

ГЕНЕТИКА КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ ДИКИХ РОДИЧЕЙ

Научная статья

УДК 575.22

DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-112-119

**Анализ нуклеотидных последовательностей гена гликозилтрансферазы *GT47* у сортов ржи, различающихся по содержанию водорастворимых пентозанов в зерне**Е. А. Заикина¹, Р. Р. Каюмова², А. Р. Кулуев¹, Р. Р. Исмагилов², Б. Р. Кулуев^{1,3}¹ Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Институт биохимии и генетики, Уфа, Россия² Башкирский государственный аграрный университет, Уфа, Россия³ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия**Автор, ответственный за переписку:** Евгения Александровна Заикина, evisheva@yandex.ru

Рожь (*Secale cereale* L.) – важнейшая сельскохозяйственная культура России, качество зерна которой зависит от содержания в ней водорастворимых пентозанов. Зерна сортов ржи с высоким содержанием водорастворимых пентозанов обладают хорошими хлебопекарными свойствами, но низкими кормовыми качествами. Методы маркер-ориентированной селекции по данному признаку для ржи остаются не разработанными. С содержанием пентозанов в зерне пшеницевых могут быть связаны гены гликозилтрансфераз *GT47*, однако у ржи гены этого семейства не идентифицированы. Целью данной работы были амплификация, секвенирование и поиск однонуклеотидных замен или других мутаций в гене *GT47* у различных сортов ржи, отличающихся по содержанию водорастворимых пентозанов в зерне и вязкости водного экстракта.

В работе были использованы популяционные сорта ржи ‘Чулпан 7’ и ‘Подарок’, гибриды F₁ ‘КВС Авиатор’, ‘КВС Магнifico’ и ‘КВС Этерно’. Наибольшее содержание пентозанов и наибольшая кинематическая вязкость водного экстракта были выявлены у сорта ‘Чулпан 7’. Наименьшие величины данных показателей были у гибридного сорта ‘КВС Авиатор’. Анализ нуклеотидных последовательностей гена гликозилтрансферазы *GT47* показал наличие однонуклеотидных замен в семи локусах, по которым различались исследуемые сорта ржи. Из них по трем нуклеотидным заменам 159 (G/A), 204 (C/T), 327 (G/A) между собой различались высокопентозановый сорт ‘Чулпан 7’ и низкопентозановый ‘КВС Авиатор’. Предполагается, что данные SNPs могут быть использованы при генотипировании сортов ржи на содержание водорастворимых пентозанов в зерне.

Ключевые слова: *Secale cereale*, вязкость водного экстракта, секвенирование, однонуклеотидные замены, SNP, генотипирование

Благодарности: исследования Е.А. Заикиной и А.Р. Кулуева выполнены в рамках государственного задания № 122030200143-8; работа Б.Р. Кулуева поддержана грантом Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2021-1066 от 28.09.2021).

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Для цитирования: Заикина Е.А., Каюмова Р.Р., Кулуев А.Р., Исмагилов Р.Р., Кулуев Б.Р. Анализ нуклеотидных последовательностей гена гликозилтрансферазы *GT47* у сортов ржи, различающихся по содержанию водорастворимых пентозанов в зерне. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2023;184(2):112-119. DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-112-119

GENETICS OF CULTIVATED PLANTS AND THEIR WILD RELATIVES

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-112-119

Analysis of nucleotide sequences of the *GT47* glycosyltransferase gene in rye cultivars differing in the content of water-soluble pentosans in grainEvgeniya A. Zaikina¹, Rosa R. Kayumova², Azat R. Kuluev¹, Rafael R. Ismagilov², Bulat R. Kuluev^{1,3}¹Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa, Russia²Bashkir State Agrarian University, Ufa, Russia³N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia**Corresponding author:** Evgeniya A. Zaikina, evsheva@yandex.ru

Rye (*Secale cereale* L.) is the most important crop in Russia, its grain quality depends on the content of water-soluble pentosans. The grain of rye cultivars with high content of water-soluble pentosans has good baking properties, but low fodder qualities. Methods of marker-assisted selection for this trait in rye remain undeveloped. For Triticeae, the content of pentosans in grain may be associated with the *GT47* glycosyltransferase genes, but the genes of this family have not been identified in rye. The aim of this study was amplification, sequencing, and search for single nucleotide substitutions or other mutations in the *GT47* gene in various rye cultivars differing in the content of water-soluble pentosans in their grain and the viscosity of their aqueous extract. DNA from rye leaves was isolated by the standard CTAB method. Based on the nucleotide sequences of the bread wheat and barley *GT47* genes, universal primers were selected, then a fragment of the open reading frames of the studied gene was amplified, and the nucleotide sequences were determined by automatic capillary sequencing.

