

Генетика и селекция растений Genetics and plant breeding

DOI 10.22363/2312-797X-2020-15-1-62-85
UDC 633.1:575

Research article/Научная статья

Molecular analysis of gibberellin receptor gene *GID1* in *Dasypyrum villosum* and development of DNA marker for its identification

**Olga V. Razumova^{1,2}, Mikhail S. Bazhenov¹, Ekaterina A. Nikitina¹,
Lyubov A. Nazarova¹, Dmitry V. Romanov¹, Anastasya G. Chernook¹,
Pavel A. Sokolov³, Viktoria M. Kuznetsova¹, Oleg G. Semenov⁴,
Gennady I. Karlov^{1,3}, Petr N. Kharchenko¹, Mikhail G. Divashuk^{1,3*}**

¹All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russian Federation

²Moscow Botanical Garden of Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

³Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy,
Moscow, Russian Federation

⁴Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russian Federation

*Corresponding author: divashuk@gmail.com

Abstract. *Dasypyrum villosum* is an annual cereal used as a donor of agronomic traits for wheat. Productivity is one of the most important traits that breeding is aimed at. It is a very complex trait, the formation of which is influenced by many different factors, both internal (the genotype of the plant) and external. The genes responsible for the gibberellin sensitivity played a large role in multiplying yields of cereal crops. Another such gene is the *Gid1*, which encodes a receptor for gibberellins. This article compares the DNA sequences of the *Gid1* gene obtained from six *Dasypyrum villosum* samples. Using a sequence of wheat and rye taken from the GenBank database (NCBI), we selected primers for regions of different genomes (A, B, and D subgenomes of wheat and the R genome of rye), and carried out a polymerase chain reaction on *D. villosum* accessions of diverse geographical origin. The resulting PCR product was sequenced by an NGS method. Based on the assembled sequences, DNA markers have been created that make it possible to differentiate these genes of the V genome and homologous genes of wheat origin. Using monosomic addition, substitution, and translocation wheat lines, the localization of the *Gid1* gene of *D. villosum* was established on the long arm of the first V chromosome. A phenotypic assessment of common wheat lines carrying substituted, translocated, or added *D. villosum* chromosomes in their karyotype was performed. Tendency of disappearance of the first chromosome of *D. villosum* in the lines with added chromosomes was revealed.

Key words: *Dasypyrum villosum*, remote hybridization, *Gid1*, gibberellin receptor

© Разумова О.В., Баженов М.С., Никитина Е.А., Назарова Л.А., Романов Д.В., Черноок А.Г., Соколов П.А., Кузнецова В.М., Семенов О.Г., Карлов Г.И., Харченко П.Н., Дивашук М.Г., 2019.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Conflicts of interest

The authors declared no conflicts of interest.

Research funding

The research was performed as part of state assignment No. 0574–2019–0001.

Author contributions

OVR wrote the manuscript; EAN, LAN, DVR, AGC performed laboratory work (DNA isolation, PCR, electrophoresis, plant handling) and analyzed the data; MSB designed primers, developed marker, analyzed sequencing data; PAS and VMK handled plants; OGS, GIK, PNK, MGD developed and designed experiments, managed the research. All authors read and approved the final manuscript.

Article history:

Received: 27 December 2019. Accepted: 13 January 2020

For citation:

Razumova OV, Bazhenov MS, Nikitina EA, Nazarova LA, Romanov DV, Chernook AG, Sokolov PA, Kuznetsova VM, Semenov OG, Karlov GI, Kharchenko PN, Divashuk MG. Molecular analysis of gibberellin receptor gene *GID1* in *Dasyphyrum villosum* and development of DNA marker for its identification. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*. 2020; 15(1):62–85. doi: 10.22363/2312-797X-2020-15-1-62-85

Молекулярный анализ гена *GID1* у *Dasyphyrum villosum* и создание ДНК-маркера для его идентификации

О.В. Разумова^{1, 2}, М.С. Баженов¹, Е.А. Никитина¹, Л.А. Назарова¹,
Д.В. Романов¹, А.Г. Черноок¹, П.А. Соколов³, В.М. Кузнецова¹,
О.Г. Семенов⁴, Г.И. Карлов^{1, 3}, П.Н. Харченко¹, М.Г. Дивашук^{1, 3*}

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии,
г. Москва, Российская Федерация

²Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН,
г. Москва, Российская Федерация

³Российский государственный аграрный университет — МСХА имени К.А. Тимирязева,
г. Москва, Российская Федерация

⁴Российский университет дружбы народов, г. Москва, Российская Федерация
*divashuk@gmail.com

Аннотация. *Dasyphyrum villosum* (VV) — однолетний злак, зарекомендовавший себя в качестве донора хозяйственно-ценных признаков для пшеницы. Один из важнейших показателей, на который направлена селекция, — урожайность, являющаяся сложным, комплексным признаком. На его формирование влияет множество различных факторов. Большую роль в росте урожайности злаковых культур сыграли гены, регулирующие физиологический ответ растений на гиббереллины, одним из которых стал ген *Gid1*, являющийся рецептором активных форм этих фитогормонов. Приведено сравнение частичных ДНК-последовательностей гена *Gid1*, секвенированных у двух образцов *Dasyphyrum villosum*. Используя последовательности пшеницы и ржи, взятые из базы данных GenBank (NCBI), подобрали праймеры на участки разных геномов (субгеномы А, В и D пшеницы и геном R ржи) и провели полимеразную цепную реакцию на образцах дазипирума мохнатого различного происхождения. Полученный ПЦР-продукт был секвенирован методом NGS. На основе секвенированных нуклеотидных последовательностей создан ДНК-маркер, позволяющий дифференцировать данные гены генома V и гомологичные гены пшеничного

происхождения. С использованием моносомно-дополненных, замещенных и транслоцированных линий пшеницы впервые установлена локализация гена *Gid1* на хромосомах *Dasypyrum villosum*. Показано расположение данного гена на длинном плече первой хромосомы генома V (1VL). Проведена фенотипическая оценка линий мягкой пшеницы, имеющих в своем кариотипе замещенные, транслоцированные или дополненные хромосомы *Dasypyrum villosum*.

Ключевые слова: дазипирум мохнатый, *Dasypyrum villosum*, отдаленная гибридизация, *Gid1*, рецептор, гиббереллиновая кислота

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания № 0574–2019–0001.

Информация о вкладе каждого автора: О.В. Разумова — написание текста статьи, Е.А. Никитина, Л.А. Назарова, Д.В. Романов, А.Г. Черноок — выделение ДНК, постановка ПЦР, электрофорезов, уход за растениями, анализ результатов, М.С. Баженов — дизайн праймеров, разработка маркера, анализ данных секвенирования, П.А. Соколов, В.М. Кузнецова — уход за растениями, О.Г. Семенов, Г.И. Карлов, П.Н. Харченко, М.Г. Дивашук — разработка и дизайн эксперимента, общее руководство исследованием, подготовка статьи. Все авторы — итоговая корректировка рукописи.

История статьи:

Поступила в редакцию: 27 декабря 2019 г. Принята к публикации: 13 января 2020 г.

Для цитирования:

Разумова О.В., Баженов М.С., Никитина Е.А., Назарова Л.А., Романов Д.В., Черноок А.Г., Соколов П.А., Кузнецова В.М., Семенов О.Г., Карлов Г.И., Харченко П.Н., Дивашук М.Г. Молекулярный анализ гена *GID1* у *Dasypyrum villosum* и создание ДНК-маркера для его идентификации // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агронимия и животноводство. 2020. Т. 15. № 1. С. 62–85. doi: 10.22363/2312-797X-2020-15-1-62-85

Introduction

Common wheat (*Triticum aestivum* $2n = 6x = 42$) is one of the world's major crops. According to the FAO¹, in 2019, world wheat production was estimated at 766 million tons, which was a record high. However, considering the need to provide products for the growing population, wheat productivity should have been increased by 4 to 76% by 2050, according to various forecasts [1]. It is the increase in productivity, and not the expansion of sown areas, that is recognized as the optimal strategy for ensuring food security worldwide. One way to increase productivity is to use wild varieties to transmit valuable agronomic genes to elite crops. *Dasypyrum villosum* ($2n = 2x = 14$, VV) is an annual cereal of Triticeae family, it grows in mid-sea region, southwestern Asia and Russia. Species of *Dasypyrum* genus have approved themselves as a reliable source of resistance genes to biotic [2, 3] and abiotic [4] stress. As a rule, gene transfer from *Dasypyrum* to common wheat occurs through the use of lines with substituted or translocated chromosomes [5–7]; this method has been widely used from the end of the last century to the present day [8–12].

