

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Система молекулярных маркеров для идентификации аллелей генов короткостебельности *Rht-B1* и *Rht-D1* у мягкой пшеницы

И.В. Поротников , О.П. Митрофанова, О.Ю. Антонова

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия  
 [i.v.porotnikov@gmail.com](mailto:i.v.porotnikov@gmail.com)

**Аннотация.** Мутантные аллели генов *Rht-B1* и *Rht-D1* (*Reduced height*) широко используют для создания короткостебельных сортов мягкой пшеницы интенсивного типа. Эти гены и фланкирующие их области секвенированы, в последовательностях описаны ассоциированные с изменением высоты растения однонуклеотидные замены, приводящие к образованию нонсенс-кодонов (аллели *Rht-B1b*, *Rht-B1e*, *Rht-B1p* и *Rht-D1b*), и различные инсерции (аллели *Rht-B1c*, *Rht-B1h* и *Rht-B1i-1*). Для идентификации такого типа однонуклеотидных мутаций разработаны ДНК-маркеры, основанные на принципе аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Однако идентификация аллелей этим методом предъявляет повышенные требования к соблюдению условий реакции, а получаемые результаты не всегда однозначны. Альтернативой может быть CAPS-технология, детектирующая различия в последовательностях путем рестрикции ПЦР-продуктов. В случае отсутствия рестриктаз, способных расщеплять ДНК в месте локализации точечной мутации, рестрикционные сайты могут быть искусственно внесены в последовательность праймера (derived CAPS). Цель настоящей работы – разработать CAPS- и dCAPS-маркеры для выявления замен оснований, подобрать по литературным источникам STS-маркеры для детекции инсерций и тем самым предложить систему молекулярных маркеров для идентификации аллелей генов короткостебельности, часто используемых и перспективных для селекции. Разработано три CAPS-маркера для выявления аллелей *Rht-B1b*, *Rht-D1b*, *Rht-B1p* и два dCAPS-маркера для *Rht-B1b* и *Rht-B1e*, предложены программы для их амплификации. По литературным источникам подобраны STS-маркеры аллелей *Rht-B1c*, *Rht-B1h*, *Rht-B1i-1*, содержащих инсерции. Предложенная система маркеров апробирована при генотипировании 11 образцов мягкой пшеницы из коллекции ВИР, несущих вышеуказанные мутантные аллели генов короткостебельности и аллели дикого типа *Rht-B1a* и *Rht-D1a*. Наличие нонсенс-мутаций подтверждено также при помощи аллель-специфичной ПЦР. Эта система маркеров наряду с уже существующими может быть использована для идентификации аллелей генов короткостебельности *Rht-B1* и *Rht-D1* у мягкой пшеницы с целью генетического скрининга образцов *ex situ* коллекций и/или в маркер-ориентированной селекции.  
Ключевые слова: *Triticum aestivum*; аллели *Rht*-генов; AS-PCR; CAPS; dCAPS; генотипирование.

**Для цитирования:** Поротников И.В., Митрофанова О.П., Антонова О.Ю. Система молекулярных маркеров для идентификации аллелей генов короткостебельности *Rht-B1* и *Rht-D1* у мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(2):128-138. DOI 10.18699/VJGB-22-16

## A system of molecular markers to identify alleles of the *Rht-B1* and *Rht-D1* genes controlling reduced height in bread wheat

I.V. Porotnikov , O.P. Mitrofanova, O.Yu. Antonova

Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia  
 [i.v.porotnikov@gmail.com](mailto:i.v.porotnikov@gmail.com)

**Abstract.** Mutant alleles of the *Rht-B1* and *Rht-D1* (*Reduced height*) genes are widely used in bread wheat breeding for the development of intensive-type cultivars. These genes and their flanking regions have been sequenced and the point mutations leading to the nonsense codons (*Rht-B1b*, *Rht-B1e*, *Rht-B1p* and *Rht-D1b* alleles) and various insertions (*Rht-B1c*, *Rht-B1h* and *Rht-B1i-1*) associated with a change in plant height have been described. DNA-markers based on the allele-specific PCR have been developed to identify single-nucleotide changes. However, the use of such technique imposes stringent PCR conditions, and the resulting data are not always unambiguous. An alternative can be found in the CAPS technology: it detects differences in sequences by digesting PCR products. In the absence of restrictases capable of digesting DNA at the point mutation site, restriction sites can be introduced into the primer sequence (derived CAPS). The aim of this study was to propose a system of CAPS-, dCAPS- and STS-markers for identifying alleles of the reduced height genes frequently used in breeding programs. Three CAPS have been developed to identify the *Rht-B1b*, *Rht-D1b*, *Rht-B1p* alleles, as well as two dCAPS for *Rht-B1b*, *Rht-B1e*. STS-markers for the insertion-containing alleles *Rht-B1c*, *Rht-B1h* and *Rht-B1i-1* have been selected from publications. The proposed markers were tested during the genotyping of 11 bread wheat accessions from the VIR collection with the abovementioned mutant

alleles and the wild-type *Rht-B1a* and *Rht-D1a*. The presence of nonsense mutations was also confirmed by the results of allele-specific PCR. This marker system, along with the existing ones, can be used to identify dwarfing alleles of the *Rht-B1* and *Rht-D1* genes in bread wheat for genetic screening of accessions from *ex situ* collections and/or for marker-assisted selection.

Key words: *Triticum aestivum*; alleles of *Rht*-genes; AS-PCR; CAPS; dCAPS; genotyping.

**For citation:** Porotnikov I.V., Mitrofanova O.P., Antonova O.Yu. A system of molecular markers to identify alleles of the *Rht-B1* and *Rht-D1* genes controlling reduced height in bread wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(2):128-138. DOI 10.18699/VJGB-22-16

## Введение

Одним из значимых факторов успеха в селекции мягкой пшеницы, прежде всего в реализации программы «зеленой революции» в развивающихся странах мира, считают создание короткостебельных сортов интенсивного типа (Hedden, 2003; Sukhikh et al., 2021). Снижение высоты растений не только сопровождалось повышением их устойчивости к полеганию, что благоприятно сказывалось на эффективности механизированной уборки, но и увеличивало число зерен в колосе и число зерен на 1 м<sup>2</sup>, а все вместе приводило к повышению урожайности (Gale et al., 1985; Youssefian et al., 1992; Evans, 1998).

У мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и родственных ей видов описано по меньшей мере 25 генов, контролирующих признак «высота растения» и обозначенных как *Reduced height*, *Rht1–Rht25*. Все гены так или иначе связаны с фитогормоном роста гиббереллином (McIntosh et al., 2013, 2016, 2018). Одни из них, так называемые GA-чувствительные гены *Rht4–Rht9*, *Rht12–Rht20* и *Rht25*, по-видимому, участвуют в процессах синтеза или распада гибберелловой кислоты (ГК = GA). Другие, GA-нечувствительные гены *Rht-A1*, *Rht-B1* и *Rht-D1*, детерминируют ответ на нее. Для некоторых генов (*Rht22*, *Rht23* и *Rht24*) характер реакции пока не определен (Sukhikh et al., 2021).

Наиболее широкое распространение среди GA-чувствительных генов получил ген *Rht8*, переданный в начале 20-го века вместе с тесно сцепленным с ним аллелем гена нечувствительности к фотопериоду *Ppd-D1a* (response to photoperiod) от японского сорта Акакомуги сначала в итальянские, а затем во многие восточно- и южноевропейские сорта (Vorojevic K., Vorojevic Ks., 2005). Этот ген не оказывает существенного влияния на уменьшение длины coleoptile и, как следствие, позволяет проводить посев на большую глубину, что играет решающую роль для сохранения жизнеспособности проростков в условиях дефицита воды или высоких температур (Korzun et al., 1998; Ellis et al., 2004; Divashuk et al., 2013; Grover et al., 2018).

Более детально изучены GA-нечувствительные гены, они расположены на коротких плечах хромосом 4-й гомеологической группы (Gale, Marshall, 1976; Börner et al., 1996). Доминантные аллели этих генов (дикий тип) кодируют DELLA-белки, принадлежащие семейству GRAS белков – регуляторов транскрипции; на их C-конце находится консервативный домен, который может связываться с другими транскрипционными факторами и тем самым блокировать их функцию. Поэтому наличие в клетках большого количества DELLA-белков замедляет рост растений. На вариабельном N-конце имеется DELLA-домен, способный образовывать комплекс GA–GID1 (gibberellin insensitive

dwarf 1 – рецептор к GA). Этот комплекс подвергается полиубиквитинации и деградации протеасомами. Соответственно, уменьшение количества DELLA-белков в клетках в присутствии GA снижает их негативное влияние на рост растений (Peng et al., 1999; Bazhenov et al., 2015; Thomas, 2017; Sukhikh et al., 2021).