The population cultivars of rye, 'Chulpan 7' and 'Podarok', and F₁ hybrids 'KVS Aviator', 'KVS Magnifico' and 'KVS Eterno' were analyzed. The highest content of pentosans and the highest kinematic viscosity of the aqueous extract were found in cv. 'Chulpan 7'. The lowest values of these indicators were shown by the hybrid cv. 'KVS Aviator'. The analysis of the nucleotide sequences of the *GT47* gene revealed the presence of single-nucleotide substitutions in seven loci, in which the studied rye cultivars differed. Of these, the high-pentosan cv. 'Chulpan 7' and the low-pentosan cv. 'KVS Aviator' differed in three nucleotide substitutions: 159 (G/A), 204 (C/T), and 327 (G/A). It is suggested that these SNPs can be used for genotyping rye cultivars for the content of water-soluble pentosans in grain.

Keywords: *Secale cereale*, rye, water extract viscosity, sequencing, single-nucleotide substitutions, SNP, genotyping**Acknowledgements:** the study by E.A. Zaikina and A.R. Kuluev was carried out within the framework of State Task No. 122030200143-8; the study of B.R. Kuluev was supported by a grant from the Ministry of Science and Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2021-1066 of Sept. 28, 2021).

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

For citation: Zaikina E.A., Kayumova R.R., Kuluev A.R., Ismagilov R.R., Kuluev B.R. Analysis of nucleotide sequences of the *GT47* glycosyltransferase gene in rye cultivars differing in the content of water-soluble pentosans in grain. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2023;184(2):112-119. DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-112-119

Введение

Рожь (*Secale cereale* L.) является важнейшей зерновой культурой в России. Обладает устойчивостью к засухе, низким температурам, солевому и алюминиевому стрессу и способна расти на низко плодородных, песчаных почвах. Зерно ржи применяют в пищевой промышленности для выпечки хлеба и производства спирта, в сельском хозяйстве как корм животным. Одним из важных показателей качества зерна у данной культуры является содержание водорастворимых пентозанов, которые входят в состав клеточных стенок (Kozlova et al., 2022). Сорты ржи с высоким содержанием пентозанов и, соответственно, с большей вязкостью экстракта характеризуются хорошими хлебопекарными качествами, так как имеют большой объем и газодерживающую способность. Но высокое содержание пентозанов может нарушать процесс пищеварения, снижая всасывание питательных веществ, что приводит к прекращению прироста массы тела у сельскохозяйственных животных. Поэтому высокопентозановые сорта считаются непригодными для кормовых целей (Ismagilov, Gaysina, 2015). Исходя из этого, задачи селекции ржи для использования в хлебопекарной и фуражной отраслях могут отличаться. В последние годы возрастает применение ржи для откорма сельскохозяйственных животных и, соответственно, становится актуальным создание сортов ржи с низким содержанием пентозанов (Kobylianskiy et al., 2017). На количество водорастворимых пентозанов влияет генотип растения (Ismagilov et al., 2018), что дает возможность создания низкопентозановых кормовых сортов ржи (Kobylianskiy, Solodukhina, 2015). Для ускорения селекции может быть применено SNP-генотипирование, являющееся быстрым методом выявления нужных для селекции генотипов растений (Garafutdinov et al., 2021). Для создания низкопентозановых сортов ржи необходима информация о генах, влияющих на количество пентозанов в растении. В литературе на данный момент имеется мало информации о возможных целевых генах и их аллелях, ассоциированных с содержанием пентозанов в зерне ржи (Kozlova et al., 2022).

Пентозаны ржи преимущественно представлены арабиноксиланами, состоящими из линейной цепи остатков β-D-ксилопиранозила, связанных 1 → 4 гликозидными связями, к которым остатки α-1-арабинофуранозила присоединены в положениях O₂, O₃ или в обоих положениях одновременно. Арабиноксиланы могут расщепляться ферментами, относящимися к классу гидролаз, а именно ксиланазами. Это в конечном счете приводит к снижению вязкости и улучшению усвоения питательных веществ. Биосинтез полисахаридов клеточной стенки, таких как пектины, ксиланоглюканы и ксиланы, катализируется гликозилтрансферазами (GT), в частности ферментами семейства GT47, известными как Irregular Xylem 10 (Mortimer et al., 2015). Т. К. Pellny et al. (2012) было показано, что с синтезом клеточной стенки в крахмалистом эндосперме мягкой пшеницы связаны гликозилтрансферазы GT47 2, GT43 2 и GT43 1. У риса ген *OsGT47A*, гомологичный *AtIRX10 A. thaliana*, участвует в синтезе ксилана (Zhang et al., 2014). У мягкой пшеницы сайленсинг гена *TaGT47 2* приводит к заметному снижению содержания арабиноксиланов (Lovegrove et al., 2013). Исходя из литературных данных, можно сказать, что необходимо продолжать изучение арабиноксиланов с целью расширения знаний о вкладе генов, связанных с водорастворимостью пентозанов. В связи с этим целью нашей