The influence of short-stem genes on wheat productivity has been shown in a number of studies [13, 14]. Moreover, one of the key factors behind the so-called 'green revolution' in agriculture was creation of dwarf wheat varieties using *Rht* (*Reduced height*) dwarfing genes [15, 16]. In addition to reducing yield losses due to lodging resistance, dwarfing

¹ Cereal production in the world can reach a record level in 2019. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available from: <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/ru/> [Accessed 17 December 2019]

genes contribute to increased productivity due to better redistribution of assimilates in favor of spike and reduced sprouting due to impaired synthesis of gibberellins or sensitivity to these phytohormones, which play a key role in a wide range of plant growth and development processes, including of fruit and seed formation [17]. Low plant height can be achieved in different ways; however, one of the key factors is a complex interaction of DELLA proteins with other proteins and gibberellins. The *Gid1* gene (Gibberellin Insensitive Dwarf 1) encodes a protein that is a receptor for gibberellins. Active forms of gibberellins, joining the GID1 receptor, changes its conformation so that it acquires ability to bind to DELLA proteins. By binding to GID1, DELLA proteins are modified by ubiquitin and destroyed by proteasome, which promotes plant growth. Absence of binding, for any reason, leads to accumulation of DELLA proteins and loss of plant sensitivity to gibberellic acid [17, 18]. Thus, in order to reduce plant growth by altering the components of the gibberellin-GID1-DELLA system, it is necessary to increase stability of DELLA proteins. One of the possible ways to achieve this goal is to influence the *Gid1* gene to reduce DELLA binding capabilities, which demonstrates the need for a deeper study of allelic variants of these genes in wheat and its wild varieties.

The aim of our work was sequencing of the *Gid1* gene sequences affecting plant height in two *Dasypyrum villosum* accessions, determining its localization on chromosomes and creating a DNA marker for differentiation of wheat genes and *D. villosum* genes.

Materials and methods

The *Gid1* gene was sequenced using two accessions of *Dasypyrum villosum* obtained from the collection of the Western Regional Plant Introduction Station, Washington State University (W621717, PI 598390). To map genes onto chromosomes, we used a series of monosomic, addition substitution, and translocation lines of common wheat cv. Chinese spring obtained from Nanjing Agricultural University (NAU), as well as kindly provided by Dr. W. Jon Raupp of Wheat Genetics Resource Center Kansas Wheat Innovation Center, Kansas State University (KSU) and Adam J. Lukaszewski (AJL), Professor of Genetics Dept. of Botany & Plant Sciences University of California (Table 1).

Table 1

Studied wheat lines with *Dasypyrum villosum* genetic material

Accession number	Aberration	Chromosome	Chromosome source	Origin	Author
7677	addition	1V#3	Sicilian	KSU	AJL
7679	addition	3V#3	Sicilian	KSU	AJL
7680	addition	4V#3	Sicilian	KSU	AJL
7681	addition	5V#3	Sicilian	KSU	AJL
7682	addition	6V#3	Sicilian	KSU	AJL
7683	addition	7V#3	Sicilian	KSU	AJL
7509	addition	1V#1	Italian	KSU	Sears
7510	addition	2V#1	Greek	KSU	Sears
7511	addition	4V#1	Greek	KSU	Sears
7512	addition	5V#1	Greek	KSU	Sears

Continuation table 1

Accession number	Aberration	Chromosome	Chromosome source	Origin	Author
7513	addition	6V#1	Italian	KSU	Sears
7514	addition	7V#1	Italian	KSU	Sears
3891/89	substitution	1V(1A)	Italian	AJL	AJL
86/11	substitution	3V(3B)	Sicilian	AJL	AJL
1360/07	substitution	3V(3D)	Sicilian	AJL	AJL
2333/89	substitution	5V(5D)	Sicilian	AJL	AJL
1411/94	substitution	6V(6B)	Sicilian	AJL	AJL
1415/94	substitution	6V(6A)	Sicilian	AJL	AJL
3889/89	substitution	7V(7A)	Italian	AJL	AJL
6661	substitution	6V#2 [6A CS]	Chinese	KSU	NAU
5585	translocation	T6AL·6V#2S T2AS.2AL-2R#3L	Chinese	KSU	NAU
5594	translocation	T4DS·4V#3L	Sicilian	KSU	KSU
5595	translocation	T4DL·4V#3S	Sicilian	KSU	KSU
5615	translocation	T1DS·1V#3L	Sicilian	KSU	KSU
5616	translocation	T1DL·1V#3S	Sicilian	KSU	KSU
5634	translocation	T2BS·2V#3L	Sicilian	KSU	KSU
5636	translocation	T3DL·3V#3S	Sicilian	KSU	KSU
5637	translocation	T3DS·3V#3L	Sicilian	KSU	KSU
5638	translocation	T5DL·5V#3S	Sicilian	KSU	KSU
5639	translocation	T7DL·7V#3S	Sicilian	KSU	KSU
5640	translocation	T7DS·7V#3L	Sicilian	KSU	KSU
1438/94	translocation	6BS.6VL	Sicilian	AJL	AJL
3214/96	translocation	6AS.6VL	Un know	AJL	AJL
853/11	translocation	3V.3BL+3B	Sicilian	AJL	AJL

Part of the samples with genetic material of *D. villosum* was grown in the greenhouse of Center for Molecular Biotechnology of Russian Timiryazev State Agrarian University for preliminary assessment of phenotypic effects. Plants were evaluated for such traits as height of the main stem, length of the main spike, tillering and resistance to powdery mildew. Statistical data processing was carried out using Microsoft Excel analysis package, the calculations were performed using the ready-made functions included in the analysis package.

DNA was isolated according the CTAB method [19] from young lyophilized dried leaves. Primers were selected in the Primer BLAST NCBI program. The PCR mixture consisted of the following components (concentration of the components in the final mixture): 1 × LR buffer (pH = 9.3), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 2 μM of each primer, 0.04 units/μl LR Plus polymerase, 0.02 units/μl Taq polymerase, 4 ng/μl template DNA. The volume of the PCR mixture was 25 μl. PCR was performed under the following temperature conditions: 94 °C — 5 min; 36 cycles 94 °C — 30 sec, 58 °C — 30 sec, 72 °C — 2 min; 72 °C — 5 min.

The resulting PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel with TBE buffer supplemented with ethidium bromide. Electrophoregrams were visualized in ultraviolet light using a gel documentation system.

PCR products obtained using *D. villosum* DNA were transferred for NGS sequencing after checking their quality by electrophoresis. Sequencing using Illumina technology was performed at Genomed Company. DNA libraries were prepared using the Swift 2S™ Turbo DNA Library Kit. During preparation of the DNA library, PCR products obtained from different samples of *D. villosum* were labeled with individual barcodes. Sequencing was performed on a MiSeq System. After reading barcodes, the sequencing results were obtained for each sample separately.

Quality of the sequencing results was evaluated using FastQC software. The contigs were compiled from paired-end reads using SPAdes 3.13.0 software package [20]. To identify polymorphisms present in heterozygous state, the obtained contig sequences were used to map the initial reads on them using SNAP program [21]. Freebayes software (Garrison, 2012) was used to detect single nucleotide polymorphisms and small insertions and deletions. Identified polymorphisms were introduced into the gene sequence using Bcftools (<https://github.com/samtools/bcftools>), and thus an alternative sequence for each contig was obtained. Alignment of the obtained contigs of the *Dasypyrum villosum* *Gid1* gene to the sequence of the common wheat homolog genes was carried out in GeneDocv2.7 program [22].

To identify *Gid1* of *Dasypyrum villosum* in wheat background, we selected primers (DvGid1–1F: AGGTCAACCGCAACGAGTGC and DvGid1–1R: CCAATCCCACCGTCTCGAGCGTA) for gene regions that were the same in different *D. villosum* samples but differ from the gene sequences in wheat.

Conditions for amplification of DvGid1. The PCR mixture consisted of the following components (concentration of the components in the final mixture): 1x Taq buffer (pH = 8.6), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM each dNTP, 2 μM each primer, 0.4 units/μl Taq polymerase, 4 ng/μl matrix DNA. The volume of the PCR mixture was 25 μl. PCR was carried out under the following temperature conditions: 94 °C — 5 min; 36 cycles 94 °C — 30 sec, 60 °C — 30 sec, 72 °C — 1 min; 72 °C for 10 min. The resulting PCR products were analyzed by electrophoresis in a 1.5% agarose gel with TBE buffer supplemented with ethidium bromide. Electrophoregrams were visualized in ultraviolet light using a gel documentation system.

Results and Discussion

Sequencing of the Dasypyrum villosum Gid1 gene. At first, the mRNA sequence of the wheat *Gid1* gene (GenBank FR668558) was used to search for this gene in the IWGSCRefSeqv1.0 wheat genome using BLAST². The greatest homology to this sequence was shown by the wheat genes *TraesCS1B02G265900*, *TraesCS1D02G254500*, *TraesCS1A02G255100* related to chromosomes 1B, 1D and 1A, respectively. In EnsemblPlants database, these genes are annotated as encoding the GID1 protein. The genomic sequences of these three genes were exported from the assembly of the wheat genome using a genomic browser³. The sequence of the rye *Gid1* gene was found using BLAST in one of the contigs (FKKI010039294, Lo7_v2_contig_60281) of the Lo7 rye genome related to chromosome 1R⁴.

² BLAST. Available from: <https://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Seq-Repository/BLAST>. [Accessed 17 December 2019]

³ Available from: https://urgi.versailles.inra.fr/jbrowseiwgsc/gmod_jbrowse [Accessed 17 December 2019]

⁴ Available from: <https://webblasVol.ipk-gatersleben.de/ryeselect> [Accessed 17 December 2019]

Genome-specific primers and primers for conserved regions of the gene were selected using Primer-BLAST (NCBI)⁵. Selected primers are given in Table 2.

These primers were used to amplify the *Gid1* gene on DNA of *Dasypyrum villosum* W621717 (accession 1), PI 598390 (accession 2). PCR with primers for common wheat subgenome B and for the rye genome gave positive results.