Для генов *Rht-B1* и *Rht-D1* описано довольно большое число мутантных рецессивных и частично доминантных аллелей, которые по-разному изменяют длину стебля. Последовательности этих аллелей секвенированы, наиболее изученные из них приведены в Приложении 1<sup>1</sup>. Показано, что аллели *Rht-B1b* (= *Rht1*), *Rht-B1e* (= *Rht11*, = *Rht Krasnodari 1*), *Rht-B1p* (= *Rht17*) и *Rht-D1b* (= *Rht2*) ассоциированы с однонуклеотидными заменами, приводящими к образованию преждевременных стоп-кодонов (Peng et al., 1999; Ellis et al., 2002; Pearce et al., 2011; Divashuk et al., 2012; Li et al., 2012; Bazhenov et al., 2015). Фенотипический эффект таких нонсенс-мутаций варьирует от умеренного (снижение высоты растения на 20–24 % у аллелей *Rht-B1b* и *Rht-D1b*) до сильного (на 33 и 40 % у *Rht-B1p* и *Rht-B1e* соответственно) (Gale et al., 1985; Sukhikh et al., 2021).

Аллели *Rht-B1h* и *Rht-B1i-1* имеют крупные (более 100 п.о.) вставки в промоторной зоне, в то время как *Rht-B1c* (= *Rht3*) характеризуется наличием инсерции в промоторной зоне, идентичной таковой у *Rht-B1h*, и одновременно присутствием ретротранспозона *Vej* в кодирующей области (Wu et al., 2011; Li et al., 2013; Wen et al., 2013; Lou et al., 2016). Подобные вставки могут приводить к образованию белков, которые не подвергаются деградации, и, таким образом, у мутантных растений конститутивно репрессируется рост, причем более существенно, чем при нонсенс-мутациях в N-концевом кодирующем участке (Wu et al., 2011; Wen et al., 2013). Так, аллель *Rht-B1c* снижает высоту растений примерно на 60 % (Flintham, Gale, 1983; Sukhikh et al., 2021). Однако вставки могут не только уменьшать, но и увеличивать высоту растений относительно дикого типа на 10–15 %, как, например, в случае аллеля *Rht-B1i-1* (Lou et al., 2016). Кроме того, у гена *Rht-D1* идентифицированы аллели «сильной карликовости» *Rht-D1c* (*Rht10*) и *Rht-D1d* (*Rht Ai-bian 1a*), уменьшающие высоту на 60–70 %, они оказались множественными копиями мутантного аллеля *Rht-D1b* (Pearce et al., 2011). Известны также и другие аллели генов *Rht-B1h-o* и *Rht-D1e-j*, связанные с нуклеотидными заменами (миссенс-мутации) либо с инделями. Они выявлены у большого числа китайских сортов методом EcoTILLING, однако их фенотипический эффект не описан. У китайских

<sup>1</sup> Приложения 1 и 2 см. по адресу:

<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2022-26/appx3.pdf>

сортов также впервые идентифицированы мутантные аллели гена *Rht-A1* (Li et al., 2013).

В селекционных программах наиболее часто используют аллели *Rht-B1b* и *Rht-D1b*, источником которых был японский сорт Norin 10. По состоянию на конец 20-го века эти аллели содержали более 70 % возделываемых сортов мягкой пшеницы в мире (Gale et al., 1985; Evans, 1998). Но позднее было показано, что встречаемость их зависит от региона мира. У сортов мягкой пшеницы из Китая аллель *Rht-B1b* был выявлен в 36,2 %, а аллель *Rht-D1b* – в 53,4 % случаев (Zhang et al., 2006). Однако при генотипировании 247 сортов из США и Канады эти аллели были идентифицированы более чем у 90 % из них (Guedira et al., 2010). В генотипах европейских сортов преимущественно присутствует аллель *Rht-D1b*, при этом его встречаемость у сортов, зарегистрированных после 1990 г., составляет 49 % (Würschum et al., 2017).

В России широко распространены сорта с аллелем *Rht-B1e*, который получен путем мутагенеза у сорта Безостая 1, мутантная форма – Краснодарский Карлик 1 (Лукьяненко, Жогин, 1974; Рабинович, 1986). В настоящее время короткостебельные сорта (Крошка, Победа 50, Фишт, Палпич, Восторг, Дока, Таня, Есаул, Калым, Первица, Гром), гомозиготные по аллелям *Rht-B1e*, возделывают на площади более 4 млн га не только в России, но и в странах СНГ (Divashuk et al., 2012, 2013).

Перспективным для селекции является также аллель *Rht-B1p*, у которого за счет замены цитозина на тимин в позиции 178 от стартового кодона возникает стоп-кодон в DELLA-домене, эта мутация обуславливает до 30 см уменьшения высоты растений у мягкой пшеницы, особенно нижнего междоузлия, но при этом не уменьшает длину колоса (Bazhenov et al., 2015).

Благодаря секвенированию ДНК последовательно аллелей генов *Rht-B1* и *Rht-D1* у различных сортов мягкой пшеницы созданы молекулярные маркеры для их идентификации. Так, для определения аллелей *Rht-B1c*, *Rht-B1h*, *Rht-B1i-1*, содержащих инсерции, разработаны STS-маркеры (Pearce et al., 2011; Li et al., 2013; Lou et al., 2016); для выявления аллелей *Rht-B1b*, *Rht-B1e*, *Rht-B1p* и *Rht-D1b*, несущих однонуклеотидные замены, применяют маркеры на основе аллель-специфичной ПЦР (AS-PCR), в том числе AS-PCR в реальном времени (Ellis et al., 2002; Pearce et al., 2011; Li et al., 2012; Bazhenov et al., 2015, 2019).

Идентификацию широко распространенных аллелей *Rht-B1b* и *Rht-D1b*, а также аллелей гена *Rht24* проводят на основе конкурентной аллель-специфичной ПЦР (competitive allele-specific PCR, KASP), позволяющей оценивать большие количества образцов мягкой пшеницы с малыми временными затратами (Rasheed et al., 2016; Würschum et al., 2017). Вместе с тем следует отметить, что результаты AS-PCR значительно зависят от условий реакции, требуют проведения анализа в нескольких повторностях, а также строгого соблюдения авторского протокола, что не всегда возможно. В свою очередь, применение KASP-анализа связано с использованием сложной приборной базы и дорогостоящих реактивов, которых зачастую нет в небольших ориентированных на практику лабораториях.

Альтернативой для AS-PCR может послужить использование CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) маркеров, основанных на наличии в районе с точковой мутацией сайта рестрикции, которого нет у дикого типа, или, наоборот, на исчезновении у мутантного варианта сайта, характерного для дикого типа (Shavrukov, 2016). В случае отсутствия рестрикционных сайтов в местах расположения анализируемых мутаций их можно создать целенаправленно путем дизайна модифицированных праймеров – методом derived CAPS, dCAPS (Neff et al., 1998, 2002).

В отличие от AS-PCR, техника CAPS- и dCAPS-маркирования обладает хорошей воспроизводимостью, не требует жестких условий для проведения ПЦР, а результаты анализа легко интерпретировать в агарозных гелях. Генерирование маркеров возможно на базовом ПЦР-оборудовании. Ранее такого рода маркеры были созданы для гена короткостебельности *Rht24* (Tian et al., 2017).

Цель нашего исследования – разработать CAPS- и dCAPS-маркеры для анализа однонуклеотидных замен в генах *Rht-B1* и *Rht-D1*, апробировать STS-маркеры для выявления инсерций в этих генах и в итоге предложить систему маркеров для идентификации аллелей, наиболее часто используемых в селекции мягкой пшеницы.

## Материалы и методы

**Материалом для исследования** послужили 11 образцов мягкой пшеницы из коллекции ВИР с известными аллелями генов короткостебельности *Rht-B1* и *Rht-D1* (табл. 1). Источниками аллелей дикого типа *Rht-B1a* и *Rht-D1a* были сорта Chinese Spring и Hongdongmai. При генотипировании каждый изученный образец был представлен двумя-тремя индивидуальными растениями, а также суммарно 10–20 генотипами (проростками), из которых получена ДНК в виде bulk-пробы.

**Выделение ДНК** осуществляли из 10-дневных проростков модифицированным методом СТАВ-экстракции (Антонова и др., 2020).

**Выравнивание последовательностей** разных аллелей генов *Rht-B1* и *Rht-D1* проводили при помощи программ MEGA X (<https://www.megasoftware.net/>), Unipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012) и BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). Поиск рестрикционных сайтов выполняли посредством GenScript Restriction Enzyme Map Analysis Tools (<https://www.genscript.com/tools/restriction-enzyme-map-analysis>).

**Разработку праймеров** для вложенной ПЦР (Nested-ПЦР) и CAPS-анализа осуществляли в программе Primer3Plus (Untergasser et al., 2007). Качество праймеров (число шпилек, гомо- и гетеродимеров) контролировали при помощи интернет-ресурса OligoAnalyzer от Integrated DNA Technologies, Inc. (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). Праймеры для dCAPS-маркеров генерировали с использованием программы dCAPS Finder 2.0 (Neff et al., 2002). Праймеры, созданные в нашей работе, а также привлеченные из литературных источников, приведены в табл. 2 и 3, а места их локализации – на рис. 1, а, б.