работы стал поиск однонуклеотидных замен или других мутаций в гене *GT47* у различных сортов ржи, отличающихся по кинематической вязкости водного экстракта и содержанию водорастворимых пентозанов в зерне. Но гены гликозилтрансфераз у ржи пока еще не известны, в связи с чем изучение генов *GT* этой культуры затруднено. В то же время у ближайших родственников ржи – мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. и ячменя *Hordeum vulgare* L. последовательности нуклеотидов генов гликозилтрансфераз *GT47* доступны в GenBank под номерами HF913570.1, HF913571.1, HF913572.1, AK366860.1. Поэтому была поставлена задача подбора универсальных праймеров для амплификации и секвенирования фрагмента гена *GT47* ржи, используя нуклеотидные последовательности предполагаемых ортологов из геномов мягкой пшеницы и ячменя.

Материалы и методы

Объектами исследования послужили сорта ржи *S. cereale* из коллекции Башкирского государственного аграрного университета (БГАУ), отобранные и находящиеся в селекционной работе в Республике Башкортостан в последние 5 лет. Для экспериментов взяты следующие популяционные сорта ржи: 'Чулпан 7' и 'Подарок', а также гибриды F₁ 'КВС Авиатор', 'КВС Магнифико' и 'КВС Этерно'.

'Чулпан 7' получен сложной гибридизацией с участием сортов 'Чулпан', 'Чулпан 3', 'Отелло', 'Кустро', 'Имериг' и др. с многократным индивидуально-семейственным отбором. Масса 1000 зерен составляет в среднем 33,0 г. Данный сорт отличается высокими хлебопекарными качествами зерна.

'Подарок' получен индивидуально-семейственным отбором из гибридной популяции, созданной с участием сортов 'Татарская 1', 'Эстафета Татарстана' и популяции с низким содержанием водорастворимых пентозанов. Масса 1000 зерен: 24–35 г. Отличительная особенность сорта – пониженное содержание водорастворимых пентозанов.

'КВС Авиатор' – гибрид первого поколения F₁. Родословная: (Lo 1019-P × Lo 2002-N) × LSR 136. Масса 1000 зерен: 32–39 г. Хлебопекарные качества удовлетворительные и хорошие.

'КВС Магнифико' – гибрид первого поколения F₁. Родословная: (ЛО 115 П × ЛО 142 Н) × ЛСР 88. Масса 1000 зерен: 28–40 г. Хлебопекарные качества зерна удовлетворительные.

'КВС Этерно' – гибрид первого поколения F₁. Родословная: (ЛО 1019 П × ЛО 1017 Н) × ЛСР 122. Масса 1000 зерен: 33–41 г. Хлебопекарные качества удовлетворительные. Одинаково пригоден как для пищевой промышленности, так и для кормления животных.

Содержание водорастворимых пентозанов в зерне определяли орцинол-хлоридным методом, модифицированным S. Hashimoto et al. (1987) и J. A. Delcour et al. (1991). Размельчали 100 мг зерна и добавляли 10 мл дистиллированной воды. Колбу закрывали крышкой и встряхивали 2 часа при температуре 30°C. Далее центрифугировали до получения прозрачного раствора. К 1 мл полученной надосадочной жидкости добавляли 1 мл 4M HCl, помещали в пробирку с герметичной крышкой, гидролизывали 2 часа при температуре 100°C и охлаждали. 1 мл гидролизованного раствора разбавляли 1 мл дистиллированной воды. 1 мл полученного раствора помещали в пробирку с герметичной крышкой и добавля-

ли 2 мл дистиллированной воды, 3 мл 0,1-процентного раствора FeCl_3 в концентрированной HCl , 0,3 мл 1-процентного раствора орцина в 100-процентном этаноле. Нагревали в кипящей водяной бане 30 мин, охлаждали и снимали показание поглощения на спектрометре LS-55 (Perkin Elmer, США). Содержание водорастворимых пентозанов рассчитывали по формуле:

$$P = (A_{670}) 4 m \times 0,88 \times 0,01,$$

где P – содержание пентозанов, %;

A_{670} – оптическая плотность образца при длине волны 670 нм;

m – концентрация ксилозы по калибровочному графику;

4; 0,88 и 0,01 – коэффициенты пересчета содержания водорастворимых пентозанов.