Table 2

Primers for amplification of *Gid1* homolog genes, selected based on wheat and rye sequences

A pair of primers (5'->3')	Tm	The expected size of the product, bp
GID1-B-F: CCGAGACCGTCCAAAACAATAAAC GID1-B-R: ATCATCAGACAGACAGACGGACA	60	2503
GID1-R-F: CATCCAAGACCGTCCAAAACAAT GID1-R-R: GGCAAACACATGGATGGATACAG	60	2576

Next, the PCR products were sequenced according NGS method and subjected to bioinformatics processing. As a result, we obtained nucleotide sequences of the two *D. villosum* accessions of different origin, which were compared with each other, as well as with the nucleotide sequences of wheat from the database (Fig. 1).

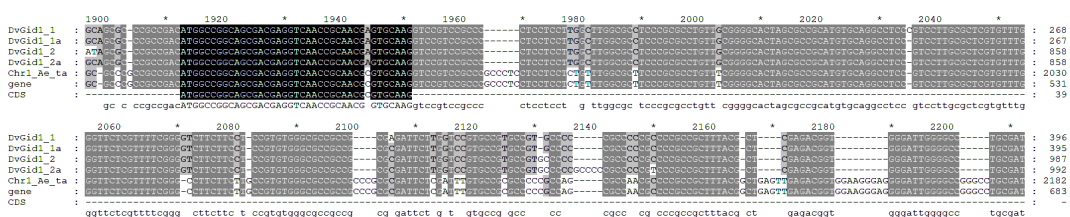


Fig. 1. A part of alignment of the sequences sequence of the *Dasypyrum villosum Gid1* gene

As a result of alignment, a high degree of homology between the studied sequences was revealed, however, differences were observed in some regions (mainly single and double nucleotide substitutions), which allowed us to develop a marker able to determine the presence of the *Dasypyrum Gid1* gene in a wheat background.

Marker development. The revealed differences between the nucleotide sequences of the *D. villosum Gid1* gene and common wheat homolog allowed the development of the pair of primers (DvGid1–1F: AGGTCAACCGCAACGAGTGC and DVGid1–1R: CCAATCCCACCGTCTCGAGCGTA), allowing specific amplification of the *Dasypyrum villosum Gid1* gene fragment and not producing a PCR product from wheat DNA (Fig. 2).

⁵ Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> [Accessed 17 December 2019]

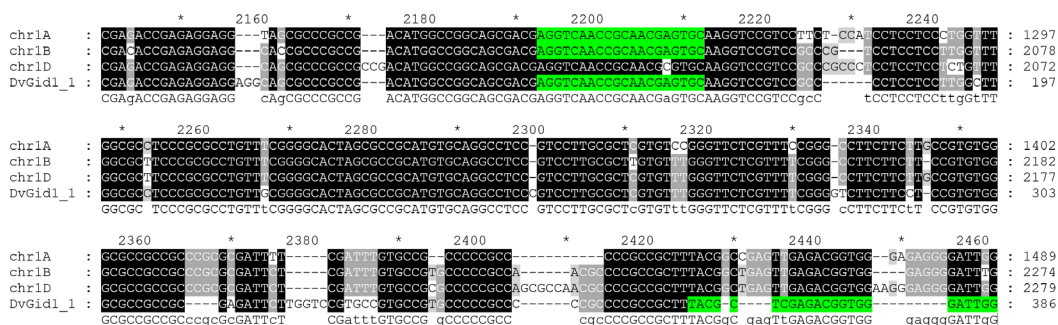


Fig. 2. Alignment of the partial sequences of the *Gid1* gene for common wheat (chr1A, chr1B chr1D) and *D. villosum* (*DvGid1*, obtained in the study). Specific primers for detecting the *DvGid1* gene are marked in green

Using these primers, a 280 bp region was amplified from the *D.villosum* DNA samples, while the marker fragment was not amplified from the wheat DNA of various varieties (Fig. 3). This marker can further be used to track the transmission of *Dasypyrum* genetic material in breeding of common wheat.

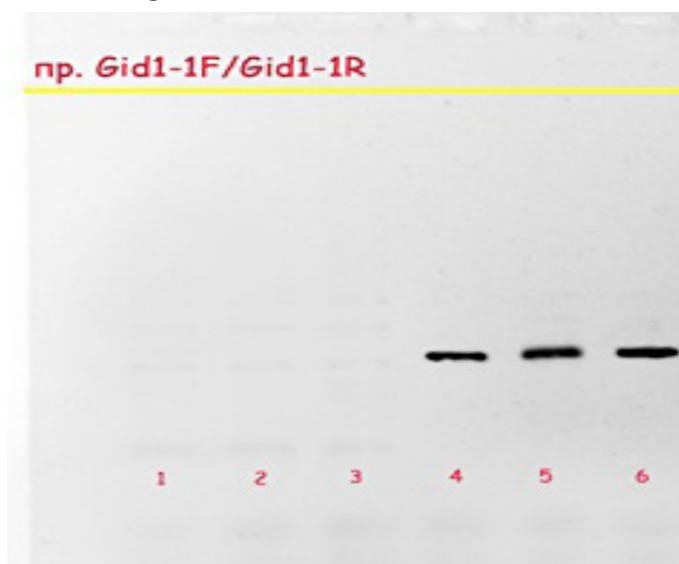


Fig. 3. Electrophoresis of the PCR products obtained using primers *DvGid1*–1F and *DvGid1*–1R. Wheat cultivars: 1 – Lebed; 2 – Pamyat; 3 – Etnos; *Dasypyrum* lines: 4–21717; 5–598390; 6–470279

Mapping of the Gid1 gene on Dasypyrum villosum chromosomes. To map the *DvGid1* gene on chromosomes, we used a collection of common wheat lines carrying added, substituted, and translocated *D. villosum* chromosomes. DNA lines with various additions were used for PCR with the developed marker *Dv-Gid1*F/R. As a result, the marker was amplified only in accessions 7677 (1V#3), 3891/89 (1V(1A)), 3896/89 (1V(1D)), 5615 (T1DS•1V#3L), bearing the first chromosome of the *Dasypyrum* V genome; amplification was absent in the rest of accessions (Fig. 4).



Fig. 4. M.p. – 100+ bp ladder. Monosomal additional Lines *D. villosum*: 1–2 – № 7513; 3–4 – № 6661; 5–6 – № 5615; 7–8 – № 5595

As a result of PCR using the DNA of translocated lines 5615 (T1DS•1V#3L) and 5616 (T1DS•1V#3S) carrying in their genomes only the long or short arms of the first chromosome of *D. villosum*, respectively, amplification was observed only for the line 5615 (T1DS•1V#3L). Thus, we can conclude that the *DvGid1* gene is located on the long arm of the first chromosome, and collinear to common wheat genes, also located in the long arm of the chromosomes of the first homeologic group.

Phenotypic expression of the DvGid1 gene of Dasypyrum in a wheat background. For preliminary assessment of effect of the *Dasypyrum DvGid1* gene on growth and development of wheat, we carried out a phenotypic assessment of lines with substitutions, additions, and translocations (Tables 3, 4). Plants were grown in a greenhouse without vernalization. Due to the fact that the *Gid1* gene plays one of the key roles in response to gibberellin, we first evaluated length of the main stem, tillering, and length of the spike. Plant height varied greatly, differing almost twice between individual accessions (from 56 cm in accession 5639 with translocation T7DL•7V#3S to 113 cm in sample 5595 with translocation T4DL•4V#3S). The number of tillers per plant ranged from 1 to 4, and, apparently, was not associated with presence of the *DvGid1* gene. The spike length was within 4...7 cm, while size of the main spike and side spikes of the same plant practically did not differ from each other (Tables 3, 4).

Table 3

Phenotypic assessment of the alien chromosome addition wheat lines

Chromosome	Number	Average length of main stem	Average length of main spike	Average total number of tillers	DvGid1
1V#3	7677	65.66 ± 2.60	4.00 ± 0.29	1.44 ± 0.29	Yes
3V#3	7679	73.29 ± 4.88	3.43 ± 0.30	1.50 ± 0.29	–
4V#3	7680	84.86 ± 2.61	5.71 ± 0.61	1.71 ± 0.29	–
5V#3	7681	58.38 ± 6.55	6.25 ± 0.62	2.13 ± 0.40	–
6V#1	7513	105.50 ± 2.50	7.00 ± 0.00	3.00 ± 1.00	–
7V#1	7514	87.00 ± 12.00	5.50 ± 0.50	3.50 ± 1.50	–

To grow the studied lines, we used either original seeds or seeds verified using molecular markers in previous studies [24]. However, during molecular analysis of individual plants of 7677 line (1V#3), bearing additional 1V chromosome, it was found that a specific marker was not amplified on some plants. Thus, we can say that there is no added chromosome 1V in the studied plants. A similar loss of added chromosomes is a relatively common occurrence. And our results once again emphasize importance of using molecular markers to verify plant material studied.