**Проведение ПЦР:** а) вложенная ПЦР. Для большей специфичности dCAPS-анализа применяли метод вло-

**Таблица 1.** Используемые в работе образцы мягкой пшеницы с известными аллелями генов короткостебельности *Rht-B1* и *Rht-D1*

Аллели генов	№ по каталогу ВИР «К»	Название образца	Происхождение	Литературный источник
<i>Rht-B1a, Rht-D1a</i>	44435	Chinese Spring	Китай	Peng et al., 1999
	61292	Hongdongmai	»	Li et al., 2013
<i>Rht-B1b, Rht-D1a</i>	63045	Княжна	Россия, Краснодарский край	Divashuk et al., 2013
	64312	Красота	»	»
<i>Rht-B1c, Rht-D1a</i>	40699	Tom Thumb	Китай	Pearce et al., 2011
<i>Rht-B1e, Rht-D1a</i>	64583	Веда	Россия, Краснодарский край	Divashuk et al., 2013
	65223	Гром	»	»
<i>Rht-B1h, Rht-D1a</i>	44977	Atlas 66	США	Li et al., 2013
<i>Rht-B1h, Rht-D1b</i>	65711	Zheng 9023	Китай	»
<i>Rht-B1i-1, Rht-D1a</i>	10152	Триумф	СССР, Украинская ССР	»
<i>Rht-B1p, Rht-D1a</i>	54848	Chris Mutant	Россия, Краснодарский край	Bazhenov et al., 2015

женной ПЦР – первую ПЦР осуществляли с праймерами, фланкирующими участок локализации точковых мутаций в гене *Rht-B1* (BF/VIR.B1R), после чего полученный амплификат использовали в качестве матрицы для второй ПЦР с dCAPS-праймерами (B1bF/R, B1eF/B1eR) и CAPS-праймерами B1eF/B1pR. Первый этап Nested-ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 40 нг тотальной ДНК пшеницы; 1× реакционный буфер; 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0.6 мМ каждого из dNTP's; по 0.25 мкМ прямого и обратного праймера и 1 ед. Таq-полимеразы (Диалат, Россия, <http://dialat.ru>). Для большей специфичности программа ПЦР содержала функцию Touchdown: исходная температура отжига была на 4 градуса выше расчетной и понижалась на 0.5 градусов на цикл на протяжении 8 циклов (см. табл. 3).

По 2 мкл полученных амплификатов отбирали в чистые пробирки, разводили водой в 50 раз и использовали в качестве матрицы во втором этапе ПЦР. Еще по 10 мкл отбирали для контроля успешности ПЦР путем электрофореза в агарозном геле (рис. 2, а). Остаток (около 12 мкл) обрабатывали рестриктазой *Bst*VII (СибЭнзим, Россия, <http://russia.sibenzyme.com>), генерируя тем самым CAPS-маркер-аллели *Rht-B1b*.

Второй этап Nested-ПЦР осуществляли в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 4 мкл матрицы; 1× реакционный буфер; 2.5 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,3 мМ каждого из dNTP's; по 0.25 мкМ прямого и обратного праймера и 1 ед. Таq-полимеразы (Диалат), программы для каждой пары праймеров также указаны в табл. 3. По 12 мкл амплификационной смеси отбирали для рестрикционного анализа, а остаток использовали для контроля ПЦР методом электрофореза;

б) стандартная ПЦР. В случае CAPS-маркеров аллеля *Rht-D1b* и маркеров, выявляющих ретротранспозон в кодирующей области гена и вставки в промоторной области, ПЦР проводили в стандартных условиях. Реакционная смесь (20 мкл) содержала 40 нг ДНК; 1× реакционный буфер; 2.5 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0.3 мМ каждого из dNTP's; по 0.25 мкМ каждого из праймеров и 1 ед. Таq-полимеразы (Диалат); программы указаны в табл. 2 и 3;

в) аллель-специфичная ПЦР. Условия и программы для AS-PCR соответствовали рекомендованным авторами праймерам (Ellis et al., 2002; Bazhenov et al., 2015).

**Рестрикционный анализ.** ПЦР-продукты обрабатывали рестриктазами фирмы «СибЭнзим» с использованием протокола фирмы-изготовителя (<http://russia.sibenzyme.com>).

**Разделение фрагментов** проводили в горизонтальных агарозных гелях в буфере 1× TBE при напряжении 5В/см. Гели окрашивали бромистым этидием и визуализировали в проходящем УФ-свете.

## Результаты и обсуждение

Для разработки CAPS- и dCAPS-маркеров из баз данных NSBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) были взяты сиквенсы кодирующих участков следующих аллелей генов короткостебельности: *Rht-B1b*, *Rht-B1e*, *Rht-B1p* и *Rht-D1b*, а также последовательности аллелей дикого типа *Rht-A1a*, *Rht-B1a* и *Rht-D1a*. Номера последовательностей приведены в Приложении 1. Выравнивание последовательностей подтвердило наличие нонсенс-мутаций у этих аллельных форм, что позволило приступить к разработке CAPS- и dCAPS-маркеров (см. рис. 1).

Для каждой нонсенс-мутации был проведен поиск сайтов рестрикции, которые позволили бы отличить целевой аллель от всех остальных аллелей, в том числе аллелей дикого типа. Для *Rht-B1b* была подобрана рестриктаза *Bst*VII (GCAGC), не способная расщеплять мутантный сайт GTAGC. Аналогично для аллеля *Rht-B1p* (мутантный сайт GCGT) такой рестриктазой стала *Bst*HNI (GCGC). Напротив, рестриктаза *Bst*SFI (CTRYAG) расщепляла исключительно мутантный сайт (CTGTAG), имеющийся у *Rht-D1b*. Таким образом, для идентификации аллелей *Rht-B1b*, *Rht-B1p* и *Rht-D1b* удалось создать CAPS-маркеры CB1b/*Bst*VII, CB1p/*Bst*HNI и CD1b/*Bst*SFI соответственно.

У аллеля *Rht-B1e* мы не смогли выявить сайты рестрикции в месте локализации нонсенс-мутации. Поэтому для него разработали dCAPS-маркер dCB1e/*Hinf*I, последовательность обратного праймера была модифицирована таким образом, чтобы анализируемый нуклеотид вместе

