сложно получить с помощью обычных селекционных методов без ухудшения исходных характеристик сорта.

Растения отобранных линий были высажены в теплице в количестве 10–13 растений на линию. Из каждого растения была выделена геномная ДНК, при помощи секвенирования было подтверждено единообразие последовательностей гена *Nud* в каждой линии. Отсутствие трансгенности было подтверждено при помощи ПЦР-теста. Проведен сноповой анализ и сравнение с контролем. Результаты находятся в стадии обработки.

В результате работы получены три устойчивые нетрансгенные голозерные линии ячменя сорта Golden promise с разными мутациями в гене *Nud*.

Благодарности: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-14-00086).

Список литературы

1. Korotkova A.M. Current achievements in modifying crop genes using CRISPR/Cas system / A.M. Korotkova, S.V.Gerasimova, E.K. Khlestkina. // Vavilov journal of genetics and breeding –2019. – 23(1). – С. 29–37.
2. Gerasimova S.V. Genome editing system CRISPR/CAS9 and peculiarities of its application in monocots / S.V. Gerasimova, E.K. Khlestkina, A.V. Kochetov, V.K. Shumny // Russ. J. Plant Physiol – 2017. – Vol. 64, № 2. – С. 141–155.
3. Gerasimova S. Conversion of hulled into naked barley by Cas endonuclease-mediated knockout of the NUD gene / S. Gerasimova, C. Hertig, A. Korotkova, E. Kolosovskaya, I. Otto, S. Hiekel, A. Kochetov, E. Khlestkina, J. Kumlehn // BMC Plant Biology – 2020. – in press.

DOI 10.18699/GPB2020-42

Поиск и анализ гена-кандидата признака остистости мягкой пшеницы *Triticum Aestivum* L.

Куваева Д.Д.^{1,2}, студентка, Щербань А.Б.², д.б.н., с.н.с.

¹Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;

²Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

*e-mail: diana.kuvaeva@gmail.com

Проведен анализ первичной структуры генов-кандидатов, контролирующих проявление признака остистости в составе В1 локуса 5А хромосомы у остистых и безостых форм пшеницы. В результате было установлено, что ген *C2H2Znfp1* является наиболее вероятным кандидатом гена-ингибитора признака остистости мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. Комбинации специфических для рецессивного и доминантного аллелей этого гена праймеров показали точные результаты на выборке остистых и безостых форм.

Ключевые слова: пшеница, остистость, ген, локализация.

Search and analysis of the candidate gene associated with awn length in soft wheat *Triticum aestivum* L.

Kuvaeva Diana Dmitrievna^{1,2}, student Shcherban Andrey Borisovich², Doctor of Biological Sciences, senior researcher ¹Novosibirsk state University, Novosibirsk, Russia; ²Federal research center Institute of Cytology and Genetics of SB RAS, Novosibirsk, Russia.

The analysis of the primary structure of candidate genes that control the manifestation of the sign of awning in the composition of the B1 locus of the 5A chromosome in awned and awnless forms of wheat was carried out. As a result, it was found that the C2H2Znfin gene is the most likely candidate for the inhibitor of the sign of awning in soft wheat Triticum aestivum L. Combinations of primers specific for the recessive and dominant alleles of this gene showed accurate results on a sample of awned and awnless forms.

Key words: wheat, awn, gene, localization.

Изучение мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. диктуется ее важностью как одной из основных продовольственных культур и обусловлено в значительной степени запросами селекции. Установление генов, контролирующих проявление остистости, может быть использовано для изучения генетического разнообразия мягкой пшеницы по этому признаку и последующего отбора форм с повышенной продуктивностью на фоне меняющихся условий внешней среды [1]. Целью данного исследования был поиск гена-кандидата признака остистости и сопоставление его структуры у остистых и безостых форм пшеницы.

Объектами нашего исследования были выбраны шесть сортов мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. (Любава 5, Синтетик, Элемент 22, Стар +, Зауральская, Саратовская 29) и девять линий мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. (K1731, 5219, 6535, 15014, 20546, 62501, 24724, Скифянка, MV VEKNI). Материалы для исследования были взяты из коллекции лаборатории молекулярной генетики и цитогенетики растений ИЦиГ СО РАН.

На первом этапе выполнения данной работы мы выделяли геномную ДНК из растительного материала [2] и с помощью спектрофотометра определяли концентрацию выделенной ДНК. Проверку качества выделенной ДНК осуществляли электрофорезом в агарозном геле. В соответствии с данными спектрофотометрии и полученными электрофореграммами производилось разбавление образцов ДНК для выравнивания их концентраций.

Следующим этапом нашего исследования был анализ потенциальных генов кандидатов, контролирующих остистость. Было подобрано несколько пар специфических праймеров (таблица) к промоторному и кодирующему районам двух генов, находящихся в составе исследуемого локуса и кодирующих транскрипционный фактор C2H2Zincfinger (*C2H2Znfin*) и фермент фосфатидилсерин-декарбоксилазу (*Phs*).

Таблица – Праймеры, использованные в работе

Праймер	Последовательность нуклеотидов (5'→3')	Size	Часть гена	Tm, °C
B1for (прямой)	АТАААСТСССАСАТААТТАСТССГ	24	Промотор	51
b1for (прямой)	АТАААСТСССАСАТААТТАСТССС	24	Промотор	52
ZfinC2H2f (прямой)	GTTGTGTTGTGACAAGGGCTG	21	Промотор	57
ZfinC2H2r (обратный)	СТАСТГАТГТССТТАСТГССТ	22	3'-некодирующая	57
ZnfF (прямой)	GGTTGGTCATATCAACCATGAC	23	Промотор	59
ZnfR (обратный)	АТСГАССССТСТТСАТСТСС	22	Кодирующая	61
Phserf (прямой)	GGCAAGCATCTTGGGCTGTCC	21	Кодирующая	61
Phserg (обратный)	GCCGGGCAGAAGGAACTTGC	20	Кодирующая	62

В результате в обоих случаях не было выявлено никаких различий между сортами по длине продуктов ПЦР (рис. 1, 2).

Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации для гена *C2H2Znf*: а) кодирующий район; праймеры: ZfinC2H2f/ZfinC2H2r; б) промоторный район; праймеры: ZnfF/ZnfR

Выборка сортов 1–6: Любава 5, Синтетик, Элемент 22 (остистые); Стар +, Зауральская, Саратовская 29 (безостые). М – маркер 100 bp Ladder

Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации для гена *Phs*: кодирующий район; праймеры: Phserf/Phserg

Выборка сортов 1–6: Любава 5, Синтетик, Элемент 22 (остистые); Стар +, Зауральская, Саратовская 29 (безостые). М – маркер 100 bp Ladder

Этот результат указывает на отсутствие крупных изменений (делеций или инсерций) в составе этих генов у безостых сортов относительно остистых. Однако эти изменения могут представлять собой точковые мутации, не выявляемые с помощью электрофореза. Для поиска таких мутаций нами было проведено секвенирование ПЦР-продуктов, представляющих различные участки анализируемых генов из локуса остистости. Как оказалось, кодирующие участки того и другого гена у остистых и безостых сортов не отличаются по первичной структуре.

Вместе с тем в промоторном участке гена *C2H2Znfin* были выявлены 6 SNP [3]. Сравнение данного гена у остистых и безостых сортов в базе данных 10 сортов выявило точно такие же SNP.

Таким образом, именно данный ген представляется наиболее вероятным кандидатом для гена-ингибитора остистости *B1*. Для проверки этого предположения нами были сконструированы 2 комбинации специфических для рецессивного и доминантного аллелей этого гена (*b1* и *B1* соответственно) праймеров (табл. 1), фланкирующих промоторный участок, при этом прямой праймер в каждой комбинации содержал на 3'-конце сдвоенные SNP.

Далее эти комбинации проверили на выборке остистых и безостых сортов (рис. 3).

Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации: а) с праймерами для рецессивного аллеля *b1for/ZnfR*; наличие продукта для остистых форм; б) с праймерами для доминантного аллеля *B1for/ZnfR*; наличие продукта для безостых форм.

Выборка сортов: 1 – сорт Любава 5; 2 – сорт Синтетик; 3 – сорт Элемент 22; 4 – сорт Стар +; 5 – сорт Зауральская; 6 – сорт Саратовская 29; 7 – сорт Chinese spring. М – маркер 100 bp Ladder

Видно, что каждая комбинация маркирует соответствующий аллель анализируемого гена. В качестве положительного контроля рецессивного аллеля взят сорт Chinese Spring, содержащий этот аллель [4].

Таким образом, было установлено, что ген *C2H2Znfin* является наиболее вероятным кандидатом гена-ингибитора признака остистости мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. Комбинации специфических для рецессивного и доминантного аллелей этого гена праймеров показали точные результаты на выборке остистых и безостых форм.

Благодарности: Исследование было выполнено за счет средств Курчатовского геномного центра (075-15-2019-1662).

Список литературы

1. Yoshioka M., Iehisa J.C.M., Ohno R., Kimura T., Enoki H., Nishimura S., Nasuda S., Takumi S. Three dominant awnless genes in common wheat: Fine mapping, interaction and contribution to diversity in awn shape and length. Plos one, 2017.
2. Великов В.А. Молекулярная биология. Практическое руководство: Учеб. пособие для студ. биол. фак. – Саратов: Издательство «Саратовский источник», 2013. – 84 с.: ил.
3. Wang D., Yu K., Jin D., Sun L., Chu J., Wu W., Xin P., Li X., Sun J., Yang W., Zhan K., Zhang A., Liu D. ALI-1, candidate gene of B1 locus, is associated with awn length and grain weight in common wheat. BioRxiv, 2019.
4. Sourdille P., Cadalen T., Gay G., Gill B., Bernard M. Molecular and physical mapping of genes affecting awning in wheat. Plant Breed, 2002. 121: 320–324 c.

DOI 10.18699/GPB2020-43

Разработка генетико-селекционного подхода для получения новых сортов ячменя с повышенным содержанием антоцианов в зерне

Кукоева Т.В.^{1}, ст. лаборант-исследователь; Стрыгина К.В.², с.н.с.; Глаголева А.Ю.¹ аспирант, м.н.с.; Григорьев Ю.Н.³, с.н.с.; Шоева О.Ю.¹, с.н.с., зав. сектором; Хлесткина Е.К.^{1,2}, в.н.с., директор ВИР.*

¹ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН (ИЦиГ СО РАН), Новосибирск, Россия;

²Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия;

³СибНИИРС – филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия.

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

Необходимость создания исходного материала и сортов ячменя с повышенным содержанием антоцианов для функционального питания становится все более ощутимой как для России в целом, так и для Сибирского региона в частности. В предложенной работе на основе знаний о молекулярно-генетических механизмах формирования признаков антоциановой пигментации у ячменя были разработаны и реализуются на практике оптимальные схемы получения новых сортов с повышенным содержанием антоцианов в зерне.

Ключевые слова: Hordeum vulgare, маркер-ориентированная селекция, перикарп, алейрон, фиолетовое зерно, голубое зерно.