

ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНА *Btr1-A* У ДИПЛОИДНЫХ ВИДОВ ПШЕНИЦ
РОДА *Triticum* L.© 2020 г. В. Ю. Вавилова^{1, *}, И. Д. Конопацкая¹, А. Г. Блинов¹, Н. П. Гончаров¹¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: valeriyavavilova@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 05.08.2019 г.

После доработки 02.09.2019 г.

Принята к публикации 17.10.2019 г.

При доместикации злаков важнейшими признаками были легкость обмолота (пленчатость—голозерность) и ломкость/неломкость колоса, и человек вел отбор на голозерность и неломкость колоса. У пшеницы выявлены три системы генов, контролирующих признак “ломкость колоса” и/или его выраженность. Одна из них обусловлена генами *Btr1* (*Non-brittle rachis*), локализованными в хромосомах 3-й гомеологической группы. В данной работе были изучены последовательности 5'-нетранслируемого, кодирующего и 3'-нетранслируемого районов гена *Btr1-A*, расположенного в 3А хромосоме, у 30 образцов четырех диплоидных диких и возделываемых видов пшениц *Triticum boeoticum*, *T. monococcum*, *T. sinskajae* и *T. urartu* из Южной Европы, Закавказья и Малой Азии. Последовательность гена *Btr1-A* вида *T. sinskajae* была изучена впервые. Всего у изученных образцов диплоидных пшениц было установлено 11 гаплотипов этого гена, причем пять из них, а именно Har12–Har16, описаны впервые. Варибельность ранее не описанных гаплотипов у *T. boeoticum* и *T. urartu* не затрагивает критическую замену в позиции 355 гена *Btr1-A* (G на A), характерную для ломкоколосых диплоидных пшениц. Последовательности этого гена у *T. sinskajae* и всех образцов *T. monococcum* были идентичны гаплотипу Har9, выявленному у всех ранее изученных образцов *T. monococcum*. В позиции 355 гена *Btr1-A* у этого гаплотипа произошла замена G на A, что приводит к возникновению признака “неломкоколосость”. Обсуждается включение в голозерные полиплоидные виды пшениц вариантов гаплотипов диплоидных видов, обуславливающих у них признак “отсутствие ломкости колоса”.

Ключевые слова: ломкий/неломкий колос, ген *Btr1-A*, доместикация, эволюция, варибельность, диплоидные пшеницы, *Triticum*.

DOI: 10.31857/S0016675820050148

Ломкость колоса (ломкоколосость) — ключевой хозяйственно важный признак пшениц, тесно связанный с процессом их доместикации и последующей селекции [1]. У диких видов пшениц созревший колос распадается на колоски, что обеспечивает эффективное распространение их семян [1–3]. Среди возделываемых пшениц диплоидный вид *Triticum monococcum* L. и тетраплоидные *T. dicoccum* (Schrank) Schuebl. и *T. timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. характеризуются ломкоколосостью — после созревания колос у них ломается от механического воздействия [4]. У ди-, тетра- и гексаплоидных видов пшениц выраженность признака “ломкость колоса” имеет различную степень проявления [4]. В то же время созревший колос всех широко культивируемых в настоящее время полиплоидных видов пшениц не ломается, что облегчает сбор урожая и, как следствие, увеличивает количество собранного

зерна. Три независимые системы генов контролируют признак “ломкость колоса” и его выраженность: *Q* [5–7], *Tg* [8], *Btr* [9, 10], причем две первые плейотропно контролируют еще и пленчатость—голозерность [5, 8, 11]. При этом ген *Q* контролирует признаки, по которым шла доместикация [5–7], а ген *Tg* встречается только у искусственно созданных амфилоидов [8, 12]. Следует отметить, что у пшениц система генов *Btr1* (*Non-brittle rachis 1*) наименее изучена.

Пукарендиш и соавт. [9] изучили гены *Btr1-A* и *Btr2-A* у диплоидных пшениц-однозернянок, культивируемой *T. monococcum* и дикой *T. boeoticum* Boiss. и выявили единичную нуклеотидную замену в гене *Btr1-A* (аллель *btr1-A^m* с заменой G на A в позиции 355), приводящую к повышению прочности оси сложного колоса у культивируемых сортов. Позднее Чжао и соавт. проанализировали ген *Btr1-A* у ди- и полиплоидных видов

пшениц и показали, что в отличие от дикого тетраплоидного вида *T. dicoccoides* (Körn. ex Aschers. et Graebn.) Schweinf. ген *Btr1-A* культивируемых полиплоидных пшениц содержит делецию из двух нуклеотидов, которая приводит к сдвигу рамки считывания и формированию укороченного нефункционального белка. Исследования на трансгенных линиях показали, что *Btr1-A*, вероятно, также оказывает влияние на морфологию колоса, размер и массу зерновок пшеницы [10].