**Таблица 2.** Использованные в исследовании праймеры для идентификации аллелей гена *Rht-B1*

Название праймера	Последовательность 5'→3'	Название маркера	Комбинация праймеров	Целевая область последовательности	Способ идентификации целевого аллеля	Литературный источник
<b>Nested-PCR</b>						
BF	ggtaggaggagcgagaggcgag	–	BF/VIR.B1R	–	338 п. о. – все аллели; <i>Rht-B1c</i> – фрагмент отсутствует	Ellis et al., 2002
VIR.B1R	tcgacccaggaggagaggtcg					Настоящее исследование
Программа: 94 °C – 3 мин 30 с; 8 циклов (94 °C – 45 с, 69 °C (↓0.5 °C на 1 цикл) – 150 с, 72 °C – 60 с); 30 циклов (94 °C – 45 с, 65 °C – 45 с, 72 °C – 45 с); 72 °C – 7 мин						
<b>Идентификация <i>Rht-B1b</i></b>						
BF	ggtaggaggagcgagaggcgag	–	BF/MR1	190 C→T	237 п. о.	Ellis et al., 2002
MR1	catccccatggccatctcgagcta					
WR1	catccccatggccatctcgagctg	–	BF/WR1	190 C→T	Фрагмент отсутствует	
VIR.B1R	tcgacccaggaggagaggtcg	CB1b	BF/VIR.B1R	<i>Bst</i> V11 <sup>1</sup> : GCGC <sup>2</sup>	Сайт отсутствует	Настоящее исследование
B1bF	caagatgatggtgctggggtcgg	dCB1b	B1bF/R <sup>3</sup>	Acc361 <sup>1</sup> : ACCTGC <sup>2</sup>	Сайт отсутствует	
B1bR	cctccccatggccatctccact <sup>4</sup>					
Программа (для маркера dCB1b/Acc361): 94 °C – 3 мин 30 с; 37 циклов (94 °C – 45 с, 68 °C – 45 с, 72 °C – 45 с); 72 °C – 7 мин						
<b>Идентификация <i>Rht-B1e</i></b>						
MR3	ggccatctccagctgctccagcta	–	BF/MR3	181 A→T	228 п. о.	Pearce et al., 2011
WR3	ggccatctccagctgctccagctt		BF/WR3		Фрагмент отсутствует	
B1epF	acaagatgatggtgctggggtc	dCB1e	B1epF/B1eR <sup>3</sup>	<i>Hinf</i> I – GANTC <sup>2</sup>	Сайт отсутствует	Настоящее исследование
B1eR	gcatctccagctgctccagat <sup>4</sup>					
Программа (для маркера dCB1e/ <i>Hinf</i> I): 94 °C – 3 мин 30 с; 37 циклов (94 °C – 45 с, 61 °C – 45 с, 72 °C – 45 с); 72 °C – 7 мин						
<b>Идентификация <i>Rht-B1p</i></b>						
Rht-B1p-F	acatggcggagctggtgt	–	Rht-B1p-F/ Rht-B1-R1	178 C→T	425 п. о.	Bazhenov et al., 2015
Rht-B1-R1	gccgagagaggacgat					
B1pR	catctccagctgctccagcttc	CB1p	B1epF/B1pR <sup>3</sup>	<i>Bst</i> HNI <sup>1</sup> : GCGC <sup>2</sup>	Сайт отсутствует	Настоящее исследование
Программа (для маркера CB1p/ <i>Bst</i> HNI): 94 °C – 3 мин 30 с; 30 циклов (94 °C – 45 с, 62 °C – 45 с, 72 °C – 45 с); 72 °C – 7 мин						
<b>Идентификация <i>Rht-B1c</i></b>						
Rht-B1c-F1	ggcaactcccaggagcg	–	Rht-B1c-F1/ Rht-B1c-R1	150 G <sup>↓2026 п.о.</sup> C	256 п. о.	Pearce et al., 2011
Rht-B1c-R1	gctctcgacccaggaggag					
Программа: 94 °C – 3 мин 30 с; 8 циклов (94 °C – 45 с, 61 °C с понижением на 0.5 °C на 1 цикл – 1 мин 30 с, 72 °C – 1 мин); 30 циклов (94 °C – 45 с, 57 °C – 45 с, 72 °C – 45 с); 72 °C – 7 мин						
<b>Идентификация <i>Rht-B1h</i></b>						
Rht-B1h.F	gaggcaaatcacgaagtact	–	Rht-B1h.F/ Rht-B1h.1R	–592 T <sup>↓197 п.о.</sup> C	247 п. о.	Li et al., 2013
Rht-B1h.1R	taccaaggatattcattccgtagga					
Rht-B1h.2R	cttatggcaaatggattccaaga	–	Rht-B1h.F/ Rht-B1h.2R		331 (остальные аллели – 134 п. о.)	
Программа: 94 °C – 3 мин 30 с; 8 циклов (94 °C – 45 с, 63 °C с понижением на 0.5 °C на 1 цикл – 1 мин 30 с, 72 °C – 1 мин); 30 циклов (94 °C – 45 с, 59 °C – 45 с, 72 °C – 45 с); 72 °C – 7 мин						
<b>Идентификация <i>Rht-B1i-1</i></b>						
B1i-MF1	cagacgatattaactggccgattga	–	B1i-MF1/ B1i-MR1	–366 A <sup>↓160 п.о.</sup> T	330 п. о.	Lou et al., 2016
B1i-MR1	gggagcggcagcgtagtagttga					
Программа: 94 °C – 3 мин 30 с; 37 циклов (94 °C – 45 с, 56 °C – 45 с, 72 °C – 45 с); 72 °C – 7 мин						
B1i-MF2	ctctaattggcgggatttc	–	B1i-MF2/ B1i-MR2	–366 A <sup>↓160 п.о.</sup> T	586 п. о. (остальные аллели – 426 п. о.)	Lou et al., 2016
B1i-MR2	cgtcctggactcgcgctcat					
Программа: 94 °C – 3 мин 30 с; 8 циклов (94 °C – 45 с, 66 °C с понижением на 0.5 °C на 1 цикл – 1 мин 30 с, 72 °C – 1 мин); 30 циклов (94 °C – 60 с, 62 °C – 60 с, 72 °C – 45 с); 72 °C – 7 мин						

<sup>1</sup> Вместо этих рестриктаз могут быть использованы их изоизомеры: *Bst*V11 (*Bse*XI, *Bbv*I), *Acc*361 (*Bve*I, *Bsp*MI), *Bst*HNI (*Asp*LEI, *Cfo*I, *Hin*6I, *Hin*P11, *Hsp*AI).

<sup>2</sup> В селективной области жирным шрифтом выделены те нуклеотиды в сайтах рестрикции, вариация которых позволяет выявлять необходимые аллели.

<sup>3</sup> Для этих комбинаций праймеров в качестве матрицы использованы продукты первого раунда Nested-PCR (разведение в 50 раз).

<sup>4</sup> Жирным шрифтом с подчеркиванием выделены модифицированные нуклеотиды в праймерах для dCAPS маркеров.

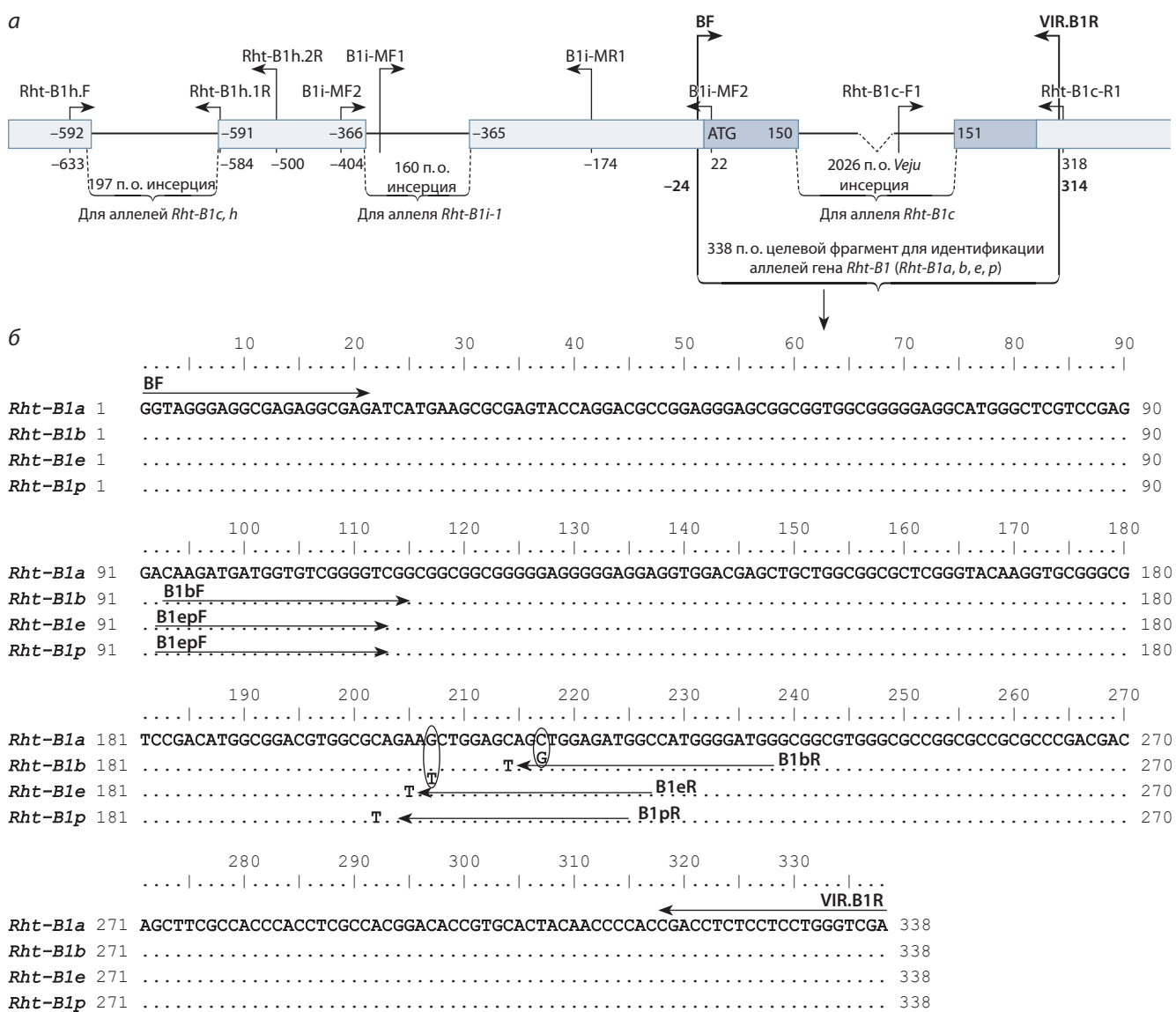
**Таблица 3.** Используемые в исследовании праймеры для идентификации аллелей гена *Rht-D1*

Название праймера	Последовательность 5'→3'	Название маркера	Комбинация праймеров	Селективная область	Способ идентификации целевого аллеля	Литературный источник
<b>Идентификация <i>Rht-D1b</i></b>						
DF	cgcgcaattattggccagagatag	–	DF/MR2	181 G→T	254	Ellis et al., 2002
MR2	ccccatggccatctcgagctgcta					
DF2	ggcaagcaaaagcttcgcg	–	DF2/WR2		Фрагмент отсутствует	
WR2	ggccatctcgagctgcac					
VIR.D1R	tgctctgacccaagacgacag	CD1b	DF/VIR.D1b	<i>Bst</i> SFI <sup>1</sup> : CTRYAG <sup>2</sup>	Сайт присутствует	Настоящее исследование

Программа (для маркера CD1b/*Bst*SFI): 94 °C – 3 мин 30 с; 8 циклов (94 °C – 45 с, 68 °C с понижением на 0.5 °C на 1 цикл – 1 мин 30 с, 72 °C – 1 мин); 30 циклов (94 °C – 45 с, 64 °C – 45 с, 72 °C – 45 с); 72 °C – 7 мин

Примечание. <sup>1</sup> Изоизомеры для рестриктазы *Bst*SFI: *Bfml*, *Sfcl*.