Table 4

Phenotypic assessment of substitution and translocation wheat lines

Aberration	Chromosome	Number	Average length of main stem	Average length of main spike	Average total stooling	DvGid1
substitution	1V(1A)	3891/89	89.30 ± 0.66	5.00 ± 0.00	3.33 ± 0.66	Yes
substitution	3V(3B)	86/11	68.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	–
substitution	3V(3D)	1360/07	96.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	–
substitution	5V(5D)	2333/89	87.66 ± 9.60	7.50 ± 0.29	3.00 ± 0.58	–
substitution	6V(6A)	1415/94	88.33 ± 8.95	5.00 ± 0.58	2.67 ± 0.33	–
substitution	7V(7A)	3889/89	91.00 ± 5.00	5.00 ± 0.00	2.50 ± 0.50	–
substitution	6V#2 [6A CS]	6661	63.30 ± 7.84	6.50 ± 1.26	1.67 ± 0.66	–
translocation	T4DS·4V#3L	5594	78.00 ± 7.00	6.00 ± 0.58	4.00 ± 1.33	–
translocation	T4DL·4V#3S	5595	113.00 ± 1.00	8.00 ± 1.00	3.50 ± 0.50	–
translocation	T1DS·1V#3L	5615	103.00 ± 0.00	6.00 ± 1.00	4.00 ± 1.00	Yes
translocation	T1DL·1V#3S	5616	84.66 ± 4.51	5.00 ± 0.29	3.33 ± 0.88	–
translocation	T2BS·2V#3L	5634	64.00 ± 2.00	6.33 ± 0.33	2.67 ± 0.88	–
translocation	T3DL·3V#3S	5636	97.66 ± 6.36	5.50 ± 0.28	3.00 ± 0.58	–
translocation	T3DS·3V#3L	5637	76.00 ± 5.30	3.50 ± 0.76	1.33 ± 0.33	–
translocation	T5DL·5V#3S	5638	94.00 ± 4.50	6.00 ± 0.57	3.00 ± 0.58	–
translocation	T7DL·7V#3S	5639	56.00 ± 7.00	4.50 ± 0.50	1.00 ± 0.00	–
translocation	T7DS·7V#3L	5640	67.00 ± 0.00	7.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	–
translocation	6BS·6VL	1438/94	86.33 ± 3.66	5.83 ± 0.60	2.00 ± 0.00	–
translocation	6AS·6VL	3214/96	95.00 ± 3.51	5.00 ± 0.00	1.67 ± 0.66	–
translocation	3V·3BL+3B	853/11	91.50 ± 1.50	7.00 ± 1.00	3.50 ± 0.50	–

Since the *DvGid1* gene was mapped on the long arm of chromosome 1V, special attention should be paid to comparing the accessions 5615 (T1DS•1V#3L) and 5616 (T1DL•1V#3S). Both accessions provided by Dr. W. Jon Raupp (Center KSU) carry the same translocated chromosome from *D. villosum* genome of Sicilian origin. However, the first accession has the T1DS•1V#3L translocation in the karyotype, i.e. long arm of the first chromosome carrying the studied gene, and the second — T1DL•1V#3S, i.e. short arm of the same chromosome, but without this gene. Otherwise, these accessions are as genetically similar as possible. But at the phenotype level, certain differences were observed. In the presence of the *DvGid1* gene, plant height reached 103 cm, which was almost the maximum height among the studied lines. The exception was the accession 5595 (T4DL•4V#3S), the plants of which were even higher. But it should be considered that the genes encoding DELLA proteins, which interact with the *Gid1* proteins and have a significant effect on height, are located in the fourth homeologic group. In the absence of the *DvGid1*–5616 gene (T1DL•1V#3S), plant height was at the average level (83 cm) of the rest lines with different introgressions of *D. villosum* (Table 4).

The data obtained are consistent with the mechanism of the *GID1* protein action and indirectly show us the presence of this protein in substitution/translocation lines, while no significant differences were noted in the genome of the addition lines. Of one of wheat chromosomes is likely to promote the involvement of the alien genes in the processes of protein synthesis followed by subsequent influence of these proteins on plant growth and development. It appears from this study, that substitution and translocation lines in general are more preferable for studying the influence of the individual alien genes, compared with lines bearing the balanced genome and added chromosomes of distant varieties, at least when it comes to initially multichromosomal allopolyploid crops, with large genomes such as common wheat.

Conclusions

As a result of the study, unique nucleotide sequences of the *Gid1* gene of two *D. villosum* accessions of different origin were first obtained. Comparison with homologous genes of common wheat allowed us to develop a genome-specific marker, *Dv-Gid-1F/R*, which effectively distinguished the *DvGid1* *Dasyphyrum* gene in a wheat background. Localization of the *DvGid1* gene on the long arm of chromosome 1V was shown. A preliminary assessment of the phenotypic expression of this gene in a wheat genome background was carried out and a significant effect of the studied gene on plant height was revealed. It was shown that lines carrying a substitution or translocation in the genome were more preferable for such studies, compared with monosomic addition lines.

Введение

Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* 2n = 6x = 42) — одна из основных мировых зерновых культур. По данным ФАО⁶ в 2019 г. мировое производство пшеницы

⁶ В 2019 году производство зерновых в мире может достичь рекордного уровня // Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН. Режим доступа: <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/ru/> Дата обращения: 17.12.2019

предполагалось на уровне 766 млн. т, что является рекордным показателем. Однако, с учетом необходимости обеспечения продуктами постоянно растущего населения планеты, к 2050 г. урожайность пшеницы необходимо увеличить, по разным прогнозам, на 4 до 76% [1]. Именно повышение урожайности, а не расширение площадей посевов признано оптимальной стратегией обеспечения продовольственной безопасности во всем мире. Одним из путей повышения урожайности является использование дикорастущих сородичей для передачи хозяйственно-ценных генов. *Dasyphyrum villosum* ($2n = 2x = 14, VV$) однолетний злак трибы Triticeae, в природе встречающийся в районе Средиземноморья, юго-западной части Азии и России. Виды рода *Dasyphyrum* зарекомендовали себя как надежный источник генов устойчивости к биотическим [2, 3] и абиотическим [4] стрессам. Как правило, перенос генов от дазипирумов в геном мягкой пшеницы происходит путем использования линий с замещенными или транслоцированными хромосомами [5–7], этот способ широко применяется с конца прошлого века до наших дней [8–12].

Влияние генов короткостебельности на урожайность пшеницы было показано в ряде исследований [13, 14]. Более того, одним из ключевых факторов, обусловивших так называемую «зеленую революцию» в сельском хозяйстве, стало создание низкорослых сортов пшеницы с использованием генов карликовости *Rht* (от английского — Reduced height — уменьшенная высота) [15, 16]. Помимо косвенного влияния через снижение потерь урожая в следствие меньшей полегаемости, гены карликовости способствуют повышению продуктивности за счет лучшего перераспределения ассимилятов в пользу колоса и уменьшения прорастания на корню вследствие нарушения синтеза гибберелинов или чувствительности к этим фитогормонам, играющим ключевую роль в широком спектре процессов роста и развития растения, включая образование плодов и семян [17]. Низкая высота растений может достигаться разными путями, однако одними из ключевых факторов являются сложные взаимодействия белков DELLA с другими белками и гиббереллинами. Ген *Gid1* (*Gibberellin Insensitive Dwarf 1* — Гиббереллин Нечувствительный Карлик) кодирует белок, являющийся рецептором гибберелинов. Активные формы гибберелинов, присоединяясь к рецептору GID1, меняют его конформацию таким образом, что он приобретает способность связываться с белками DELLA. Связываясь с GID1, белки DELLA модифицируются убиквитином и разрушаются протеасомой, что способствует росту растения. Отсутствие связывания по какой-либо причине приводит к накоплению белков DELLA и потере чувствительности растений к гиббереллиновой кислоте [17, 18]. Таким образом, чтобы уменьшить рост растения путем изменения компонентов системы гиббереллин-GID1-DELLA, необходимо увеличивать стабильность белков DELLA. Один из возможных путей решения данной задачи — влияние на ген *Gid1* для уменьшения возможностей связывания DELLA, что демонстрирует необходимость более глубокого изучения аллельных вариантов данных генов у пшеницы и ее дикорастущих сородичей.

Целью нашей работы стало секвенирование последовательностей гена GID1, оказывающего влияние на высоту растения, у двух образцов *Dasyphyrum villosum*, определение его локализации на хромосомах и создание ДНК-маркера для дифференциации генов пшеницы и генов *D. villosum*.

Материалы и методы исследования

Материалом для секвенирования гена *Gid1* послужили два образца *Dasyphyrum villosum*, полученных из коллекции Западной региональной станции интродукции растений Университета штата Вашингтон, США (Western Regional Plant Introduction Station, Washington State University) — (W6 21717, PI 598390). Для картирования генов на хромосомы использовали серию моносомно-дополненных, замещенных и транслоцированных линий мягкой пшеницы сорта Chinese spring, полученных из Нанкинского сельскохозяйственного университета (Nanjing Agricultural University (NAU)), а также любезно предоставленных Dr. W. Jon Raupp из Wheat Genetics Resource Center Kansas Wheat Innovation Center, Университет штата Канзас (Kansas State University (KSU)) и Adam J. Lukaszewski (AJL), Professor of Genetics Dept. of Botany & Plant Sciences University of California (Университет Калифорнии) (табл. 1).