В настоящем исследовании было изучено разнообразие гена *Btr1-A* у диплоидных видов пшениц *T. boeoticum*, *T. monococcum*, *T. sinskajae* A. Filat. et Kurk. и *T. urartu* Thum. ex Gandil., в том числе у образцов из ранее неизученных регионов (табл. 1). Для анализа было выбрано 30 образцов, для каждого из которых в условиях тепличного комплекса при стандартных условиях было выращено по 10 растений. Растения выращивались до полного созревания, затем для них был определен признак “ломкость колоса”. Колосья всех проанализированных образцов *T. monococcum* характеризуются пониженной ломкостью, а *T. sinskajae* — неломкостью колоса, в то время как все исследованные образцы *T. urartu* и *T. boeoticum* — ломким колосом. Кроме того, *T. sinskajae* — это единственный голозерный вид диплоидных пшениц [13].

С целью установления последовательностей гена *Btr1-A*, включая также 5'- и 3'-нетранслируемые районы данного гена, дополнительно к паре праймеров Btr-A1-F и Btr-A1-R (целевой фрагмент ~900 пн) [14] были сконструированы две пары праймеров: Btr-A1-F1 5'-GGTTTCAGAATCCAAGGGG-3' и Btr-A1-R1 5'-TTACCACTTCCTCGTGCG-3' (целевой фрагмент ~700 пн); Btr-A1-F2 5'-GCATCCAGTGACAGGTCTCTT-3' и Btr-A1-R2 5'-GTTCGCTACCACACGTGCAA-3' (целевой фрагмент ~900 пн).

ПЦР-амплификация целевых фрагментов была проведена с использованием образцов тотальной ДНК, выделенной из листьев растений диплоидных пшениц. Секвенирование нуклеотидных последовательностей было проведено в ЦКП “Геномика” СО РАН (<http://sequest.niboch.nsc.ru/>). Полученные фрагменты были собраны в полноразмерные последовательности гена *Btr1-A* с использованием алгоритма MUSCLE [15] в программе AliView v. 1.18.1 [16]. Нуклеотидные последовательности новых гаплотипов гена *Btr1-A* были размещены в базе данных GenBank под номерами MN159595—MN159605.

С использованием алгоритма MUSCLE [15] в программе AliView v. 1.18.1 [16] было проведено сравнение полученных последовательностей с последовательностями генов *Btr1-A* диплоидных и полиплоидных видов пшениц, представленными в базе данных GenBank [9, 10, 14]. Филогенетический анализ последовательностей был вы-

полнен с использованием программы IQ-TREE версии 1.6.11 [17].

У всех проанализированных образцов диплоидных пшениц не было выявлено гетерозигот по гену *Btr1-A*. Среди образцов *T. boeoticum* выявлены четыре гаплотипа из восьми описанных ранее: Har2, Har3, Har7 и Har8 [9, 10, 14] (табл. 1). Кроме того, у данного вида в настоящем исследовании были установлены три новых гаплотипа, обозначенных нами Har12, Har13 и Har14. Гаплотип Har12 отличается от гаплотипа Har1 одной однонуклеотидной заменой в 3'-нетранслируемом районе, отличий между гаплотипами в 5'-нетранслируемом районе и кодирующей последовательности гена *Btr1-A* не выявлено. Отличие гаплотипа Har13 от Har1 заключается в двух однонуклеотидных заменах в 5'-нетранслируемом районе и одной однонуклеотидной замене в 3'-нетранслируемом районе гена *Btr1-A*. Гаплотип Har12 был выявлен у образцов, собранных на территории Армении, Турции и Азербайджана (Нахичевань), а гаплотип Har13 уникален — обнаружен только в одном образце с территории Ирана (рис. 1,а). Гаплотипы Har12 и Har13 сформировались в популяциях *T. boeoticum*, и согласно проведенному филогенетическому анализу предком гаплотипа Har12, вероятнее всего, является гаплотип Har2, в то время как гаплотип Har13, по всей видимости, происходит от гаплотипа Har3 (рис. 1,б). Гаплотипы Har1 и Har4—Har6, ранее описанные у *T. boeoticum* [9], среди проанализированных нами образцов не выявлены. У образца *T. boeoticum* PI 355517, собранного на территории Турции, выявлен гаплотип, отличающийся от Har1 двумя однонуклеотидными заменами в 5'-нетранслируемом районе и четырьмя однонуклеотидными заменами в 3'-нетранслируемом районе. Данный гаплотип был обозначен нами как Har14. Эволюционно он ближе к гаплотипам Har5, Har7 и Har8 вида *T. boeoticum* (см. рис. 1,б).