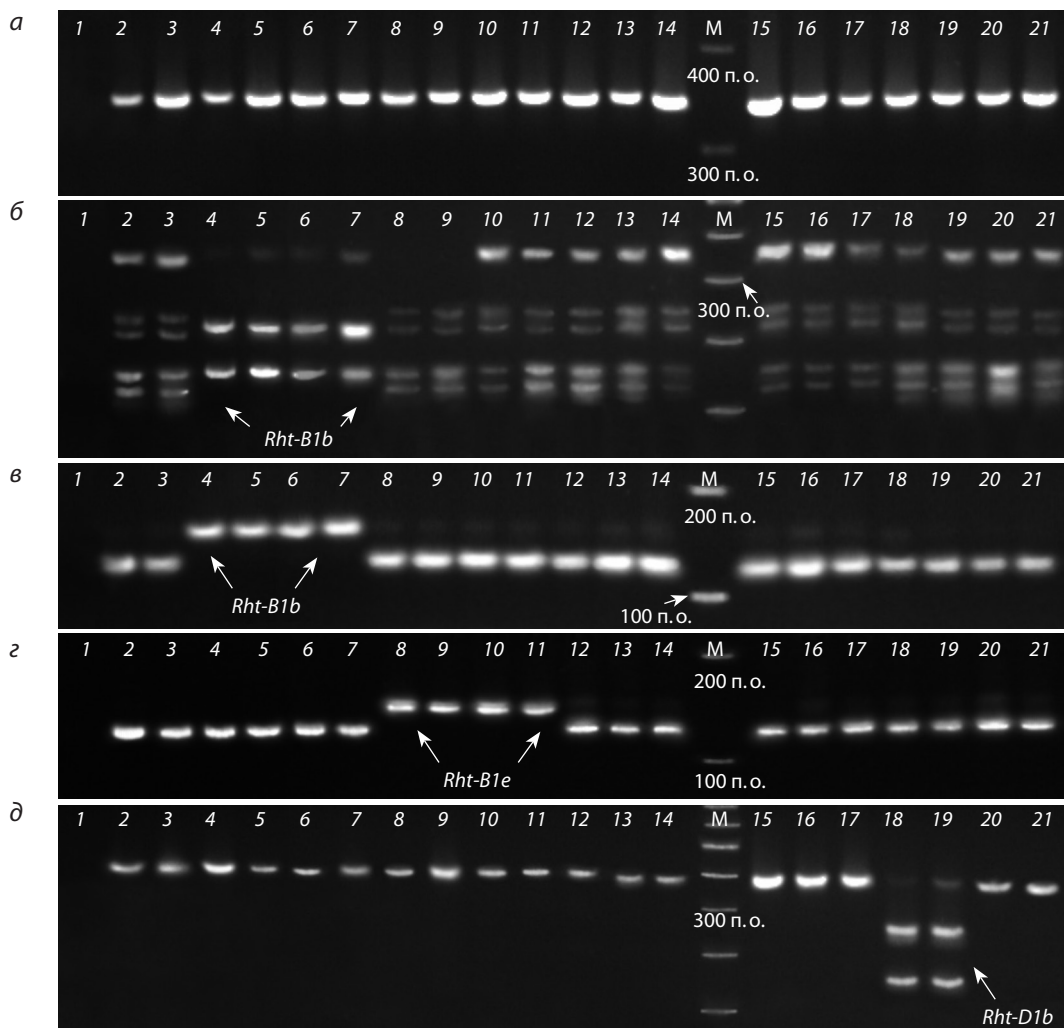
<sup>2</sup> В селективной области жирным шрифтом выделены те нуклеотиды в сайтах рестрикции, вариация которых позволяет выявлять необходимые аллели.



**Рис. 1.** Локализация праймеров для определения основных аллелей гена *Rht-B1*.

*а* – схема гена и соседних регионов с обозначенными местами локализации праймеров для первого раунда Nested-PCR и выявления инсерций у аллелей *Rht-B1c*, *Rht-B1h* и *Rht-B1i-1*; *б* – результаты выравнивания последовательностей, ограниченных праймерами BF/VIR.B1R (первый раунд Nested-PCR), и праймеры для идентификации точечных мутаций у аллелей *Rht-B1b*, *Rht-B1e*, *Rht-B1p* методом CAPS/dCAPS-анализа.

Границы вставки 197 п.о. и ретротранспозона *Veju* приведены согласно работе (Wen et al., 2013); границы вставки 160 п.о. взяты из (Lou et al., 2016). Кодированная область гена выделена темной заливкой, тонкими линиями обозначены ретротранспозон *Veju* и инсерции в 5'-фланкирующей области. Овалами на рис. 1, б отмечены замены нуклеотидов в dCAPS-праймерах.



**Рис. 2.** Идентификация нонсенс-мутаций в генах *Rht-B1* и *Rht-D1* с использованием разработанных нами CAPS- и dCAPS-маркеров.

*a* – амплификаты, полученные с праймерами BF/VIR.B1R, служащие матрицей для второго раунда вложенной ПЦР (Nested-PCR); *б* – идентификация аллелей: *Rht-B1b* – CAPS-маркер CB1b/BstV11; *в* – *Rht-B1b* – dCAPS-маркер dCB1b/Acc361; *г* – *Rht-B1e* – dCAPS-маркер dCB1e/HinfI; *д* – *Rht-D1b* – CAPS-маркер CD1b/BstSFI.

Цифрами обозначены образцы с различными аллелями *Rht-B1* и *Rht-D1*: 1 – отрицательный контроль ( $H_2O$ ); 2, 3 – Hongdongmai (дикий тип); 4, 5 – Красота (*Rht-B1b*, *Rht-D1a*); 6, 7 – Княжна (*Rht-B1b*, *Rht-D1a*); 8, 9 – Гром (*Rht-B1e*, *Rht-D1a*); 10, 11 – Веда (*Rht-B1e*, *Rht-D1a*); 12, 13 – Chris Mutant (*Rht-B1p*, *Rht-D1a*); 14, 15 – Триумф (*Rht-B1i-1*, *Rht-D1a*); 16, 17 – Chinese Spring (дикий тип); 18, 19 – Zheng 9023 (*Rht-B1h*, *Rht-D1b*); 20, 21 – Atlas 66 (*Rht-B1h*, *Rht-D1a*). М – маркер молекулярного веса 100 п.о. (СибЭнзим).

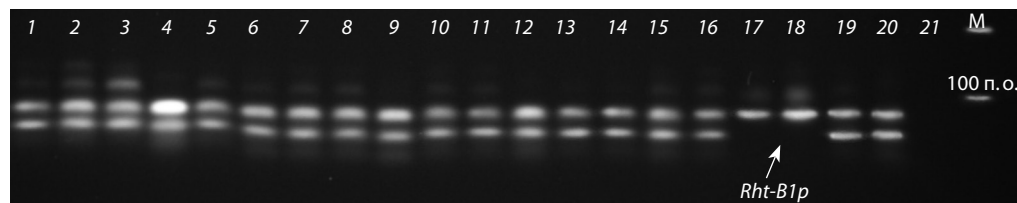
с 3'-концом праймера образовывал рестрикционный сайт GATTC, позволяющий отличить данную мутацию от всех остальных аллелей путем рестрикции *HinfI*. Для идентификации аллеля *Rht-B1b* был дополнительно сконструирован dCAPS-маркер dCB1b/Acc361 (см. рис. 1).

При проведении ПЦР в обычных условиях с использованием в качестве матрицы геномной ДНК мягкой пшеницы нам не удалось получить четких фрагментов для dCAPS-маркеров и CAPS-маркера CB1p/BstHNI (данные не представлены). Поэтому мы применили метод вложенной ПЦР – в качестве матрицы для второго раунда использовали продукты амплификации праймеров BF/VIR.B1R, которые фланкировали область локализации всех анализируемых точковых мутаций в гене *Rht-B1* (см. рис. 1).

В ходе апробации на выборке образцов мягкой пшеницы с известными аллелями генов короткостебельности

все разработанные маркеры с высокой эффективностью дифференцировали дикий тип *Rht-B1a*, *Rht-D1a* и мутантные варианты *Rht-B1b*, *Rht-B1e*, *Rht-B1p* и *Rht-D1b* (см. рис. 2 и 3).