Кинематическую вязкость водного экстракта зерна определяли капиллярным вискозиметром ВПЖ-1 с внутренним диаметром капилляра 1,52 мм (Goncharenko et al., 2007). Образцы муки экстрагировали водой в отношении 1 : 5 (масса/объем). Суспензии встряхивали в течение 1 часа при комнатной температуре (20–25°C) и затем центрифугировали при 1000 об/мин в течение 20 мин. Определяли время истечения надосадочной жидкости вискозиметром ВПЖ-1. Величину кинематической вязкости жидкости вычисляли в сантистоксах (сСт) по формуле:

$$V = g/9,807 \times T \times K,$$

где V – кинематическая вязкость жидкости, сСт;

K – постоянная вискозиметра, $\text{мм}^2/\text{с}^2$;

T – время истечения жидкости, с;

g – ускорение свободного падения в месте измерения, $\text{м}/\text{с}^2$.

При внутреннем диаметре капилляра 1,52 мм $K = 0,2926 \text{ мм}^2/\text{с}^2$.

Достоверность различий в экспериментах по определению вязкости и содержанию пентозанов оценивали по тесту Duncan ($P < 0,05$).

Растения ржи для выделения ДНК выращивали в вегетационных сосудах объемом 500 мл в теплице при +18°C при естественном освещении. Тотальная ДНК была выделена из листьев месячных растений с использованием СТАВ (Doyle J.J., Doyle J.L., 1987). Для каждого сорта ДНК выделяли из трех разных растений и в дальнейшем с каждым образцом ДНК работали отдельно. Качество выделенной тотальной ДНК ржи оценивали при помощи электрофореза в 1-процентном агарозном геле. Последовательности праймеров для амплификации и секвенирования исследуемого гена были подобраны впервые в рамках данной работы. Для этого, вначале путем выравнивания последовательностей нуклеотидов генов *GT47* мягкой пшеницы и ячменя (HF913570.1, HF913571.1, HF913572.1, AK366860.1), при помощи программы MegAlign пакета Lasergene (DNASar, США) было выявлено множество консервативных участков протяженностью более 20 пн. Для подбора праймеров к этим консервативным участкам использовали программу PrimerSelect пакета Lasergene (DNASar, США), некоторые термодинамические параметры праймеров оценивали с помощью онлайн-утилиты Oligoanalyzer, специфичность проверяли с помощью BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). В итоге были подобраны следующие праймеры: GT47AF 5'-GTGATGTGCTGGACGATGACC-3' и GT47AR 5'-GGGATGCAGCCGAAAACC-3'. Предсказанный размер ампликона по нуклеотидной последовательности ячменя AK366860.1 (в форме кДНК, без интронов) составил 799 пн, оптимальная температура отжига праймеров – 58°C. Реакцию

амплификации проводили в 0,2-миллилитровых пробирках AXYGEn, Inc. (США) в объеме 25 мкл, используя стандартный набор «Синтол» (Россия). Амплификацию геномной ДНК осуществляли по следующей программе: начальная денатурация – 95°C – 5 мин; 35 циклов: денатурация 95°C – 40 с, отжиг 58°C – 40 с, элонгация 72°C – 1 мин; финальная элонгация 72°C – 3 мин. Детекцию ПЦР-продуктов осуществляли с помощью горизонтального электрофореза в 1,5-процентном агарозном геле с добавлением бромистого этидия.

Для секвенирования продуктов ПЦР использовали в среднем 500 нг каждого продукта ПЦР, полученного выше, и очищали с помощью следующей реакции: 1 ЕД щелочной фосфатазы (NEB, США) и 10 ЕД экзонуклеазы I (NEB, США) в конечном объеме 10 мкл при 37°C в течение 15 мин с последующей инактивацией фермента при 85°C в течение 15 мин. 1 мкл (~ 50 нг) каждого из очищенных выше образцов непосредственно использовали в качестве матрицы для секвенирования. Реакцию ставили с использованием 10 пМ праймера и 0,5 мкл BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix в конечном объеме 10 мкл. Последовательность циклов секвенирующей реакции: денатурация при 96°C в течение 10 с, отжиг праймера при 58°C в течение 5 с и элонгация при 60°C в течение 4 мин для всех 30 циклов. Флуоресцентно меченые продукты ПЦР анализировали с использованием секвенатора Applied Biosystems 3500 (Thermo Fisher Scientific, США). При секвенировании исследуемых генов каждого образца использовали три биологические повторности. Секвенирование проводили только с одного конца при помощи прямого праймера GT47AF. Далее для каждого образца путем выравнивания трех полученных последовательностей было составлено по одной консенсусной последовательности. Данная процедура проводилась прежде всего для избегания возможных ошибок секвенирования. Выравнивание последовательностей нуклеотидов методом ClustalW и обнаружение предполагаемых мутаций проводили с использованием программы MegAlign пакета Lasergene (DNASar, США).