Таблица 1

Исследуемые линии пшеницы
с генетическим материалом *Dasyphyrum villosum*

Номер	Перестройка	Хромосома	Источник хромосомы	Происхождение	Автор
7677	Дополнение	1V#3	Сицилийский	KSU	AJL
7679	Дополнение	3V#3	Сицилийский	KSU	AJL
7680	Дополнение	4V#3	Сицилийский	KSU	AJL
7681	Дополнение	5V#3	Сицилийский	KSU	AJL
7682	Дополнение	6V#3	Сицилийский	KSU	AJL
7683	Дополнение	7V#3	Сицилийский	KSU	AJL
7509	Дополнение	1V#1	Итальянский	KSU	Sears
7510	Дополнение	2V#1	Греческий	KSU	Sears
7511	Дополнение	4V#1	Греческий	KSU	Sears
7512	Дополнение	5V#1	Греческий	KSU	Sears
7513	Дополнение	6V#1	Итальянский	KSU	Sears
7514	Дополнение	7V#1	Итальянский	KSU	Sears
3891/89	Замещение	1V(1A)	Итальянский	AJL	AJL
86/11	Замещение	3V(3B)	Сицилийский	AJL	AJL
1360/07	Замещение	3V(3D)	Сицилийский	AJL	AJL
2333/89	Замещение	5V(5D)	Сицилийский	AJL	AJL
1411/94	Замещение	6V(6B)	Сицилийский	AJL	AJL
1415/94	Замещение	6V(6A)	Сицилийский	AJL	AJL
3889/89	Замещение	7V(7A)	Итальянский	AJL	AJL
6661	Замещение	6V#2 [6A CS]	Китайский	KSU	NAU
5585	Транслокация	T6AL·6V#2S T2AS.2AL-2R#3L	Китайский	KSU	NAU
5594	Транслокация	T4DS·4V#3L	Сицилийский	KSU	KSU
5595	Транслокация	T4DL·4V#3S	Сицилийский	KSU	KSU
5615	Транслокация	T1DS·1V#3L	Сицилийский	KSU	KSU

Окончание таблицы 1

Номер	Перестройка	Хромосома	Источник хромосомы	Происхождение	Автор
5616	Транслокация	T1DL·1V#3S	Сицилийский	KSU	KSU
5634	Транслокация	T2BS·2V#3L	Сицилийский	KSU	KSU
5636	Транслокация	T3DL·3V#3S	Сицилийский	KSU	KSU
5637	Транслокация	T3DS·3V#3L	Сицилийский	KSU	KSU
5638	Транслокация	T5DL·5V#3S	Сицилийский	KSU	KSU
5639	Транслокация	T7DL·7V#3S	Сицилийский	KSU	KSU
5640	Транслокация	T7DS·7V#3L	Сицилийский	KSU	KSU
1438/94	Транслокация	6BS.6VL	Сицилийский	AJL	AJL
3214/96	Транслокация	6AS.6VL	Неизвестно	AJL	AJL
853/11	Транслокация	3V.3BL+3B	Сицилийский	AJL	AJL

Часть номеров с генетическим материалом *D. villosum* для предварительной оценки фенотипических эффектов выращивали в оранжерее Центра молекулярной биотехнологии РГАУ — МСХА имени К. А. Тимирязева. Растения оценивали по таким показателям, как высота главного стебля, длина главного колоса, кустистость и устойчивость к мучнистой росе. Статистическая обработка данных проводилась с функций пакета анализа Microsoft Excel, вычисления проводились с помощью готовых функций, входящих в пакет анализа.

ДНК выделяли СТАВ-методом [19], из молодых лиофильно высушенных листьев. Праймеры подбирали в программе PrimerBLAST NCBI. ПЦР-смесь состояла из следующих компонентов (даны концентрации компонентов в конечной смеси): 1 × LR буфер (pH = 9,3), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM каждого dNTP, 2 мкМ каждого праймера, 0,04 ед./мкл LR Plus полимеразы, 0,02 ед./мкл Taq полимеразы, 4 нг/мкл матричной ДНК. Объем ПЦР-смеси составлял 25 мкл. ПЦР проводилась при следующих температурных условиях: 94 °C — 5 мин; 36 циклов 94 °C — 30 с, 58 °C — 30 с, 72 °C — 2 мин; 72 °C — 5 мин.

Полученные ПЦР-продукты анализировали путем электрофореза в 1,5% агарозном геле с буфером TBE с добавлением бромистого этидия. Визуализация электрофореграмм проводилась в ультрафиолетовом свете с использованием системы гель-документирования.

ПЦР-продукты, полученные с использованием ДНК *D. villosum*, после проверки их качества на электрофорезе передавались для NGS-секвенирования. Секвенирование по технологии Illumina было проведено в ООО «Геномед». ДНК-библиотеки готовили с помощью набора реактивов Swift 2S™ Turbo DNA Library Kits. В процессе подготовки ДНК-библиотеки ПЦР-продукты, полученные от разных образцов *D. villosum*, метили индивидуальными баркодами. Секвенирование проводили на приборе MiSeq. После разделения прочтений по баркодам результаты секвенирования были получены по каждому образцу в отдельности.

Качество результатов секвенирования было оценено с использованием программы FastQC. Контиги были собраны из парных прочтений с помощью пакета программ SPAdes 3.13.0 [20]. Для выявления полиморфизмов, присутствующих

в гетерозиготном состоянии, полученные последовательности контигов использовали для картирования на них исходных прочтений с помощью программы SNAP [21]. Для детекции однонуклеотидных полиморфизмов и небольших инсерций и делеций использовали программу Freebayes (Garrison, 2012). Выявленные полиморфизмы были внесены в последовательность гена с помощью Bcftools (<https://github.com/samtools/bcftools>), и таким образом получена альтернативная последовательность каждого контига. Выравнивание полученных контигов гена *Gid1 Dasyphyrum villosum* на последовательности генов-гомологов *Gid1* мягкой пшеницы осуществляли в программе GeneDoc v2.7 [22].

Для выявления *Gid1 Dasyphyrum villosum* в окружении генома мягкой пшеницы мы подобрали праймеры (DvGid1–1F: AGGTCAACCGCAACGAGTGC и DvGid1–1R: CCAATCCACCGTCTCGAGCGTA) на регионы гена, одинаковые у разных образцов *D. villosum*, но отличающиеся от последовательностей генов-гомологов у пшеницы.

Условия для амплификации DvGid1. ПЦР-смесь состояла из следующих компонентов (даны концентрации компонентов в конечной смеси): 1x Taq буфер (pH = 8,6), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM каждого dNTP, 2 мкМ каждого праймера, 0,4 ед./мкл Taq полимеразы, 4 нг/мкл матричной ДНК. Объем ПЦР-смеси составлял 25 мкл. ПЦР проводилась при следующих температурных условиях: 94 °C — 5 мин; 36 циклов 94 °C — 30 с, 60 °C — 30 с, 72 °C — 1 мин; 72 °C — 10 мин. Полученные ПЦР-продукты анализировались путем электрофореза в 1,5% агарозном геле с буфером TBE с добавлением бромистого этидия. Визуализацию электрофореграмм проводили в ультрафиолетовом свете с использованием системы гель-документирования.

Результаты и обсуждение

Секвенирование последовательностей гена Gid1 Dasyphyrum villosum. На первом этапе работы последовательность мРНК гена *Gid1* пшеницы (GenBank FR668558) использовали для поиска данного гена в сборке генома пшеницы IWGSC RefSeq v1.0 с помощью BLAST⁷. Наибольшую гомологию к данной последовательности показали гены пшеницы TraesCS1B02G265900, TraesCS1D02G254500, TraesCS1A02G255100, относящиеся к хромосомам 1B, 1D и 1A соответственно. В базе данных EnsemblPlants эти гены аннотированы как кодирующие белок GID1. Геномные последовательности данных трех генов были экспортированы из сборки генома пшеницы с помощью геномного браузера⁸. Последовательность гена GID1 ржи была найдена с помощью BLAST в одном из контигов (FKKI010039294, Lo7_v2_contig_60281) генома ржи Lo7, относящегося к хромосоме 1R⁹.

Геном-специфичные праймеры и праймеры на консервативные участки гена подбирали с помощью PrimerBLAST NCBI¹⁰. Подобранные праймеры приведены в табл. 2.

Данные праймеры использовали для амплификации гена *Gid1* на ДНК образцов *Dasyphyrum villosum* W621717 (образец 1), PI 598390 (образец 2). Положительный результат дала ПЦР с праймерами для субгенома В мягкой пшеницы и для генома ржи.

⁷ BLAST. Режим доступа: <https://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Seq-Repository/BLAST>. Дата обращения: 17.12.2019

⁸ Режим доступа: https://urgi.versailles.inra.fr/jbrowseiwgsc/gmod_jbrowse Дата обращения: 17.12.2019

⁹ Режим доступа: <https://webblasVol.ipk-gatersleben.de/ryeselect> Дата обращения: 17.12.2019

¹⁰ Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> Дата обращения: 17.12.2019

Таблица 2

Праймеры для амплификации генов-гомологов *GID1*, подобранные на основе последовательностей пшеницы и ржи

Пара праймеров (5'->3')	Tm	Ожидаемый размер продукта, п. н.
GID1-B-F: CCGAGACCGTCCAAAACAATAAAC GID1-B-R: ATCATCAGACAGACAGACGGACA	60	2503
GID1-R-F: CATCCAAGACCGTCCAAAACAAT GID1-R-R: GGCAAACACATGGATGGATACAG	60	2576

Далее ПЦР-продукт секвенировали методом NGS и подвергали биоинформатической обработке. В результате секвенирования мы получили нуклеотидные последовательности двух образцов *D. villosum* различного происхождения, которые сравнивали между собой, а также с нуклеотидными последовательностями пшеницы из базы данных (рис. 1).