Параллельно для определения нонсенс-мутаций у *Rht-B1b*, *Rht-B1e*, *Rht-B1p* и *Rht-D1b* в сравнении с диким типом были использованы аллель-специфичные праймеры, взятые из литературных источников (Ellis et al., 2002; Pearse et al., 2011; Bazhenov et al., 2015). При этом для идентификации каждой мутации брали две пары праймеров, одна из них детектировала мутантный вариант, другая – дикий тип и все остальные аллели. Показано, что для *Rht-B1b*, *Rht-B1e* и *Rht-D1b* результаты аллель-специфичной ПЦР в целом совпадают с данными CAPS- и dCAPS-анализа. Однако идентификация аллелей дикого типа *Rht-B1a* и *Rht-D1a* при помощи праймеров



**Рис. 3.** Идентификация аллеля *Rht-B1p* при помощи CAPS-маркера CB1p/BstHNI.

Стрелкой указаны генотипы с аллелем *Rht-B1p*, ПЦР-продукты которых не подверглись рестрикции. Цифрами обозначены образцы с различными аллелями генов *Rht-B1* и *Rht-D1*: 1, 2 – Hongdongmai (дикий тип); 3, 4 – Красота (*Rht-B1b*, *Rht-D1a*); 5, 6 – Княжна (*Rht-B1b*, *Rht-D1a*); 7, 8 – Гром (*Rht-B1e*, *Rht-D1a*); 9, 10 – Веда (*Rht-B1e*, *Rht-D1a*); 11, 12 – Триумф (*Rht-B1i-1*, *Rht-D1a*); 13, 14 – Chinese Spring (дикий тип); 15, 16 – Zheng 9023 (*Rht-B1h*, *Rht-D1b*); 17, 18 – Chris Mutant (*Rht-B1p*, *Rht-D1a*); 19, 20 – Atlas 66 (*Rht-B1h*, *Rht-D1a*); 21 – отрицательный контроль (H<sub>2</sub>O). М – маркер молекулярного веса 100 п.о. (СибЭнзим).

**Таблица 4.** Маркерные профили для идентификации аллелей генов короткостебельности *Rht-B1* и *Rht-D1* при помощи системы, предлагаемой в настоящем исследовании

Аллель (старое название гена)	Целевая мутация	CAPS/dCAPS-маркеры для выявления нонсенс-мутаций (0 – отсутствие сайта рестрикции, 1 – присутствие)					Комбинации STS-праймеров для выявления инсерций (размер продуктов амплификации указан в п. о.)				
		CB1b /BstV11	dCB1b /Acc361 <sup>1</sup>	dCB1e /HinfI <sup>1</sup>	CB1p /BstHNI <sup>1</sup>	CD1b /BstSFI	B1i-MF1 /MR1	B1i-MF2 /MR2	Rht-B1c-F1 /R1	Rht-B1h.F /1R	Rht-B1h.F /2R
<i>Rht-B1a</i>	Дикий тип	1	1	1	1	–	Нет ПЦР	426	Нет ПЦР	Нет ПЦР	134
<i>Rht-B1b</i> ( <i>Rht1</i> )	190 C→T	<b>0<sup>2</sup></b>	<b>0<sup>2</sup></b>	1	1	–	Нет ПЦР	426	Нет ПЦР	Нет ПЦР	134
<i>Rht-B1e</i> ( <i>Rht11</i> )	181 A→T	1	1	<b>0<sup>2</sup></b>	1	–	Нет ПЦР	426	Нет ПЦР	Нет ПЦР	134
<i>Rht-B1p</i> ( <i>Rht17</i> )	178 C→T	1	1	1	<b>0<sup>2</sup></b>	–	Нет ПЦР	426	Нет ПЦР	Нет ПЦР	134
<i>Rht-B1c</i> ( <i>Rht3</i> )	Инсерция 150 G <sup>12026 п.о.С</sup>	Нет ПЦР	Нет ПЦР	Нет ПЦР	Нет ПЦР	–	Нет ПЦР	426	<b>256<sup>2</sup></b>	<b>247<sup>2</sup></b>	<b>331<sup>2</sup></b>
<i>Rht-B1h</i>	Инсерция –592 T <sup>1197 п.о.С</sup>	1	1	1	1	–	Нет ПЦР	426	Нет ПЦР	<b>247<sup>2</sup></b>	<b>331<sup>2</sup></b>
<i>Rht-B1i-1</i>	Инсерция –366 A <sup>1160 п.о.С</sup>	1	1	1	1	–	<b>330<sup>2</sup></b>	<b>586<sup>2</sup></b>	Нет ПЦР	Нет ПЦР	134
<i>Rht-D1a</i>	Дикий тип	–	–	–	–	0	–	–	–	–	–
<i>Rht-D1b</i> ( <i>Rht2</i> )	181 G→T	–	–	–	–	<b>1<sup>2</sup></b>	–	–	–	–	–

<sup>1</sup> Для этих маркеров в качестве матрицы использованы продукты первого раунда Nested-PCR (разведение в 50 раз).

<sup>2</sup> Жирным выделены те продукты амплификации, наличие/отсутствие которых позволяет выявлять целевые аллели генов *Rht-B1* и *Rht-D1*.

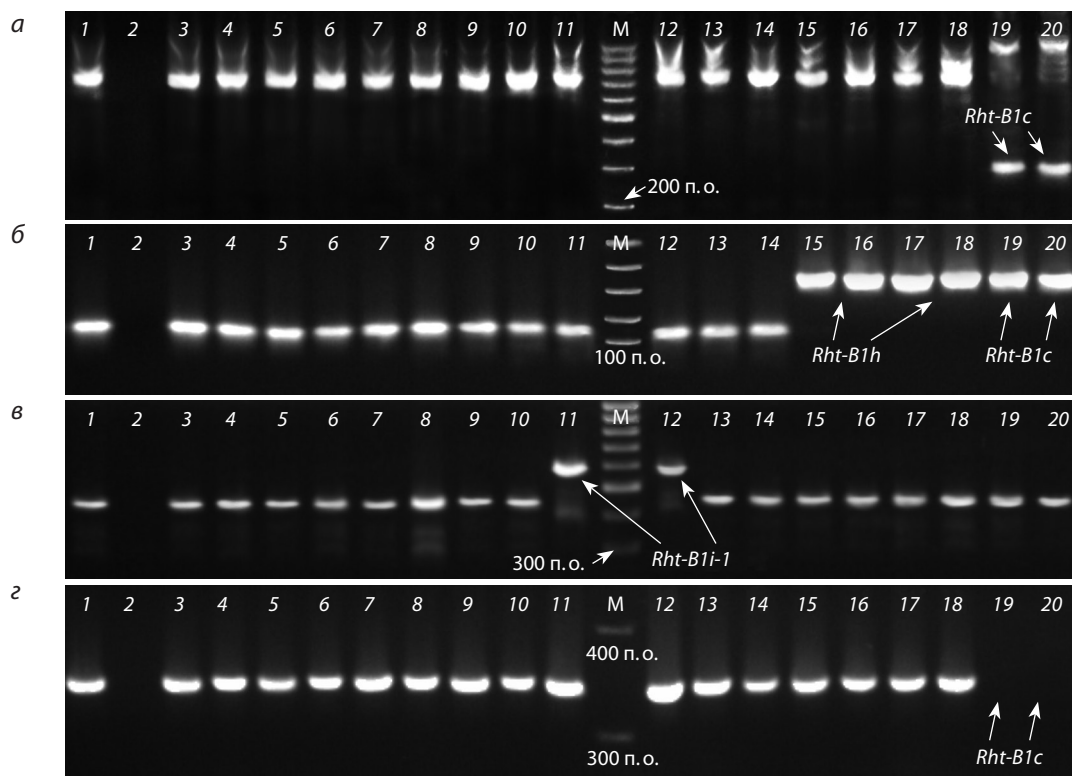
BF/WR и DF2/WR2 соответственно (Ellis et al., 2002) была сопряжена с определенными трудностями: плохой воспроизводимостью результатов и образованием слабо выраженных фрагментов у форм с *Rht-B1b* и/или *Rht-D1b* (Приложение 2). В случае *Rht-B1p* аллель-специфичная ПЦР в наших условиях оказалась неэффективной – при амплификации с праймерами Rht-B1p-F/R1 (Bazhenov et al., 2015) специфичный продукт образовывался и у форм с мутантными аллелями, и у форм с аллелями дикого типа (см. Приложение 2).

В исследовании также были привлечены пять пар STS-праймеров (Pearse et al., 2011; Li et al., 2013; Lou et al., 2016), позволяющие выявлять мутации, ассоциированные с наличием ретротранспозона в кодирующей области (аллель *Rht-B1c*), а также со вставками в промоторной зоне (*Rht-B1i-1*) и в 5'-фланкирующем участке (*Rht-B1h*).

Местоположение данных инсерций приведено на схеме гена *Rht-B1*, на ней также указаны праймеры для их детекции (см. рис. 1, а).

