «НИКА-Петротэк» было проведено тестирование трех образцов порошковой камеди, полученных в лабораторных условиях из семян трех разных сортов гуара репродукции Астраханской ОС. Целью тестирования было установить способность гелеобразователя (образцов порошка гуаровой камеди) обеспечивать стабильный гель с высокими песконесущими харак-



Рис. 5. Внешний вид сшитого геля, полученного из лабораторного образца порошковой камеди (сорт Кубанский).

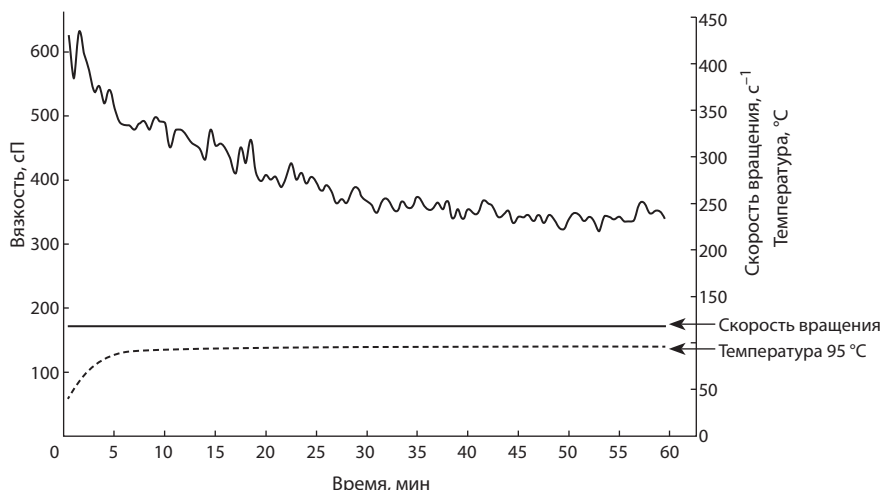


Рис. 6. График температурной стабильности сшитого гуарово-боратного геля, полученного при температуре 95 °С из обр. № 5 порошковой камеди образцов гуара репродукции Астраханской ОС (верхняя ломаная линия).

Левая ось ординат отражает показатель вязкости в сП (Брукфильд). По правой оси отложены две постоянные величины: сплошная горизонтальная линия отражает постоянную скорость вращения стакана с образцом (117.6 об./с); штриховая – температуру системы в градусах Цельсия (95 °С).

теристиками, сшитый борсодержащими сшивающими агентами. Оценочной качественной характеристикой сшитой жидкости гидроразрыва пласта является наличие «языка». Образование «языка», в свою очередь, говорит о плотности сшитого геля (рис. 5). Количественной характеристикой геля служит вязкость. Рабочей принято считать вязкость линейного геля равную 40–45 мПа·с; при этом вязкость сшитой системы находится в диапазоне более 300–400 мПа·с, в зависимости от исходных требований.

Конечная вязкость раствора (линейного геля) порошковой камеди сортов Кубанский и Кубанский юбилейный спустя 30 мин достигла необходимого порогового уровня – 41.1 и 36.2 мПа·с соответственно (табл. 2). Это свидетельствует о потенциальной возможности получения порошковой камеди с заданными свойствами из

семян гуара, произведенных на территории РФ. По скорости набора вязкости, которая определяется отношением показателя вязкости после 3 мин гидратации к максимальному значению вязкости, выделился сорт Синус.

Сшитый гель отвечает минимальным требованиям к качеству жидкости гидроразрыва пласта (рис. 6). Снижение вязкости в течение первых 35 мин является допустимым и характерным термическим разжижением системы, с 35-й по 60-ю минуту средняя вязкость стабилизируется и составляет 350 мПа·с. Стандартная концентрация сухого гелеобразователя в жидкости ГРП равна 3.6 кг/м³. Высокая концентрация продукта (4.8 кг/м³) говорит о том, что необходимо доработать процесс очистки сухого продукта, а также провести дополнительные исследования по молекулярно-массовому распределению получаемого полимера.

Обсуждение

Галактоманнан (гуаровая камедь) – растворимый в воде резервный полисахарид семян гуара – используется в качестве гелеобразующего агента в жидкостях, в том числе в нефте- и газодобывающей промышленности для гидравлического разрыва пласта. В ходе проведенного исследования установлено, что семена разных сортов гуара характеризуются разными показателями общего содержания и удельной (приведенной) вязкости камеди, причем эти показатели могут значительно варьировать в зависимости от сорта гуара и условий его выращивания.