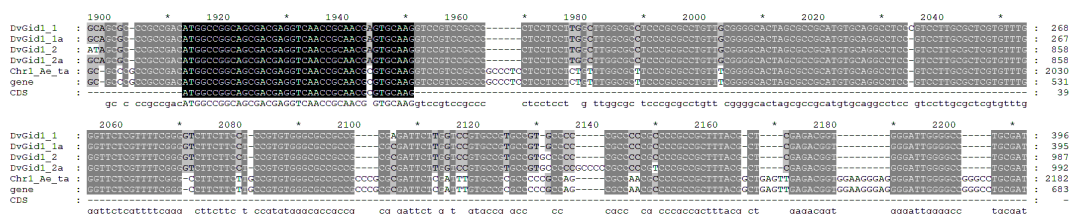


Рис. 1. Пример выравнивания части секвенированной последовательности гена *Gid1 Dasyprum villosum*

В результате выравнивания была выявлена высокая степень гомологии между изучаемыми последовательностями, однако в отдельных регионах наблюдались различия (в основном одно- и динуклеотидные замены), позволившие на их основании разработать маркер, позволяющий определять присутствие гена *Gid1* дазипирума в окружении генома пшеницы.

Разработка маркера. Выявленные различия между нуклеотидными последовательностями гена *Gid1 D. villosum* и пшеницы мягкой позволили разработать пару праймеров (DvGid1–1F: AGGTCAACCGCAACGAGTGC и DvGid1–1R: CCAATCCCACCGTCTCGAGCGTA), позволяющих специфично амплифицировать фрагмент гена *GID1 Dasyprum villosum* и не дающих ПЦР-продукта с ДНК пшеницы (рис. 2).

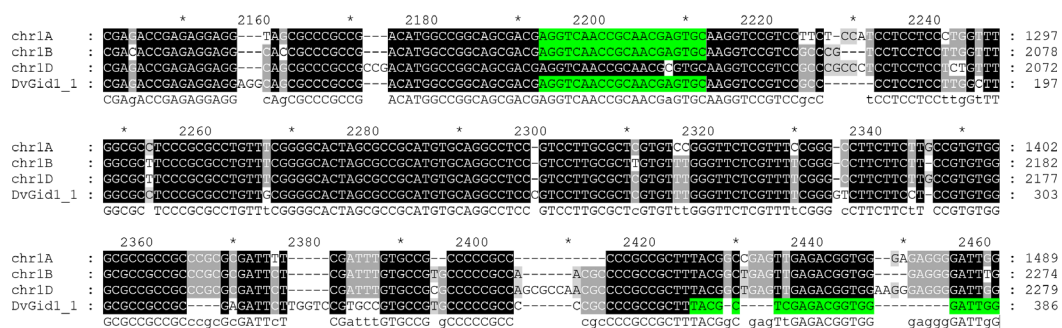


Рис. 2. Выравнивание частичной последовательности гена *Gid1* мягкой пшеницы (chr1A, chr1B, chr1D) и *D. villosum* (*DvGid1*, получено в нашей работе). Зеленым цветом отмечены специфичные праймеры для выявления гена *DvGid1*

При проведении ПЦР на образцах ДНК *D. villosum* с данными праймерами амплифицировался участок размером 280 п.н., в то время как на ДНК пшеницы различных сортов целевой фрагмент не амплифицировался (рис. 3). Данный маркер в дальнейшем может использоваться для отслеживания передачи генетического материала дазипирума в селекции мягкой пшеницы.

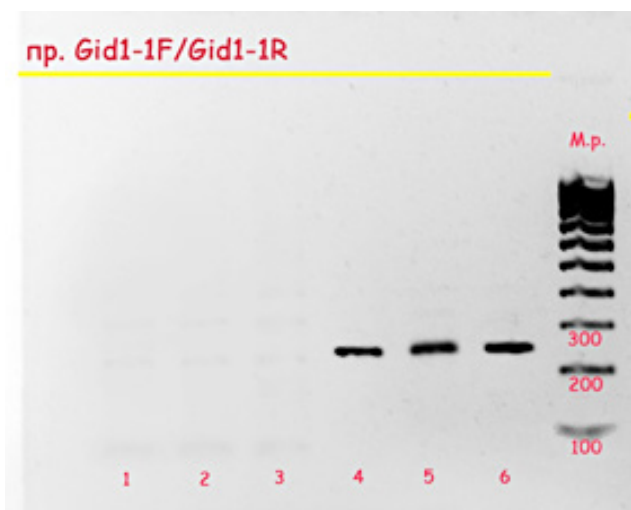


Рис. 3. Электрофореграмма амплификации ДНК-маркера *Dv-Gid-1F/R* на ген *DvGid1*: 1 – мягкая пшеница сорт Лебедь; 2 – мягкая пшеница сорт Памьять; 3 – мягкая пшеница сорт Этнос; 4 – *D. villosum* 21717; 5 – *D. villosum* 598390; 6 – *D. villosum* 470279; М. р. – маркер размеров

Картирование гена *Gid1* на хромосомы *Dasyurum villosum*. Для картирования гена *DvGid1* на хромосомах мы использовали коллекцию линий мягкой пшеницы, несущих дополненные, замещенные и транслоцированные хромосомы *D. villosum*. ДНК линий с различными дополнениями использовали для постановки ПЦР с разработанным маркером *Dv-Gid-1F/R*. В результате маркер амплифицировался только на образцах № 7677 (1V#3), 3891/89 (1V(1A)), 3896/89(1V(1D)), 5615(T1DS·1V#3L), несущих первую хромосому генома V *Dasyurum*, на остальных образцах амплификация отсутствовала (рис. 4).



Рис. 4. Электрофореграмма амплификации ДНК-маркера Dv-Gid-1F/R на ген *DvGid1* у линий пшеницы с генетическим материалом *D. villosum*: 1–2 – № 7513 (6V#1); 3–4 – № 6661 (6V#2 [6A CS]); 5–6 – № 5615(T1DS·1V#3L); 7–8 – № 5595(T4DL·4V#3S); М. р. – маркер размеров

При амплификации на ДНК транслоцированных линий № 5615 (T1DS·1V#3L) и 5616 (T1DS·1V#3S) несущих в своих геномах только длинное или короткое плечи первой хромосомы *D. villosum* соответственно, амплификация наблюдалась лишь у линии № 5615 (T1DS·1V#3L). Таким образом, можно сделать вывод, что ген *DvGid1* — расположен на длинном плече первой хромосомы, и коллинеарен генам мягкой пшеницы, также расположенным в длинном плече хромосом первой гомеологической группы.

Фенотипическое проявление гена *DvGid1* дазипирума в генетическом окружении пшеницы. Для предварительной оценки влияния гена *DvGid1* дазипирума на рост и развитие пшеницы мы проводили фенотипическую оценку линий с замещениями, дополнениями и транслокациями (табл. 3, 4). Растения выращивали в вегетационном опыте в оранжерее без яровизации. В связи с тем, что ген *Gid1* играет одну из ключевых ролей в реакции ответа на гиббереллин, мы прежде всего оценивали длину главного стебля, кустистость, длину колоса. Высота растений сильно варьировалась, отличаясь между отдельными образцами почти в два раза (от 56 см у образца 5639 с транслокацией T7DL·7V#3S до 113 см у образца 5595 с транслокацией T4DL·4V#3S). Показатель кустистости варьировался от 1 до 4, и, по всей видимости, не был связан с присутствием гена *DvGid1*. Длина колоса — в пределах 4...7 см, при этом величина главного колоса и боковых колосьев одного растения практически не отличались между собой (табл. 3, 4).

Таблица 3

Фенотипическая оценка дополненных линии пшеницы

Хромосома	Номер	Средняя длина главного стебля	Средняя длина главного колоса	Средняя общая кустистость	Наличие <i>DvGid1</i>
1V#3	7677	65,66 ± 2,60	4,00 ± 0,29	1,44 ± 0,29	Да
3V#3	7679	73,29 ± 4,88	3,43 ± 0,30	1,50 ± 0,29	–
4V#3	7680	84,86 ± 2,61	5,71 ± 0,61	1,71 ± 0,29	–
5V#3	7681	58,38 ± 6,55	6,25 ± 0,62	2,13 ± 0,40	–
6V#1	7513	105,50 ± 2,50	7,00 ± 0,00	3,00 ± 1,00	–
7V#1	7514	87,00 ± 12,00	5,50 ± 0,50	3,50 ± 1,50	–

Для выращивания исследуемых линий нами использовались либо оригинальные семена, либо семена, верифицированные с помощью молекулярных маркеров в предыдущих работах [24]. Однако при молекулярном анализе индивидуальных растений линии 7677 (1V#3), несущей дополнительную хромосому 1V, было обнаружено, что на части растений нет амплификации специфического маркера. Таким образом, мы можем говорить о том, что в исследованных растениях отсутствует дополненная хромосома 1V. Подобная потеря дополнительных хромосом относительно частое явление. А полученные нами результаты, еще раз подчеркивают важность использования молекулярных маркеров для верификации исследуемого материала.