Результаты

Имеются сведения, что вязкость водного экстракта (ВВЭ) зерна коррелирует с содержанием водорастворимых пентозанов (Goncharenko et al., 2007), хотя этот показатель, безусловно, зависит и от некоторых других соединений. Поэтому на первом этапе нами была определена ВВЭ, которая оказалась наиболее высокой у сорта 'Чулпан 7', а у сорта 'КВС Авиатор' была выявлена наименьшая ВВЭ зерна (таблица). В диапазоне 8,0–14,2 сСт расположились сорта 'Подарок', 'КВС Этерно' и 'КВС Магнifico'.

В нашей работе содержание водорастворимых пентозанов также соотносилось с показателем ВВЭ (см. таблицу). К примеру, именно сорт 'Чулпан 7' с наибольшей вязкостью отличился наиболее высоким содержанием водорастворимых пентозанов, а сорт 'КВС Авиатор' с низкой вязкостью, наоборот, самым низким содержанием пентозанов. Сорта 'Подарок', 'КВС Магнifico' и 'КВС Этерно' имели средние значения по содержанию водорастворимых пентозанов (см. таблицу). Таким образом, нами для дальнейшей работы в качестве высокопентозанового сорта был выбран 'Чулпан 7', а низкопентозанового – 'КВС Авиатор'. Остальные сорта в рамках данной работы условно было принято считать среднепентозановыми.

Таблица. Вязкость водного экстракта и содержание водорастворимых пентозанов в зерне исследуемых сортов ржи**Table. Water extract viscosity and the content of water-soluble pentosans in the grain of the studied rye cultivars**

Сорт / Cultivar	Кинематическая вязкость, *сСт / Kinematic viscosity, cSt*	Содержание водорастворимых пентозанов, % / Content of water-soluble pentosans, %
Чулпан 7 / Chulpan 7	23,1 ± 3,2	2,12 ± 0,4
Подарок / Podarok	14,2 ± 2,4	1,34 ± 0,2
КВС Авиатор / KVS Aviator	5,6 ± 1,5	0,86 ± 0,1
КВС Магнифико / KVS Magnifico	10,0 ± 1,8	1,16 ± 0,2
КВС Этерно / KVS Eterno	8,0 ± 2,3	1,07 ± 0,1

Примечание: жирным выделены самый высокий и самый низкий показатели вязкости и содержания пентозанов в зерне ржи, которые достоверно различались между собой ($P < 0,05$); * сСт – сантистокс

Note: boldfaced are the highest and lowest values of viscosity and pentosan content in rye grain, which significantly differed from each other ($P < 0.05$); cSt* – centistokes

Ранее нами был произведен анализ литературы по генам, которые могут быть связаны с содержанием водорастворимых пентозанов у пшеницевых (Ibragimova, Kuluev, 2020). Одним из таких генов является ген гликозилтрансферазы *GT47*, который уже идентифицирован у ряда ближайших родственников ржи из трибы пшеницевых, например у мягкой пшеницы и ячменя. Так как геном ржи не аннотирован, нами был осуществлен подбор универсальных праймеров, которые подходят для амплификации предполагаемых ортологов гена *GT47* мягкой пшеницы и ячменя. Вначале эти праймеры были испытаны на ДНК мягкой пшеницы, при этом образовывался ампликон размером около 1300 пн. Далее праймеры *GT47AF/GT47AR* были апробированы на тотальной ДНК ржи. В результате проведенного ПЦР для всех анализируемых сортов ржи были получены аналогичного размера ампликоны – около 1300 пн (рис. 1). Между собой анализируемые сорта по размеру ампликона также не различались (см. рис. 1). Бóльший размер амплифицированного участка, чем теоретически рассчитанный, объясняется тем, что в GenBank депонированы последова-

тельности генов *GT47* мягкой пшеницы и ячменя в форме кДНК без интронов.

После этапа секвенирования проводился поиск SNPs и других мутаций в гене *GT47* в анализируемых сортах ржи: 'Чулпан 7', 'Подарок', 'КВС Авиатор', 'КВС Магнифико' и 'КВС Этерно'. По 3 секвенированных последовательности каждого образца были выравнены с помощью программы MegAlign, и составлены консенсусные последовательности, с которыми проводилась дальнейшая работа. Отметим, что ни одной ошибки секвенирования при этом анализе не было выявлено. Выравнивание консенсусных последовательностей фрагментов гена *GT47* показало наличие SNPs в положениях 159 (G/A), 171 (C/T), 180 (A/C), 204 (C/T), 213 (T/C), 246 (T/C), 327 (G/A). Наибольший интерес вызывают замены в сортах 'Чулпан 7' и 'КВС Авиатор', так как они являются наиболее контрастными по содержанию водорастворимых пентозанов в зерне. Однонуклеотидные замены между этими двумя сортами ржи были обнаружены в позициях 159 (G/A), 204 (C/T) и 327 (G/A) (рис. 2). Именно эти SNPs могут быть ассоциированы с высоким и низким содержанием