Для сравнительного изучения свойств камеди в семенах различных генотипов гуара был предложен ускоренный лабораторный метод получения вытяжек

Таблица 2. Физико-химические параметры порошковой формы гуаровой камеди, полученной из семян трех сортов гуара репродукции Астраханской ОС ВИР

Показатель	Кубанский	Температура, °С	Кубанский юбилейный	Температура, °С	Синус	Температура, °С
Вязкость раствора порошка камеди, мПа·с						
начальная (3 мин)	4.7	20.7	2.3	21.9	10.2	21.2
конечная (30 мин)	41.1	21.4	36.2	22.4	29.2	19.0
ед. рН	7.16	20.7	6.59	22.1	6.65	19.0

камеди для вискозиметрической оценки. Разработанный метод позволяет проводить ускоренный скрининг исходного материала для селекции сортов гуара, перспективных с точки зрения использования камеди из их семян в нефтедобывающей промышленности. Результаты применения этой экспресс-методики для лабораторной оценки содержания и вязкости камеди, содержащейся в семенах 13 образцов гуара, показали, что выход и свойства камеди одного и того же сорта сильно варьируют в зависимости от условий произрастания.

До настоящего времени попытки выращивания гуара в производственных посевах проводились в Краснодарском крае (Лебедь и др., 2017) и в Крыму, где гуар выращивается без полива (на богаре). Определенные успехи в получении урожая в этих регионах были достигнуты, однако выявлены также и риски потери урожая при отсутствии осадков в критические периоды развития растений. Результаты экологических испытаний гуара в разных регионах страны свидетельствуют о перспективности производственных посевов этой культуры в Нижнем Поволжье.

Так, в эксперименте 2018 г. по выращиванию одного и того же набора 13 образцов гуара на Волгоградской, Астраханской, Дагестанской и Кубанской опытных станциях ВИР максимальные показатели удельной вязкости были получены для семян репродукции Астраханской ОС ВИР, где гуар выращивался на поливе. Последующий анализ образцов порошковой камеди, полученных в лабораторных условиях из семян трех сортов гуара репродукции Астраханского филиала, также показал их потенциальную пригодность для промышленного использования. С другой стороны, максимальное процентное содержание камеди в семенах всех испытанных образцов гуара было зафиксировано при их выращивании в условиях Волгоградской ОС ВИР на капельном орошении. Представленные результаты являются предварительными, поскольку основаны на данных экологических испытаний одного года. Однако они свидетельствуют о том, что идея о возделывании гуара на орошении в Астраханской и Волгоградской областях может быть перспективной и получить поддержку со стороны агробизнеса при наличии разработанной технологии возделывания этой культуры в необычных для нее условиях произрастания.

Заключение

Результаты тестирования образцов порошковой формы гуаровой камеди, полученной из семян сортов отечественной селекции, позволяют сделать вывод о пригодности продукта для использования в качестве гелеобразователя в процессах интенсификации добычи нефти методом гидроразрыва пласта. Данный опыт является уникальным для РФ.

Список литературы / References

- Лебедь Д.В., Костенкова Е.В., Волошин М.И. Агротомическое обоснование размещения посевов *Cyamopsis tetragonoloba* L. на юге европейской части России. Тавр. вестн. аграр. науки. 2017; 1(9):53-64.
[Lebed D.V., Kostenkova E.V., Voloshin M.I. Agronomic rationale for the placement of *Cyamopsis tetragonoloba* L. in the south of the European part of Russia. Tavricheskiy Vestnik Agrarnoy Nauki = Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2017;1(9):53-64. (in Russian)]
- Силин М.А., Магадова Л.А., Чирина Л.А. Исследование влияния ионов бора и минеральных солей, содержащихся в подтоварной воде, на качество полисахаридных жидкостей ГПП. Вести газовой науки. 2013;1(12):73-78.
[Silin M.A., Magadova L.A., Chirina L.A. Investigation of the effect of boron ions and mineral salts present in tank water on the quality of hydrofracturing polysaccharide liquids. Vesti Gazovoy Nauki = Gas Science News. 2013;1(12):73-78. (in Russian)]
- Abidi N., Liyanage S., Auld D., Imel R.K., Norman L., Grover K., Angadi S., Singla S., Trostle C. Challenges and opportunities for increasing guar production in the United States to support unconventional oil and gas production. In: Uddameri V. et al. (Eds.). Hydraulic Fracturing Impacts and Technologies. CRC Press, Boca Raton, 2015;207-226. DOI 10.1201/b18581.
- Cerqueira M.A., Pinheiro A.C., Souza B.W., Lima A.M.P., Ribeiro C., Miranda C., Teixeira J.A., Moreira R.A., Coimbra M.A., Gonçalves M.P., Vicente A.A. Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. Carbohydrate Polymers. 2009;75(3):408-414.
- ECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Monographs 5, Compendium of Food Additive Specifications from 69th JEFCA Meeting, Rome, June 17–26, 2008. Available at: <http://www.fao.org/3/a-at870e.pdf>
- Eldirany A.A., Azhari A. Mohamed N., Khadir E.K., Gadeen K.A., Ibrahim M.A.E.M. Physicochemical and functional properties of four new genotypes (*Cyamopsis tetragonoloba* L.) of guar gum. Am. J. Food Sci. Health. 2015;1(2):43-50.
- Ellis P.R., Qi Wang, Rayment P., Ren Y., Ross-Murphy S.B. Guar gum: agricultural and botanical aspects, physicochemical and nutritional properties and its use in the development of functional foods. In: Cho S.S. (Ed.). Handbook of Dietary Fiber. CRC Press, 2001; 613-659.
- Hanson T. The Triumph of Seeds: How grains, nuts, kernels, pulses, and pips conquered the plant kingdom and shaped human history. New York: Basic Books, 2015.
- McArdle R., Hamill R., Kerry J.P. Utilisation of hydrocolloids in processed meat systems. In: Kerry J.P., Kerry J.F. (Eds.). Processed Meats: Improving Safety, Nutrition and Quality. 1st edn. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd., 2011;243-269. DOI 10.1016/B978-1-84569-466-1.50028-3.
- Sabahelkheir M.K., Abdalla A.H., Nouri S.H. Quality assessment of guar gum (endosperm) of guar (*Cyamopsis tetragonoloba*). ISCA J. Biol. Sci. 2012;1(1):67-70.
- Thombare N., Jha U., Mishra S., Siddiqui M.Z. Guar gum as a promising starting material for diverse applications. Int. J. Biol. Macromol. 2016;88:361-372. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.001.