Таблица 4

Фенотипическая оценка замещенных и транслоцированных линий пшеницы

Перестройка	Хромосома	Номер	Средняя длина главного стебля	Средняя длина главного колоса	Средняя общая кустистость	Наличие гена <i>DvGid1</i>
Замещение	1V(1A)	3891/89	89,30 ± 0,66	5,00 ± 0,00	3,33 ± 0,66	Да
Замещение	3V(3B)	86/11	68,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	–
Замещение	3V(3D)	1360/07	96,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	–
Замещение	5V(5D)	2333/89	87,66 ± 9,60	7,50 ± 0,29	3,00 ± 0,58	–
Замещение	6V(6A)	1415/94	88,33 ± 8,95	5,00 ± 0,58	2,67 ± 0,33	–
Замещение	7V(7A)	3889/89	91,00 ± 5,00	5,00 ± 0,00	2,50 ± 0,50	–
Замещение	6V#2 [6A CS]	6661	63,30 ± 7,84	6,50 ± 1,26	1,67 ± 0,66	–
Транслокация	T4DS·4V#3L	5594	78,00 ± 7,00	6,00 ± 0,58	4,00 ± 1,33	–
Транслокация	T4DL·4V#3S	5595	113,00 ± 1,00	8,00 ± 1,00	3,50 ± 0,50	–
Транслокация	T1DS·1V#3L	5615	103,00 ± 0,00	6,00 ± 1,00	4,00 ± 1,00	Да
Транслокация	T1DL·1V#3S	5616	84,66 ± 4,51	5,00 ± 0,29	3,33 ± 0,88	–
Транслокация	T2BS·2V#3L	5634	64,00 ± 2,00	6,33 ± 0,33	2,67 ± 0,88	–
Транслокация	T3DL·3V#3S	5636	97,66 ± 6,36	5,50 ± 0,28	3,00 ± 0,58	–
Транслокация	T3DS·3V#3L	5637	76,00 ± 5,30	3,50 ± 0,76	1,33 ± 0,33	–
Транслокация	T5DL·5V#3S	5638	94,00 ± 4,50	6,00 ± 0,57	3,00 ± 0,58	–
Транслокация	T7DL·7V#3S	5639	56,00 ± 7,00	4,50 ± 0,50	1,00 ± 0,00	–
Транслокация	T7DS·7V#3L	5640	67,00 ± 0,00	7,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	–
Транслокация	6BS·6VL	1438/94	86,33 ± 3,66	5,83 ± 0,60	2,00 ± 0,00	–
Транслокация	6AS·6VL	3214/96	95,00 ± 3,51	5,00 ± 0,00	1,67 ± 0,66	–
Транслокация	3V·3BL+3B	853/11	91,50 ± 1,50	7,00 ± 1,00	3,50 ± 0,50	–

Поскольку ген *DvGid1* был картирован нами на длинном плече хромосомы 1V, особое внимание следует обратить на сравнение между собой образцов под

номерами 5615 (T1DS·1V#3L) и 5616 (T1DL·1V#3S). Оба образца предоставлены В. Дж. Рауп из центра Университета штата Канзас (Dr. W. Jon Raupp Center KSU) и несут одну и ту же транслоцированную хромосому из генома *D. villosum* сицилийского происхождения. Однако первый образец имеет в кариотипе транслокацию T1DS·1V#3L, то есть длинное плечо первой хромосомы, несущее изучаемый ген, а второй — T1DL·1V#3S, т. е. короткое плечо этой же хромосомы, но без данного гена. В остальном эти образцы максимально генетически схожи. Но на уровне фенотипов наблюдались определенные различия. При наличии гена *DvGid1* высота растений достигала 103 см, что являлось практически максимальной высотой среди изучаемых линий. Исключением был образец 5595 (T4DL·4V#3S), высота растений которого была еще выше. Но следует обратить внимание, что как раз на четвертой гомеологической группе находятся гены, кодирующие белки DELLA, как раз взаимодействующие с белками GID1 и оказывающие существенное влияние на высоту. В случае же отсутствия гена *DvGid1*–5616 (T1DL·1V#3S), высота растений находилась на уровне средней высоты (83 см) остальных линий с различными интрогрессиями *D. villosum* (см. табл. 4).

Полученные данные согласуются с данными о механизме работы белка GID1 и опосредовано демонстрируют нам наличие данного белка у замещенных/транслоцированных линий, тогда как в геноме дополненных линий подобных существенных различий отмечено не было. Вероятно, отсутствие одной из хромосом пшеницы способствует вовлечению генов с хромосом чужеродного происхождения в процессы синтеза белков и, как следствие, последующее влияние данных белков на рост и развитие растения. Из этого также следует, что замещенные и транслоцированные линии в целом, по-видимому, более предпочтительны для изучения влияния проявления отдельных чужеродных генов, по сравнению с линиями, несущими свой сбалансированный геном и дополненные хромосомы отдаленных сородичей, по крайней мере, когда речь идет изначально о многохромосомных аллополиплоидных культурах, с крупными геномами, таких, как мягкая пшеница.

Заключение

В результате проведенной работы впервые были получены уникальные нуклеотидные последовательности гена *Gid1* двух образцов *D. villosum* различного происхождения. Сравнение с гомологичными генами мягкой пшеницы и позволило разработать геном-специфичный маркер Dv-Gid-1F/R, эффективно различающий ген *DvGid1* *Dasyphyrum* в окружении генома пшеницы. Показана локализация гена *DvGid1* на длинном плече хромосомы 1V. Проведена предварительная фенотипическая оценка проявления данного гена в окружении генома пшеницы и выявлено существенное влияние изучаемого гена на высоту растения. Показано, что линии, несущие в геноме замещения или транслокации, более предпочтительны для подобных исследований, по сравнению с моносомно-дополненными линиями.

References / Библиографический список

1. Ray DK, Mueller ND, West PC, Foley JA. Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. *PLoS one*. 2013; 8(6): e66428. doi: 10.1371/journal.pone.0066428
2. Minelli S, Ceccarelli M, Mariani M, De Pace C, Cionini PG. Cytogenetics of *Triticum* × *Dasypyrum* hybrids and derived lines. *Cytogenetic and genome research*. 2005; 109(1–3):385–392. doi: 10.1159/000082424
3. Li H, Dong Z, Ma C, Tian X, Qi Z, Wu N, et al. Physical Mapping of Stem Rust Resistance Gene Sr52 from *Dasypyrum villosum* Based on ph1b-Induced Homoeologous Recombination. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(19):4887. doi: 10.3390/ijms20194887
4. Djanaguiraman M, Prasad PV, Kumari J, Sehgal SK, Friebe B, Djalovic I, et al. Alien chromosome segment from *Aegilops speltoides* and *Dasypyrum villosum* increases drought tolerance in wheat via profuse and deep root system. *BMC plant biology*. 2019; 19(1):242. doi: 10.1186/s12870-019-1833-8
5. Zhang R, Fan Y, Kong L, Wang Z, Wu J, Xing L, et al. Pm62, an adult-plant powdery mildew resistance gene introgressed from *Dasypyrum villosum* chromosome arm 2VL into wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 2018; 131(12):2613–2620. doi: 10.1007/s00122-018-3176-5
6. Li G, Gao D, Zhang H, Li J, Wang H, La S, et al. Molecular cytogenetic characterization of *Dasypyrum breviaristatum* chromosomes in wheat background revealing the genomic divergence between *Dasypyrum* species. *Molecular Cytogenetics*. 2016; 9(1):6. doi: 10.1186/s13039-016-0217-0
7. Zhang H, Li G, Li D, Gao D, Zhang J, Yang E, et al. Molecular and cytogenetic characterization of new wheat — *Dasypyrum breviaristatum* derivatives with post-harvest re-growth habit. *Genes*. 2015; 6(4):1242–1255. doi: 10.3390/genes6041242
8. Blanco A, Simeone R, Resta P. The addition of *Dasypyrum villosum* (L.) Candargy chromosomes to durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Theoretical and applied genetics*. 1987; 74(3):328–333. doi: 10.1007/BF00274714
9. Friebe B, Cermeno MC, Zeller FJ. C-banding polymorphism and the analysis of nucleolar activity in *Dasypyrum villosum* (L.) Candargy, its added chromosomes to hexaploid wheat and the amphiploid *Triticum dicoccum* — *D. villosum*. *Theoretical and applied genetics*. 1987; 73(3):337–342. doi: 10.1007/BF00262498
10. Liu C, Qi L, Liu W, Zhao W, Wilson J, Friebe B, et al. Development of a set of compensating *Triticum aestivum*–*Dasypyrum villosum* Robertsonian translocation lines. *Genome*. 2011; 54(10):836–844. doi: 10.1139/g11-051
11. Zhang R, Hou F, Feng Y, Zhang W, Zhang M, Chen P, et al. Characterization of a *Triticum aestivum* — *Dasypyrum villosum* T2VS2DL translocation line expressing a longer spike and more kernels traits. *Theoretical and applied genetics*. 2015; 128(12):2415–2425. doi: 10.1007/s00122-015-2596-8
12. De Pace C, Snidaro D, Ciaffi M, Vittori D, Ciofo A, Cenci A, et al. Introgression of *Dasypyrum villosum* chromatin into common wheat improves grain protein quality. *Euphytica*. 2001; 117(1):67–75. doi: 10.1023/A:1004095705460
13. Okuno A, Hirano K, Asano K, Takase W, Masuda R, Morinaka Y, et al. New approach to increasing rice lodging resistance and biomass yield through the use of high gibberellin producing varieties. *PLoS One*. 2014; 9(2): e86870. doi: 10.1371/journal.pone.0086870
14. Wu Y, Wang Y, Mi XF, Shan JX, Li XM, Xu JL, et al. The QTL GNP1 encodes GA20ox1, which increases grain number and yield by increasing cytokinin activity in rice panicle meristems. *PLoS genetics*. 2016; 12(10): e1006386. doi: 10.1371/journal.pgen.1006386
15. Hedden P. The genes of the Green Revolution. *TRENDS in Genetics*. 2003; 19(1):5–9. doi: 10.1016/S0168-9525(02)00009-4
16. Peng J, Richards DE, Hartley NM, Murphy GP, Devos KM, Flintham JE, et al. ‘Green revolution’ genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature*. 1999; 400(6741):256–261. doi: 10.1038/22307
17. Gallego-Giraldo C, Hu J, Urbez C, Gomez MD, Sun TP, et al. Role of the gibberellin receptors *GID1* during fruit-set in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 2014; 79(6):1020–1032. doi: 10.1111/tpj.12603
18. Harberd NP, Belfield E, Yasumura Y. The angiosperm gibberellin-*GID1*-*DELLA* growth regulatory mechanism: how an “inhibitor of an inhibitor” enables flexible response to fluctuating environments. *The Plant Cell*. 2009; 21(5):1328–1339. doi: 10.1105/tpc.109.066969
19. Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*. 1980; 8(19):4321–4326. doi: 10.1093/nar/8.19.4321
20. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology*. 2012; 19(5):455–477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021