У всех 12 изученных нами образцов *T. monococcum* был идентифицирован ранее описанный гаплотип Har9. Он характеризуется заменой нуклеотида G на A, что приводит к несинонимичной замене в позиции 355 (аллель *btr1-A^m*) и обеспечивает у данного вида формирование почти неломкого колоса [9]. Гаплотип Har9 широко представлен среди образцов *T. monococcum* и география его распространения включает Испанию, Грецию, Азербайджан, Румынию, Иран, Турцию, Ирак, Израиль, Сербию и Малую Азию (рис. 1) [9]. По всей видимости, он сформировался из гаплотипа Har1 *T. boeoticum*. Гаплотипы *T. monococcum* Har10 и Har11 согласно филогенетическому анализу, представленному на рис. 1,б, произошли от гаплотипа Har9.

Ген *Btr1-A* неломкоколосого образца к-48993 *T. sinskajae* был проанализирован впервые и был идентичен последовательности гаплотипа Har9

Таблица 1. Список проанализированных образцов диплоидных пшениц и выявленные гаплотипы гена *Btr1-A*

№	Вид	Номер в генетическом банке	Место сбора	Гаплотип <i>Btr1-A</i>
1	<i>T. boeoticum</i>	AUS 19372, Australian Grain Genebank	Иран	Нар3
2	<i>T. boeoticum</i>	к-14384, ВИР	Турция	Нар12
3	<i>T. boeoticum</i>	IG 116198, ICARDA	Турция	Нар7
4	<i>T. boeoticum</i>	AUS 19375, Australian Grain Genebank	Иран	Нар3
5	<i>T. boeoticum</i>	к-61600, ВИР	Греция	Нар2
6	<i>T. boeoticum</i>	G2511, University of California	Иран	Нар3
7	<i>T. boeoticum</i>	G2523, University of California	Иран	Нар13
8	<i>T. boeoticum</i>	к-33869, ВИР	Армения	Нар12
9	<i>T. boeoticum</i>	к-18399*, ВИР	Турция	Нар12
10	<i>T. boeoticum</i>	к-28132, ВИР	Армения	Нар7
11	<i>T. boeoticum</i>	к-28280, ВИР	Азербайджан, Нахичевань	Нар12
12	<i>T. boeoticum</i>	FN353, ICG	Не известно	Нар7
13	<i>T. boeoticum</i>	FN346, ICG	Не известно	Нар8
14	<i>T. boeoticum</i>	FN340, ICG	Не известно	Нар7
15	<i>T. boeoticum</i>	PI 355517, SGC	Турция	Нар14
16	<i>T. monococcum</i>	PI 277137, SGC	Греция	Нар9
17	<i>T. monococcum</i>	PI 326317, SGC	Азербайджан	Нар9
18	<i>T. monococcum</i>	PI 306540, SGC	Румыния	Нар9
19	<i>T. monococcum</i>	PI 503874, SGC	Иран	Нар9
20	<i>T. monococcum</i>	PI 355537, SGC	Турция	Нар9
21	<i>T. monococcum</i>	PI 427959, SGC	Ирак	Нар9
22	<i>T. monococcum</i>	PI 427927, SGC	Иран	Нар9
23	<i>T. monococcum</i>	PI 393496, SGC	Израиль	Нар9
24	<i>T. monococcum</i>	PI 264935, SGC	Греция	Нар9
25	<i>T. monococcum</i>	PI 221329, SGC	Сербия	Нар9
26	<i>T. monococcum</i>	PI 377662, SGC	Сербия	Нар9
27	<i>T. monococcum</i>	PI 355523, SGC	Малая Азия	Нар9
28	<i>T. sinskajae</i>	к-48993, ВИР	Турция	Нар9
29	<i>T. urartu</i>	IG 110784*, ICARDA	Сирия	Нар15
30	<i>T. urartu</i>	IG 116196, ICARDA	Турция	Нар16

Примечание. Полужирным шрифтом выделены варианты, впервые описанные в настоящем исследовании. SGC – the Small Grain Collection, Aberdeen, USA.