Для аллеля *Rht-B1i-1* использовали две пары праймеров (Lou et al., 2016), одна из которых (B1i-MF1/MR1) давала при наличии вставки специфичный фрагмент 330 п.о., а другая (B1i-MF2/MR2) амплифицировала фрагменты разных размеров у генотипов с инсерцией и без нее (см. табл. 2, 4, рис. 4, в). Для детекции аллеля *Rht-B1h* применяли праймеры Rht-B1h.F/R1, дающие специфичный продукт размером 247 п.о., и праймеры Rht-B1h.F/R2, генерирующие фрагменты разных размеров (см. табл. 2, 4, рис. 4, б) (Li et al., 2013). Поскольку этот аллель имеет общую вставку в 5'-фланкирующей области с аллелем *Rht-B1c*, для их дифференциации использовали специфичный к последовательности ретротранспозона прай-





**Рис. 4.** Идентификация аллелей, несущих вставки, для гена *Rht-B1* с помощью STS-праймеров.

ПЦР-продукты праймеров: *Rht-B1c-F1/R1*, специфичных для *Rht-B1c*; *Rht-B1h-MF1/MR2*, специфичных для *Rht-B1h* и *Rht-B1c*; *B1i-MF2/MR2*, специфичных для *Rht-B1i-1*.

Отсутствие ПЦР-продуктов праймеров *BF/VIR.B1R* у генотипов с аллелем *Rht-B1c*, несущих вставку в 2026 п. о.

Цифрами обозначены образцы с различными аллелями генов *Rht-B1* и *Rht-D1*: 1 – Красота (аллель *Rht-B1b*, *Rht-D1a*); 2 – отрицательный контроль ( $H_2O$ ); 3, 4 – Княжна (*Rht-B1b*, *Rht-D1a*); 5, 6 – Гром (*Rht-B1e*, *Rht-D1a*); 7, 8 – Веда (*Rht-B1e*, *Rht-D1a*); 9, 10 – Chris Mutant (*Rht-B1p*, *Rht-D1a*); 11, 12 – Триумф (*Rht-B1i-1*, *Rht-D1a*); 13, 14 – Chinese Spring (дикий тип); 15, 16 – Zheng 9023 (*Rht-B1h*, *Rht-D1b*); 17, 18 – Atlas 66 (*Rht-B1h*, *Rht-D1a*); 19, 20 – Tom Thumb (*Rht-B1c*, *Rht-D1a*). М – маркер молекулярного веса 100 п. о. + 1.5 т. п. о. (СибЭнзим).

мер *Rht-B1c-F1/R1* (см. табл. 2, 4, рис. 4, а) (Pearce et al., 2011). Дополнительным доказательством присутствия ретротранспозона может служить тот факт, что у генотипов с этой инсерцией при проведении первого раунда Nested-PCR с праймерами *BF/VIR.B1R* не происходит образования ПЦР-продуктов, что можно объяснить большим расстоянием между праймерами (см. рис. 4, з).

Проведенная нами апробация STS-маркеров показала полное соответствие между присутствием их диагностических фрагментов и составом аллелей, имеющихся у изученных генотипов (см. рис. 4). У образцов Atlas 66 и Zheng 9023, содержащих *Rht-B1h*, присутствовали продукты амплификации, указывающие на наличие инсерции в 5'-фланкирующей области. У образца Триумф, несущего аллель *Rht-B1i-1*, увеличивающий высоту растения, с помощью молекулярных маркеров выявлена вставка в области промотора, а у сорта Tom Thumb (*Rht-B1c*) – ретротранспозона в кодирующей последовательности и вставка в 5'-фланкирующей области. Следует отметить, что при идентификации ретротранспозона при помощи праймеров *Rht-B1c-F1/R1* наряду с образованием фрагмента ожидаемого размера наблюдали и у Tom Thumb (*Rht-B1c*), и у всех остальных генотипов появление неспецифичных продуктов большего размера (см. рис. 4, а).

Рассматривая в целом систему предложенных молекулярных маркеров, нужно отметить, что с ее помощью можно составить маркерный профиль для каждого из изученных нами аллелей генов *Rht-B1* и *Rht-D1*, т. е. получить однозначный ответ о присутствии одного из перечисленных выше аллелей генов короткостебельности, *Rht-B1* и *Rht-D1*, в том или ином генотипе. Маркерные профили аллелей представлены в табл. 4.

### Заключение

В результате исследований предложена система молекулярных маркеров для идентификации наиболее часто используемых в селекции мягкой пшеницы аллелей генов короткостебельности *Rht-B1* и *Rht-D1*. Ее основу составляют разработанные нами CAPS- и dCAPS-маркеры нонсенс-мутаций этих генов, которые ранее определяли при помощи аллель-специфической ПЦР (Ellis et al., 2002; Pearce et al., 2011; Bazhenov et al., 2015, 2019). Для идентификации инсерций использовано пять STS-маркеров, подобранных по литературным источникам (Pearce et al., 2011; Li et al., 2013; Lou et al., 2016).

Апробация CAPS- и dCAPS-маркеров при генотипировании образцов мягкой пшеницы из коллекции ВИР, содержащих мутантные аллели *Rht-B1b*, *Rht-B1c*,

*Rht-B1e*, *Rht-B1h*, *Rht-B1i-1*, *Rht-B1p* и *Rht-D1b* и аллели дикого типа, показала полное соответствие полученных результатов ожидаемым. Наличие аллелей *Rht-B1b*, *Rht-B1e*, *Rht-B1p* и *Rht-D1b* также подтверждено при помощи аллель-специфичной ПЦР с праймерами, широко применяемыми в научных исследованиях и селекционных программах (Куркиев и др., 2008; Pestsova et al., 2008; Divashuk et al., 2013; Li et al., 2013; Lou et al., 2016).

Основное преимущество нашей системы молекулярных маркеров заключается в хорошей воспроизводимости результатов и однозначной их интерпретации. При проведении CASP/dCAPS-анализа не возникает проблем с контролем успешности протекания ПЦР-реакции, так как продукты амплификации образуются у всех генотипов, а различия между аллелями выявляются уже после обработки рестриктазами. Кроме того, несмотря на высокую стоимость рестриктаз, CASP/dCAPS-анализ менее затратен, поскольку для детекции каждого аллеля нет необходимости проводить две независимые ПЦР в нескольких повторностях. Исследования осуществляют на стандартном оборудовании для ПЦР и с использованием электрофореза в агарозных гелях. Они могут быть реализованы в небольших ориентированных на практику лабораториях. При появлении сведений о новых точковых мутациях в генах короткостебельности *Rht-B1* и *Rht-D1* для их идентификации может быть применен аналогичный подход по разработке CAPS/dCAPS-маркеров.

## Список литературы / References

Антонова О.Ю., Клименко Н.С., Рыбаков Д.А., Фомина Н.А., Желтова В.В., Новикова Л.Ю., Гавриленко Т.А. SSR-анализ современных российских сортов картофеля с использованием ДНК номенклатурных стандартов. *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(4):77-96. DOI 10.30901/2658-6266-2020-4-o2. [Antonova O.Yu., Klimenko N.S., Rybakov D.A., Fomina N.A., Zheltova V.V., Novikova L.Yu., Gavrilenko T.A. SSR analysis of modern russian potato varieties using DNA samples of nomenclatural standards. *Biotekhnologiya i Seleksiya Rasteniy = Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(4):77-96. DOI 10.30901/2658-6266-2020-4-o2. (in Russian)]

Куркиев К.У., Тырышкин Л.Г., Колесова М.А., Куркиев У.К. Идентификация генов короткостебельности *Rht2* и *Rht8* у образцов гексаплоидного тритикале с помощью ДНК маркеров. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2008;12(3):372-377. [Kurkiev K.U., Tyryshkin L.G., Kolesova M.A., Kurkiev U.K. Identification of *Rht2* and *Rht8* genes for semidwarfness in hexaploid triticale with use of DNA markers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2008;12(3):372-377. (in Russian)]

Лукьяненко П.П., Жогин А.Ф. Использование индуцированных карликовых мутантов в селекции озимой пшеницы. *Селекция и семеноводство*. 1974;1:13-17. [Lukyanenko P.P., Zhogin A.F. Use of induced dwarf mutants in winter wheat breeding. *Seleksiya i Semenovodstvo = Breeding and Seed Industry*. 1974;1:13-17. (in Russian)]

Рабинович С.В. Селекционная ценность мутанта Краснодарский карлик 1. В: Химический мутагенез в создании сортов с новыми свойствами. М.: Наука, 1986;88-92. [Rabinovich S.V. The breeding value of the Krasnodarskiy karlik 1 mutant. In: Chemical Mutagenesis in the Creation of Varieties with New Properties. Moscow: Nauka Publ., 1986;88-92. (in Russian)]

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):1-8. DOI 10.1007/s11032-015-0407-1.

Bazhenov M.S., Nazarova L.A., Chernook A.G., Divashuk M.G. Improved marker for the *Rht-B1p* dwarfing allele in wheat. In: Current Challenges in Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology: Proc. of the Fifth International Scientific Conference PlantGen2019 June 24–29, 2019. Novosibirsk, Russia. Novosibirsk: ICG SB RAS. 2019;190-192. DOI 10.18699/ICG-PlantGen2019-61.

Borojevic K., Borojevic Ks. The transfer and history of “reduced height genes” (*Rht*) in wheat from Japanto Europe. *J. Hered.* 2005;96(4):455-459. DOI 10.1093/jhered/esi060.

Börner A., Plaschke J., Korzun V., Worland A.J. The relationships between the dwarfing genes of wheat and rye. *Euphytica*. 1996;89(1):69-75. DOI 10.1007/BF00015721.