21. Zaharia M, Bolosky WJ, Curtis K, Fox A, Patterson D, Shenker S, et al. Faster and more accurate sequence alignment with SNAP. 2011. Available from: http://www.icsi.berkeley.edu/pubs/networking/ICSI_fasterandmoreaccurate11.pdf
22. Nicholas KB, Nicholas HB. Genedoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. 1997. Available from: www.nrbsc.org/gfx/genedoc/index.html
23. Zhang R, Sun B, Chen J, Cao A, Xing L, Feng Y, et al. Pm55, a developmental-stage and tissue-specific powdery mildew resistance gene introgressed from *Dasypyrum villosum* into common wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 2016; 129(10):1975–1984. doi: 10.1007/s00122-016-2753-8
24. Sokolov PA, Krupin PY, Divashuk MG, Karlov GI. Using PLUG-markers to analyze the collection of soft wheat lines disomically complemented with *Dasypyrum villosum* chromosomes. *Izvestiya of Timiryazev agricultural academy*. 2017; (4):147–157. (In Russ). Соколов П.А., Крупин П.Ю., Дивашук М.Г., Карлов Г.И. Использование plug-маркеров для анализа коллекции дисомно дополненных линий мягкой пшеницы хромосомами *Dasypyrum villosum* // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2017. № 4. С. 147–157.

About authors:

Razumova Olga Vladimirovna — Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Laboratory of Applied Genomics and Private Breeding of Agricultural Plants, All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 42, Timiryazevskaya st., Moscow, Russian Federation, 127550; Moscow Botanical Garden of Academy of Sciences, 4, ul. Botanicheskaya st., Moscow, Russian Federation, 12727; e-mail: razumovao@gmail.com; ORCID: 0000-0001-5157-0087, 6507-1005

Bazhenov Mikhail Sergeevich — Candidate of Biological Sciences, senior researcher, Laboratory of Applied Genomics and Private Breeding of Agricultural Plants, All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 42, Timiryazevskaya st., Moscow, Russian Federation, 127550; e-mail: mikhabazhenov@gmail.com; ORCID: 0000-0002-7301-1363

Nikitina Ekaterina Aleksandrovna — Laboratory Assistant, Laboratory of Applied Genomics and Private Breeding of Agricultural Plants, All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 42, Timiryazevskaya st., Moscow, Russian Federation, 127550; e-mail: shhket@gmail.com; ORCID: 0000-0001-5002-8229

Nazarova Lyubov Andreevna — Junior Researcher, Laboratory of Applied Genomics and Private Breeding of Agricultural Plants, All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 42, Timiryazevskaya st., Moscow, Russian Federation, 127550; e-mail: lpukhova@yandex.ru; ORCID: 0000-0002-4056-8907, 1426-2760

Romanov Dmitry Viktorovich — Candidate of Biological Sciences, senior researcher, Laboratory of Applied Genomics and Private Breeding of Agricultural Plants, All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 42, Timiryazevskaya st., Moscow, Russian Federation, 127550; e-mail: akabos1987@gmail.com; ORCID: 0000-0002-7495-7572, 9747-9690

Chernook Anastasiya Gennadievna — Junior Researcher, Laboratory of Applied Genomics and Private Breeding of Agricultural Plants, All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 42, Timiryazevskaya st., Moscow, Russian Federation, 127550; e-mail: Irbis-sibr1@yandex.ru; ORCID: 0000-0002-8793-1742

Sokolov Pavel Andreevich — Laboratory Assistant Researcher, Center for Molecular Biotechnology, Russian Timiryazev State Agrarian University, 49, Timiryazevskaya st., Moscow, Russian Federation, 127550; e-mail: pav2395147@yandex.ru

Kuznetsova Viktoria Maksimovna — Junior Researcher, Laboratory of Applied Genomics and Private Breeding of Agricultural Plants, All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 42, Timiryazevskaya st., Moscow, Russian Federation, 127550; e-mail: vika-kuz367@yandex.ru; ORCID: 0000-0002-3657-4511

Semenov Oleg Grigorievich — Candidate of Biological Sciences, professor, Technosphere Safety Department, Agrarian-technological Institute, Peoples' Friendship University of Russia, 6, Miklukho-Maklaya st., Moscow, Russian Federation, 117198; e-mail: semenov_og@rudn.university

Karlov Gennady Ilyich — Doctor of Biological Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director, All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 42, Timiryazevskaya st., Moscow, Russian Federation, 127550; Russian Timiryazev State Agrarian University, 49, Timiryazevskaya st., Moscow, Russian Federation, 127550; e-mail: karlovg@gmail.com; ORCID: 0000-0002-9016-103X, 7043-2727

Kharchenko Petr Nikolaevich — Doctor of Biological Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Scientific Advisor, All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 42, Timiryazevskaya st., Moscow, Russian Federation, 127550; e-mail: iab@iab.ru

Divashuk Mikhail Georgievich — Candidate of Biological Sciences, leading researcher, Laboratory of Applied Genomics and Private Breeding of Agricultural Plants, All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 42, Timiryazevskaya st., Moscow, Russian Federation, 127550; Russian Timiryazev State Agrarian University, 49, Timiryazevskaya st., Moscow, Russian Federation, 127550; e-mail: divashuk@gmail.com; ORCID: 0000–0001–6221–3659

Об авторах:

Разумова Ольга Владимировна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Российская Федерация, г. Москва, 127550, ул. Тимирязевская, д. 42; Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, 12727, ул. Ботаническая, д. 4; e-mail: razumova@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-5157-0087>, 6507–1005

Баженов Михаил Сергеевич — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Российская Федерация, г. Москва, 127550, ул. Тимирязевская, д. 42; e-mail: mikhabazhenov@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-7301-1363>

Никитина Екатерина Александровна — лаборант-исследователь лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Российская Федерация, г. Москва, 127550, ул. Тимирязевская, д. 42; e-mail: shhket@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-5002-8229>

Назарова Любовь Андреевна — младший научный сотрудник лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Российская Федерация, г. Москва, 127550, ул. Тимирязевская, д. 42; e-mail: lpukhova@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4056-8907>, 1426–2760

Романов Дмитрий Викторович — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Российская Федерация, г. Москва, 127550, ул. Тимирязевская, д. 42; e-mail: akabos1987@gmail.com <https://orcid.org/0000-0002-7495-7572>, 9747–9690

Черноок Анастасия Геннадьевна — младший научный сотрудник лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Российская Федерация, г. Москва, 127550, ул. Тимирязевская, д. 42; e-mail: Irbis-sibr1@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8793-1742>

Соколов Павел Андреевич — лаборант-исследователь лаборатории центра молекулярной биотехнологии, Российский государственный аграрный университет — МСХА имени К. А. Тимирязева, Российская Федерация, г. Москва, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49; e-mail: pav2395147@yandex.ru

Кузнецова Виктория Максимовна — младший научный сотрудник лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Российская Федерация, г. Москва, 127550, ул. Тимирязевская, д. 42; e-mail: vika-kuz367@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3657-4511>

Семёнов Олег Григорьевич — кандидат биологических наук, профессор департамента техносферной безопасности Аграрно-технологического института, Российский университет дружбы народов, Российская Федерация, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6; e-mail: semenov_og@rudn.university

Карлов Геннадий Ильич — доктор биологических наук, профессор, Академик РАН, директор, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Российская Федерация, г. Москва, 127550, ул. Тимирязевская, д. 42; Российский государственный аграрный университет — МСХА имени К.А. Тимирязева, Российская Федерация, г. Москва, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49; e-mail: karlovg@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-9016-103X>, 7043-2727

Харченко Петр Николаевич — доктор биологических наук, профессор, Академик РАН, научный руководитель, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Российская Федерация, г. Москва, 127550, ул. Тимирязевская, д. 42; e-mail: iab@iab.ru

Дивашук Михаил Георгиевич — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Российская Федерация, г. Москва, 127550, ул. Тимирязевская, д. 42; Российский государственный аграрный университет — МСХА имени К. А. Тимирязева, Российская Федерация, г. Москва, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49; e-mail: divashuk@gmail.com; <http://orcid.org/0000-0001-6221-3659>