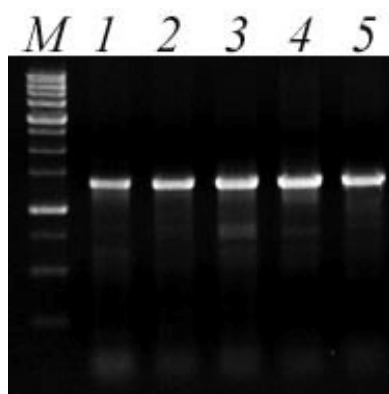


Рис. 1. Электрофореграмма результатов ПЦР фрагмента гена *GT47* ржи: М – маркер молекулярной массы 1 kb («Евроген», Россия); 1 – 'Чулпан 7'; 2 – 'Подарок'; 3 – 'КВС Авиатор'; 4 – 'КВС Магнифико'; 5 – 'КВС Этерно'

Fig. 1. Electropherogram of the PCR results for the rye *GT47* gene fragment: М – 1 kb molecular weight marker (Evrogen, Russia); 1 – 'Chulpan 7'; 2 – 'Podarok'; 3 – 'KVS Aviator'; 4 – 'KVS Magnifico'; 5 – 'KVS Eterno'

☒ Consensus	GACGCCTTCGGGTCTCCCTTGCCATTCAAGTCTCCGCGAATGATGCGCAGCGCGATTGAGC'									
5 Sequences	160	170	180	190	200	210				
1. GT_47	GACGCCTTCGGGTCTCCCTTGCCATTCAAGTCTCCGCGAATGATGCGCAGCGCGATTGAGC'									
2. GT_47	GACGCCTTCGGGTCTCCCTTGCCATTCAAGTCTCCGCGAATGATGCGCAGCGCGATTGAGC'									
3. GT_47	GACGCCTTCGGGTCTCCCTTGCCATTCAAGTCTCCGCGAATGATGCGCAGCGCGATTGAGC'									
4. GT_47	GACGCCTTCGGGTCTCCCTTGCCATTCAAGTCTCCGCGAATGATGCGCAGCGCGATTGAGC'									
5. GT_47	GACGCCTTCGGGTCTCCCTTGCCATTCAAGTCTCCGCGAATGATGCGCAGCGCGATTGAGC'									
☒ Consensus	ACGAAATGGCCTTACTGGAATAGATCGGA..ACAGACACATGAGCAAATCCTTGCTGTTGCAC									
5 Sequences	230	240	250	320	330	340				
1. GT_47	ACGAAATGGCCTTACTGGAATAGATCGGA..ACAGACACATGAGCAAATCCTTGCTGTTGCAC									
2. GT_47	ACGAAATGGCCTTACTGGAATAGATCGGA..ACAGACACATGAGCAAATCCTTGCTGTTGCAC									
3. GT_47	ACGAAATGGCCTTACTGGAATAGATCGGA..ACAGACACATGAGCAAATCCTTGCTGTTGCAC									
4. GT_47	ACGAAATGGCCTTACTGGAATAGATCGGA..ACAGACACATGAGCAAATCCTTGCTGTTGCAC									
5. GT_47	ACGAAATGGCCTTACTGGAATAGATCGGA..ACAGACACATGAGCAAATCCTTGCTGTTGCAC									

Рис. 2. Результаты выравнивания фрагментов гена *GT47* у исследованных сортов ржи: 1 – 'Чулпан 7'; 2 – 'Подарок'; 3 – 'КВС Авиатор'; 4 – 'КВС Магнifico'; 5 – 'КВС Этерно' (нумерацию нуклеотидов осуществляли согласно консенсусной последовательности гена *GT47* для всех анализируемых сортов, формируемой программой MegAlign)

Fig. 2. Alignment results for the *GT47* gene fragments in the studied rye cultivars: 1 – 'Chulpan 7'; 2 – 'Podarok'; 3 – 'KVS Aviator'; 4 – 'KVS Magnifico'; 5 – 'KVS Eterno' (nucleotide numbering was made according to the consensus sequence of the *GT47* gene for all analyzed cultivars, formed with the MegAlign program)

пентозанов в зерне. Замены в позициях 171 (С/Т), 180 (А/С), 213 (Т/С), 246 (Т/С) были характерны для разных сортов и, вероятно, не связаны с содержанием пентозанов. Также отметим, что замены в позициях 180 и 213 обнаруживались между высоко- и низкопентозановыми сортами 'Чулпан 7' и 'КВС Авиатор' и сортами, имевшими средние значения по содержанию пентозанов (см. рис. 2).