* Короткий фрагмент гена *Btr1-A* был установлен в работе В. Вавиловой и соавт. [14].

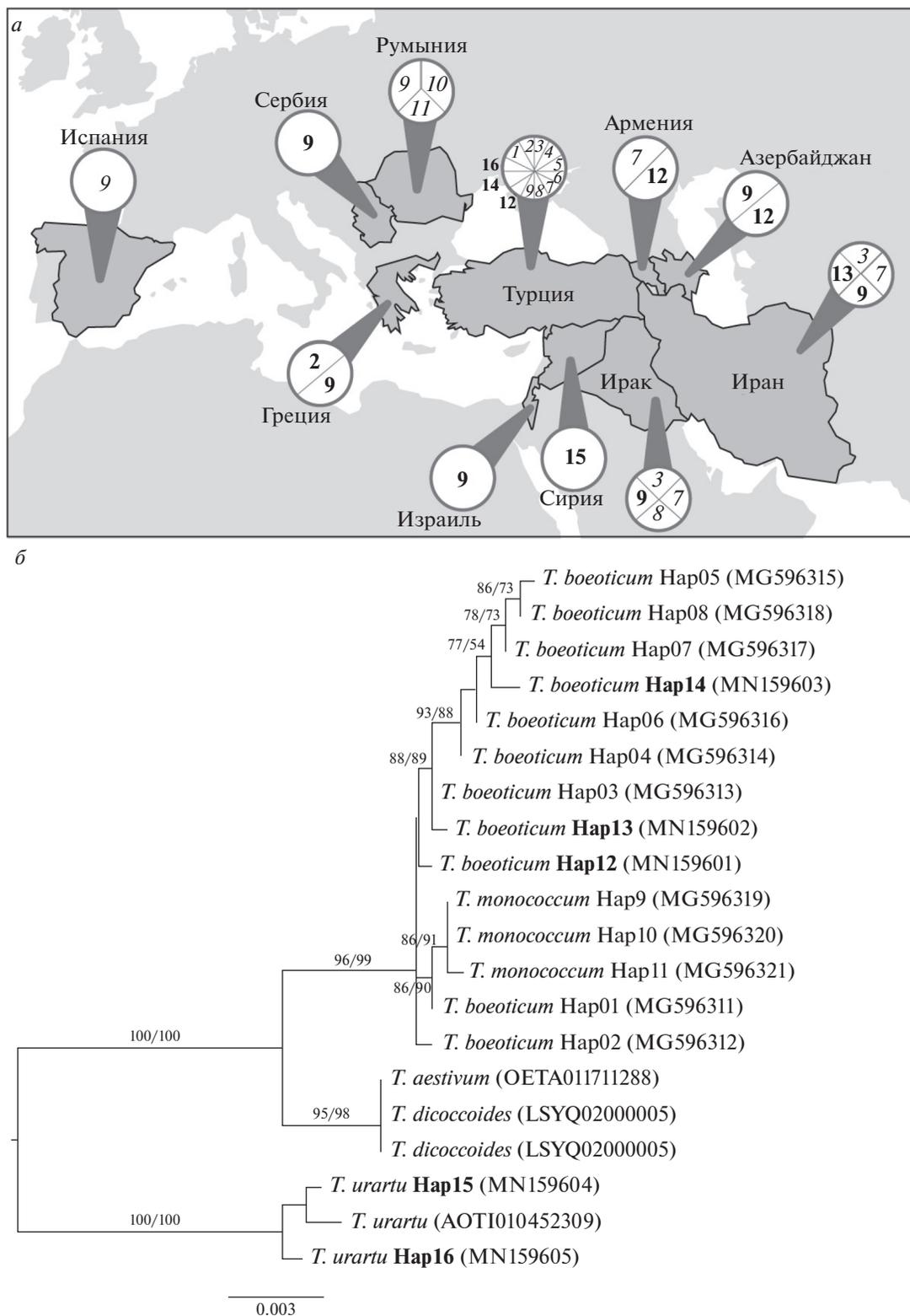


Рис. 1. Гаплотипы *Btr1-A* у образцов диплоидных видов пшениц. *a* – географическое распределение гаплотипов на основании результатов настоящего исследования и литературных данных [9]; *b* – филогенетическое дерево, реконструированное на базе 5'-нетранслируемого района, кодирующей части и 3'-нетранслируемого района гена *Btr1-A*, с использованием программы IQ-TREE версии 1.6.11 [17]. Коэффициенты поддержки менее 50% не представлены. Полужирным шрифтом выделены гаплотипы, впервые описанные (*b*) и представленные на территории изучаемых стран (*a*).