Divashuk M.G., Bepalova L.A., Vasilyev A.V., Fesenko I.A., Puzyrnaya O.Y., Karlov G.I. 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.

Divashuk M.G., Vasilyev A.V., Bepalova L.A., Karlov G.I. Identity of the *Rht-11* and *Rht-B1e* reduced plant height genes. *Russ. J. Genet.* 2012;48(7):761-763. DOI 10.1134/S1022795412050055.

Ellis M.H., Rebetzke G.J., Chandler P., Bonnett D., Spielmeier W., Richards R.A. 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.

Ellis M.H., Spielmeier W., Gale K., Rebetzke G., Richards R. “Perfect” markers for the *Rht-B1b* and *Rht-D1b* dwarfing genes in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2002;105(6-7):1038-1042. DOI 10.1007/s00122-002-1048-4.

Evans L.T. Feeding the Ten Billion: Plants and Population Growth. Cambridge: Cambridge University Press, 1998.

Flintham J.E., Gale M.D. The Tom Thumb dwarfing gene *Rht3* in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1983;66(3-4):249-256. DOI 10.1007/BF00251155.

Gale M.D., Marshall G.A. The chromosomal location of *Gai 1* and *Rht 1*, genes for gibberellin insensitivity and semi-dwarfism, in a derivative of Norin 10 wheat. *Heredity*. 1976;37(2):283-289. DOI 10.1038/hdy.1976.88.

Gale M.D., Youssefian S., Russell G.E. Dwarfing genes in wheat. In: Russel G.E. (Ed.). Progress in Plant Breeding. London: Butterworths-Heinemann, 1985;1-35.

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.

Guedira M., Brown-Guedira G., Van Sanford D., Sneller C., Souza E., Marshall D. Distribution of *Rht* genes in modern and historic winter wheat cultivars from the Eastern and Central USA. *Crop Sci.* 2010;50(5):1811-1822. DOI 10.2135/cropsci2009.10.0626.

Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 1999;41:95-98.

Hedden P. The genes of the green revolution. *Trends Genet.* 2003;19(1):5-9. DOI 10.1016/S0168-9525(02)00009-4.

Korzun V., Röder M.S., Ganai M.W., Worland A.J., Law C.N. Genetic analysis of the dwarfing gene (*Rht8*) in wheat. Part I. Molecular mapping of *Rht8* on the short arm of chromosome 2D of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 1998;96(8):1104-1109. DOI 10.1007/s001220050845.

Li A., Yang W., Guo X., Liu D., Sun J., Zhang A. Isolation of a gibberellin-insensitive dwarfing gene, *Rht-B1e*, and development of an allele-specific PCR marker. *Mol. Breed.* 2012;30(3):1443-1451. DOI 10.1007/s11032-012-9730-y.

Li A., Yang W., Lou X., Liu D., Sun J., Guo X., Wang J., Li Y., Zhan K., Ling H.Q., Zhang A. Novel natural allelic variations at the *Rht-1* loci in wheat. *J. Integr. Plant Biol.* 2013;55(11):1026-1037. DOI 10.1111/jipb.12103.

- Lou X., Li X., Li A., Pu M., Shoaib M., Liu D., Sun J., Zhang A., Yang W. The 160 bp insertion in the promoter of *Rht-B1i* plays a vital role in increasing wheat height. *Front. Plant Sci.* 2016;7(307): 1-13. DOI 10.3389/fpls.2016.00307.
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of gene symbols for wheat: 2015–2016 supplement. 2016. Available at: <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2015.pdf>.
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Xia X.C., Raupp W.J. Catalogue of gene symbols for wheat: 2018 supplement. 2018. Available at: <https://wheat.pw.usda.gov/GG3/sites/default/files/Catalogue%20of%20Gene%20Symbols%20for%20Wheat%20-%20supplement2018-2019.pdf>.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of gene symbols for wheat. 2013. Available at: <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/download.jsp>.
- Neff M.M., Neff J.D., Chory J., Pepper A.E. dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *Plant J.* 1998;14(3):387-392. DOI 10.1046/j.1365-3113.1998.00124.x.
- Neff M.M., Turk E., Kalishman M. Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis. *Trends Genet.* 2002;18(12):613-615. DOI 10.1016/s0168-9525(02)02820-2.
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics.* 2012;28(8):1166-1167. DOI 10.1093/bioinformatics/bts091.
- Pearce S., Saville R., Vaughan S.P., Chandler P.M., Wilhelm E.P., Sparks C.A., Al-Kaff N., Korolev A., Boulton M.I., Phillips A.L., Hedden P., Nicholson P., Thomas S.G. Molecular characterization of *Rht-1* dwarfing genes in hexaploid wheat. *Plant Physiol.* 2011; 157(4):1820-1831. DOI 10.1104/pp.111.183657.
- 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., Sadhakar D., Christou P., Snape J.W., Gale M.D., Harberd N.P. 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature.* 1999;400(6741):256-261. DOI 10.1038/22307.
- Pestsova E., Korzun V., Börner A. Validation and utilisation of *Rht* dwarfing gene specific. *Cereal Res. Commun.* 2008;36(2):235-246. DOI 10.1556/CRC.36.2008.2.4.
- Rasheed A., Wen W., Gao F., Zhai S., Jin H., Liu J., Guo Q., Zhang Y., Dreisigacker S., Xia X., He Z. Development and validation of KASP assays for genes underpinning key economic traits in bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2016;129(10):1843-1860. DOI 10.1007/s00122-016-2743-x.
- Shavrukov Y.N. CAPS markers in plant biology. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2016;6(3):279-287. DOI 10.1134/S2079059716030114.
- Sukhikh I.S., Vavilova V.Y., Blinov A.G., Goncharov N.P. Diversity and phenotypical effect of the allele variants of dwarfing *Rht* genes in wheat. *Russ. J. Genet.* 2021;57(2):127-138. DOI 10.1134/S1022795421020101.
- Thomas S.G. Novel *Rht-1* dwarfing genes: tools for wheat breeding and dissecting the function of DELLA proteins. *J. Exp. Bot.* 2017; 68(3):354-358. DOI 10.1093/jxb/erw509.
- Tian X., Wen W., Xie L., Fu L., Xu D., Fu C., Wang D., Chen X., Xia X., Chen Q., He Z., Cao S. Molecular mapping of reduced plant height gene *Rht24* in bread wheat. *Front. Plant Sci.* 2017;8:1-9. DOI 10.3389/fpls.2017.01379.
- Untergasser A., Nijveen H., Rao X., Bisseling T., Geurts R., Leunissen J.A. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(2):71-74. DOI 10.1093/nar/gkm306.
- Wen W., Deng Q., Jia H., Wei L., Wei J., Wan H., Yang L., Cao W., Ma Z. Sequence variations of the partially dominant DELLA gene *Rht-B1c* in wheat and their functional impacts. *J. Exp. Bot.* 2013; 64(11):3299-3312. DOI 10.1093/jxb/ert183.
- Wilhelm E.P., Mackay I.J., Saville R.J., Korolev A.V., Balfourier F., Greenland A.J., Boulton M.I., Powell W. Haplotype dictionary for the *Rht-1* loci in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2013;126(7):1733-1747. DOI 10.1007/s00122-013-2088-7.
- Wu J., Kong X., Wan J., Liu X., Zhang X., Guo X., Zhou R., Zhao G., Jing R., Fu X., Jia J. Dominant and pleiotropic effects of a *GAI* gene in wheat results from a lack of interaction between DELLA and GID1. *Plant Physiol.* 2011;157(4):2120-2130. DOI 10.1104/pp.111.185272.
- Würschum T., Langer S.M., Longin C.F.H., Tucker M.R., Leiser W.L. A modern Green Revolution gene for reduced height in wheat. *Plant J.* 2017;92(5):892-903. DOI 10.1111/tpj.13726.
- Youssefian S., Kirby E.J.M., Gale M.D. Pleiotropic effects of the GA-insensitive *Rht* dwarfing genes in wheat. 2. Effects on leaf, stem, ear and floret growth. *Field Crops Res.* 1992;28(3):191-210. DOI 10.1016/0378-4290(92)90040-G.
- Zhang X., Yang S., Zhou Y., He Z., Xia X. Distribution of the *Rht-B1b*, *Rht-D1b* and *Rht8* reduced height genes in autumn-sown Chinese wheats detected by molecular markers. *Euphytica.* 2006;152(1): 109-116. DOI 10.1007/s10681-006-9184-6.

#### ORCID ID

I.V. Porotnikov [orcid.org/0000-0001-5841-8803](https://orcid.org/0000-0001-5841-8803)  
O.P. Mitrofanova [orcid.org/0000-0002-9171-2964](https://orcid.org/0000-0002-9171-2964)  
O.Yu. Antonova [orcid.org/0000-0001-8334-8069](https://orcid.org/0000-0001-8334-8069)

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ВИР по проектам № 0481-2019-0002 и 0662-2019-0006.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 01.10.2021. После доработки 31.10.2021. Принята к публикации 03.11.2021.