Обсуждение результатов

По литературным данным, можно полагать, что ген *GT47* ржи и его белковый продукт могут оказывать влияние на содержание водорастворимых пентозанов, и поэтому интересен поиск в этом гене SNPs, которые могут оказаться маркерами высокого или низкого содержания арабиноксиланов. Нами были найдены 7 SNPs в исследуемых сортах ржи: 'Чулпан 7', 'Подарок', 'КВС Авиатор', 'КВС Магнifico' и 'КВС Этерно'. У сортов 'Чулпан 7', 'Подарок', 'КВС Магнifico' в положении 159 расположен нуклеотид G, а у 'КВС Авиатор', 'КВС Этерно' – нуклеотид А. В данной позиции замена G/A характерна для высоко- и низкопентозановых сортов (Чулпан 7/КВС Авиатор). Такие же замены обнаружены в позициях 204 и 327. Так, в положении 204 нуклеотид С был характерен для сортов: 'Чулпан 7', 'Подарок', 'КВС Магнifico' и 'КВС Этерно', а нуклеотид Т обнаружен только в низкопентозановом сорте 'КВС Авиатор'. Подобная картина наблюдалась в позиции 327; так, нуклеотид G обнаружен во всех образцах, кроме 'КВС Авиатор'. Остальные выявленные нами замены не были связаны с высоким или низким содержанием водорастворимых пентозанов. В позиции 171 нуклеотид С обнаруживался в сортах 'Чулпан 7', 'КВС Авиатор' и 'КВС Этерно', а нуклеотид Т – у сортов 'Подарок' и 'КВС Магнifico'. Нуклеотид С в положении 180 обнаружен у сортов 'Чулпан 7' и 'КВС Авиатор', а сорта со средними значениями вязкости имели в данной позиции нуклеотид А. Такая особенность сохранялась и в положении 213. Так, нуклеотид Т имели сорта 'Подарок', 'КВС Магнifico' и 'КВС Этерно', а нуклеотид С был характерен для сортов с высоким и низким содержанием водорастворимых пентозанов (см. рис. 2).

Методы определения содержания пентозанов требуют наличия специального оборудования и не всегда хорошо воспроизводятся. Но известно, что вязкость водного экстракта преимущественно зависит от содержания пентозанов (Goncharenko et al., 2007). Поэтому для оценки кормовых и хлебопекарных качеств зерна ржи можно использовать быстрый метод определения вязкости водного экстракта. Для отбора низкопентозановых линий также предлагается цилиндрический диафаноскоп, используемый для определения толщины покрова семян, который находится в прямой зависимости к содержанию пентозанов (Goncharenko et al., 2021). В то же время известно, что содержание пентозанов может зависеть не только от генотипа сорта, но и от условий выращивания. Поэтому для селекционера может представлять определенные трудности ежегодно проводить эффективный отбор и сохранение ценных генотипов, полагаясь только на морфобиологические и биохимические маркеры. Более того, в процессе селекции часто приходится работать с небольшим числом зерновок, а биохимический анализ сопряжен с нарушением их целостности и разрушением объекта селекции. В этой связи можно предложить использовать методы маркер-ориентированной селекции, применяя аллель-специфичную ПЦП к SNPs в генах гликозилтрансфераз, которая не требует наличия зерновок, так как ДНК выделяют из листьев. К сожалению, SNP-маркеры хозяйственно ценных признаков у ржи остаются пока неизвестными. Здесь мы представляем одну из первых работ по поиску возможных SNP-маркеров, ассоциированных с высоким и низким содержанием пентозанов в зерне. Мы впервые предлагаем проводить поиск SNPs в гене *GT47* с целью выявления ценных генотипов ржи, отличающихся высоким и низким содержанием водорастворимых пентозанов. Наиболее подходящими SNPs для этой цели, вероятно, являются замены 159 (G/A), 204 (С/Т), 327 (G/A), на которые можно подобрать аллель-специфичные праймеры и проводить генотипирование линий и сортов ржи. Данная технология может служить дополнением к методам определения кинематической вязкости водного экстракта и содержания водорастворимых пентозанов в зерне. Однако при отборе

низкопентозановых сортов ржи необходимо не забывать, что *GT47* играют важную роль также в регуляции устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам. К примеру, у кукурузы ген *GT47* вовлечен в формирование засухоустойчивости (Tan et al., 2018). J. Chowdhury et al. (2017) было показано, что гены *GT43* и *GT47* благодаря вкладу в активный биосинтез ксиланов повышают жесткость клеточной стенки и, следовательно, устойчивость к патогенам, в частности к мучнистой росе. Таким образом, при уменьшении содержания пентозанов в зерне ржи может падать стрессоустойчивость данной культуры, что необходимо учитывать в селекционных программах. С другой стороны, в последние годы также повышается актуальность получения высокопентозановых сортов, которые могут быть использованы в функциональном питании человека (Kaur et al., 2021).