T. monocosmum (табл. 1), что дополнительно подтверждает происхождение *T. sinskajae* от *T. monocosmum*. Данный результат также позволяет сделать вывод о том, что у *T. sinskajae* отсутствие ломкости колоса контролируется иным геном.

В настоящем исследовании для *T. urartu* были выявлены два новых варианта гаплотипов: Нар15 и Нар16 (табл. 1). Ранее для данного вида был описан только один вариант Нар1 с G в позиции 355 гена *Btr1-A* [10]. Нар15 отличается от Нар1 46 однонуклеотидными заменами и двумя однонуклеотидными делециями. Данный гаплотип был выявлен у образца *T. urartu* (IG 110784), собранного на территории Сирии. Гаплотип Нар16 (*T. urartu* IG 116196) отличается от Нар1 двумя однонуклеотидными делециями, идентичными таковым гаплотипа Нар15, и 46 однонуклеотидными заменами, отличными от замен, показанных для Нар15. Для Нар16 в кодирующем районе *Btr1-A* выявлены четыре однонуклеотидные замены: две синонимичные, а также две несинонимичные, приводящие к замене аргинина на глутамин в позиции 124 и аланина на пролин в позиции 149. У гаплотипа Нар15 в дополнение к вышеописанным заменам в позиции 42 установлена замена лейцина на глутамин. Гаплотипы, выявленные у образцов *T. urartu*, содержат нуклеотид G в позиции 355, что характерно для ломкоколосых диплоидных пшениц, и не содержат делецию длиной 2 пн, описанную ранее у полиплоидных видов рода *Triticum* [10].

Таким образом, в рамках настоящего исследования были установлены и проанализированы последовательности 5'-нетранслируемого, кодирующего и 3'-нетранслируемого районов гена *Btr1-A* у четырех диплоидных видов пшениц из Южной Европы, Закавказья и Малой Азии. Всего было установлено 11 различных гаплотипов этого гена, причем пять из них обнаружены впервые: два у *T. urartu* (Нар15 и Нар16) и три у *T. boeoticum* (Нар12–Нар14). В 355-й позиции гена *Btr1-A* у всех образцов с ломким колосом был выявлен нуклеотид G, а у образцов с неломким колосом – нуклеотид A, что полностью согласуется с данными, представленными в литературе. Заметим, что остальные из выявленных нами замен не изменяют функции проанализированного гена. Сравнительный анализ показал, что *Btr1-A* полиплоидных видов обладает более высоким сходством с последовательностями диплоидных видов пшениц *T. monocosmum* и *T. boeoticum*, чем с последовательностями трех изученных образцов *T. urartu* (см. рис. 1).

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№ 16-16-10021).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kimber G., Feldman M. Wild Wheat: An Introduction. College of Agriculture, Univ. Missouri-Columbia, 1987. Special reports № 363. 146 p.
2. Watanabe N., Sugiyama K., Yamagishi Y., Sakata Y. Comparative telosomic mapping of homoeologous genes for brittle rachis in tetraploid and hexaploid wheats // *Hereditas*. 2002. V. 137. P. 180–185. <https://doi.org/10.1034/j.1601-5223.2002.01609.x>
3. Li W., Gill B.S. Multiple genetic pathways for seed shattering in the grasses // *Funct. Integr. Genomics*. 2006. V. 6. P. 300–309. <https://doi.org/10.1007/s10142-005-0015-y>
4. Дорофеев В.Ф., Филатенко А.А., Мизушова Э.Ф. и др. Пшеница. Л.: Колос, 1979. 348 с.
5. Zhang Z., Belcram H., Gornicki P. et al. Duplication and partitioning in evolution and function of homoeologous *Q* loci governing domestication characters in polyploid wheat // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. P. 18737–18742. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110552108>
6. Simons K.J., Fellers J.P., Trick H.N. et al. Molecular characterization of the major wheat domestication gene *Q* // *Genetics*. 2006. V. 172. P. 547–555. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.044727>
7. Sormacheva I., Golovnina K., Vavilova V. et al. *Q* gene variability in wheat species with different spike morphology // *Genet. Resour. Crop Evol.* 2015. V. 62. P. 837–852. <https://doi.org/10.1007/s10722-014-0195-1>
8. Sharma J.S., Running K.L.D., Xu S.S. et al. Genetic analysis of threshability and other spike traits in the evolution of cultivated emmer to fully domesticated durum wheat // *Mol. Genet. Genomics*. 2019. V. 294. P. 757–771. <https://doi.org/10.1007/s00438-019-01544-0>
9. Pourkheirandish M., Dai F., Sakuma S. et al. On the origin of the non-brittle rachis trait of domesticated einkorn wheat // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 8. P. 2031. eCollection 2017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02031>
10. Zhao Y., Xie P., Guan P. et al. *Btr1-A* induces grain shattering and affects spike morphology and yield-related traits in wheat // *Plant Cell Physiol.* 2019. V. 60. № 6. P. 1342–1353. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz050>
11. Sood S., Kuraparthy V., Bai G., Gill B.S. The major threshability genes soft glume (*sog*) and tenacious glume (*Tg*), of diploid and polyploid wheat, trace their origin to independent mutations at non-orthologous loci // *Theor. Appl. Genet.* 2009. V. 119. P. 341–351. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1043-0>
12. Nalam V., Vales M.I., Watson C.J.W. et al. Map based analysis of genetic loci on chromosome 2D that affect glume tenacity and threshability, components of the free-threshing habit in common wheat (*Triticum aestivum*) // *Genetics*. 2010. V. 185. P. 103–113. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.124113>