ORCID ID

E.K. Potokina orcid.org/0000-0002-2578-6279

Благодарности. Исследование выполнено при поддержке Минобрнауки РФ в рамках проекта RFMEFI60417X0168 (соглашение № 14.604.21.0168).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 04.06.2019. После доработки 04.09.2019. Принята к публикации 05.09.2019.

DOI 10.18699/VJ19.571

Исправление к статье «Применение полногеномной амплификации для генетической оценки эмбрионов коров»

К.С. Пантюх, И.В. Рукин, С.М. Портнов, А. Хатиб, С.Л. Пантелеев, А.М. Мазур

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(4):489-495

На странице 489 в разделе аффилиаций вместо
ООО «Мой Ген», Москва, Россия

следует читать:
ЗАО «Геноаналитика», Москва, Россия

Оригинальная статья может быть найдена по DOI 10.18699/VJ19.518

DOI 10.18699/VJ19.571

Erratum to: “The use of whole genome amplification for genomic evaluation of bovine embryos”

K.S. Pantiukh, I.V. Rukin, S.M. Portnov, A. Khatib, S.L. Panteleev, A.M. Mazur

Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(4):489-495 (in Russian)

Page 489, in affiliations instead of
I Gene, LLC, Moscow, Russia

should read
“Genoanalytica”, Moscow, Russia

The original article can be found under DOI 10.18699/VJ19.518

Прием статей через электронную редакцию на сайте <http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour>
Предварительно нужно зарегистрироваться как автору, затем в правом верхнем углу страницы выбрать «Отправить рукопись». После завершения загрузки материалов обязательно выбрать опцию «Отправить письмо», в этом случае редакция автоматически будет уведомлена о получении новой рукописи.

«Вавиловский журнал генетики и селекции»/“Vavilov Journal of Genetics and Breeding”
до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС»/
“The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists”.

Регистрационное свидетельство ПИ № ФС77-45870 выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 20 июля 2011 г.

«Вавиловский журнал генетики и селекции» включен ВАК Минобрнауки России в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, Российский индекс научного цитирования, ВИНТИ, базы данных Emerging Sources Citation Index (Web of Science), Zoological Record (Web of Science), Scopus, Ebsco, DOAJ, Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar, Russian Science Citation Index на платформе Web of Science, каталог научных ресурсов открытого доступа ROAD.

Открытый доступ к полным текстам:
на сайте ИЦиГ СО РАН – bionet.nsc.ru/vogis/
платформе Elpub – vavilov.elpub.ru/index.php/jour
платформе Научной электронной библиотеки – elibrary.ru/title_about.asp?id=32440

Подписку на «Вавиловский журнал генетики и селекции» можно оформить в любом почтовом отделении России. Индекс издания 42153 по каталогу «Пресса России».

При перепечатке материалов ссылка на журнал обязательна.

✉ e-mail: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Издатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»,
проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Адрес редакции: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Секретарь по организационным вопросам С.В. Зубова. Тел.: (383)3634977.

Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Тел.: (383)3634963*5218.

Начальник отдела: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: В.Д. Ахметова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич.

Компьютерная графика и верстка: Т.Б. Коняхина, О.Н. Савватеева.

Подписано в печать 25.10.2019. Выход в свет 29.11.2019. Формат 60 × 84 1/8. Усл. печ. л. 18.13.

Уч.-изд. л. 19.6. Тираж 150 экз. Заказ № 212. Цена свободная.

Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН», Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.