- tivum* L.) // Theor. Appl. Genet. 2007. V. 116. P. 135–145.
<https://doi.org/10.1007/s00122-007-0653-7>
13. Гончаров Н.П., Кондратенко Е.Я., Банникова С.В. и др. Сравнительно-генетический анализ голозерной диплоидной пшеницы *Triticum sinskajae* и ее исходной формы *T. monococcum* // Генетика. 2007. Т. 43. № 11. С. 1491–1500.
 14. Vavilova V., Konopatskaia I., Goncharov N.P. Non-brittle rachis 1-A (*Btr1-A*) gene in di- and hexaploid wheat species // Current Challenges in Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology. Proc. Fifth Intern. Sci. Conf. Plant Gen. 2019. P. 202–214.
<https://doi.org/10.18699/ICG-PlantGen2019-65>
 15. Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // Nucl. Acids Res. 2004. V. 32. P. 1792–1797.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
 16. Larsson A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets // Bioinformatics. 2014. V. 30. № 22. P. 3276–3278.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
 17. Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies // Mol. Biol. Evol. 2015. V. 32. № 1. P. 268–274.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>

Evolution of *Btr1-A* Gene in Diploid Wheat Species of the Genus *Triticum* L.

V. Yu. Vavilova^{a,*}, I. D. Konopatskaia^a, A. G. Blinov^a, and N. P. Goncharov^a

^aFederal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch,
 Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

*e-mail: valeriya.vavilova@bionet.nsc.ru

During domestication of cereals, the threshability (hulled vs. naked grains) and brittle vs. non-brittle rachis were the most important traits, and man produced a breeding for naked and non-brittle rachis. In wheat, three gene systems, that control the non-brittle rachis, were identified. One of them is caused by the *Btr1* (*Non-brittle rachis*) genes located in the chromosomes of the 3rd homeologic group. In the framework of this study, sequences of 5'- and 3'-untranslated regions and coding region of the *Btr1-A* gene were studied for 30 accessions of wild and domesticated diploid wheat species *Triticum boeoticum*, *T. monococcum*, *T. sinskajae* and *T. urartu* from Southern Europe, Transcaucasia and Minor Asia. The *Btr1-A* gene sequence of *T. sinskajae* was obtained for the first time. In total, 11 various haplotypes of this gene were identified in the diploid wheat accessions studied, and 5 of them, namely Hap12–Hap16, were described for the first time. The variability of *T. boeoticum* and *T. urartu* haplotypes, which were not previously described, does not affect the critical substitution at position 355 of the *Btr1-A* gene (G to A), specific for brittle rachis diploid wheat. The sequence of this gene in *T. sinskajae* and all *T. monococcum* accessions was identical to the haplotype Hap9 detected earlier. At position 355 of the *Btr1-A* gene, this haplotype replaces G to A, which leads to the occurrence of the non-brittle rachis trait. The involving of diploid species haplotypes, which causes their lack of brittle rachis, in the naked polyploid wheat species is discussed.

Keywords: brittle/non-brittle rachis, gene *Btr1-A*, domestication, evolution, variability, diploid wheats, *Triticum*.