Сорта ржи с разным содержанием пентозанов в зерне могут различаться по уровню экспрессии генов гликозилтрансфераз (Kozlova et al., 2022), поэтому представляет большой интерес поиск SNP-маркеров в промоторных областях этих генов. Эта работа сдерживается тем, что рожь остается одной из немногих хозяйственно ценных культур, геном которой секвенирован лишь в черном варианте и не аннотирован (Bauer et al., 2017).

Заключение

Нами впервые был секвенирован ген гликозилтрансферазы *GT47* у разных сортов ржи, различающихся по содержанию пентозанов в зерне. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей позволил выявить три однонуклеотидные замены в этом гене: 159 (G/A), 204 (C/T), 327 (G/A), по которым различались между собой высокопентозановый сорт 'Чулпан 7' и низкопентозановый сорт 'КВС Авиатор'. Предполагается, что данные SNPs могут быть использованы при генотипировании сортов ржи на содержание водорастворимых пентозанов в зерне, что может быть применено в маркер-ориентированной селекции данной культуры по двум важным хозяйственно ценным признакам: хлебопекарные и кормовые качества.

References / Литература

- Bauer E., Schmutzer T., Barilar I., Mascher M., Gundlach H., Martis M.M., et al. Towards a whole-genome sequence for rye (*Secale cereale* L.). *The Plant Journal*. 2017;89(5):853-869. DOI: 10.1111/tpj.13436
- Chowdhury J., Lück S., Rajaraman J., Douchkov D., Shirley N.J., Schwerdt J.G. et al. Altered expression of genes implicated in xylan biosynthesis affects penetration resistance against powdery mildew. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:445. DOI: 10.3389/fpls.2017.00445
- Delcour J.A., Vanhamel S., Hosenev R.S. Physico-chemical and functional properties of rye non-starch polysaccharides. II. Impact of a fraction containing water-soluble pentosans and proteins on gluten-starch loaf volumes. *Cereal Chemistry*. 1991;68(1):72-76.
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 1987;19:1-11.
- Garafutdinov R.R., Chemeris D.A., Sakhabutdinova A.R., Kuluev B.R., Chemeris A.V. The diversity of methods for the detection of polymorphic nucleotides in the known SNPs. I. Terms and brief list of approaches. *Biomics*. 2021;13(4):434-443. [in Russian] [Гарафутдинов Р.Р., Чемерис Д.А., Сахабутдинова А.Р., Кулуев Б.Р., Чемерис А.В. Разнообразие методов детекции полиморфных нуклеотидов в известных снипах. I. Термины и краткий перечень подходов. *Биомика*. 2021;13(4):434-443]. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-30
- Goncharenko A.A., Timoshchenko A.S., Berkutova N.S., Lazareva E.N. Viscosity of grain water extract in winter rye as universal parameter during breeding on principal use. *Agricultural Biology*. 2007;42(3):44-49. [in Russian] [Гончаренко А.А., Тимошенко А.С., Беркутова Н.С. Вязкость водного экстракта зерна озимой ржи как универсальный признак при селекции на целевое использование. *Сельскохозяйственная биология*. 2007;42(3):44-49].
- Hashimoto S., Shogren M.D., Pomeranz Y. Cereal pentosans: their estimation and significance. I. Pentosans in wheat and milled wheat products. *Cereal Chemistry*. 1987;64:30-34.
- Ibragimova Z.A., Kuluev B.R. Molecular basis of food and feed qualities of rye (*Secale cereale*) grain. *Biomics*. 2020;12(1):8-26. [in Russian] [Ибрагимова З.А., Кулуев Б.Р. Молекулярные основы пищевых и кормовых качеств зерна ржи (*Secale cereale*). *Биомика*. 2020;12(1):8-26]. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-2
- Ismagilov R.R., Gaysina L.F. The baking qualities of grain hybrids of winter rye. *Achievements of Science and Technology of AIC*. 2015;29(1):24-26. [in Russian] [Исмагилов Р.Р., Гайсина Л.Ф. Хлебопекарные качества зерна гибридов F₁ озимой ржи. *Достижения науки и техники АПК*. 2015;29(1):24-26].
- Ismagilov R.R., Gaysina L.F., Ahiyarova L.M., Ayupov D.S., Nurylgayanov R.B., Ahiyarov B.G. et al. Crop yields and baking qualities of F₁ winter rye hybrids grain in the forest-steppe of the Republic of Bashkortostan. *Journal of Engineering and Applied Sciences*. 2018;13(S8):6487-6493. DOI: 10.36478/jeasci.2018.6487.6493
- Kaur P., Sandhu K.S., Purewal S.S., Kaur M., Singh S.R. Rye: a wonder crop with industrially important macromolecules and health benefits. *Food Research International*. 2021;150(Pt A):110769. DOI: 10.1016/j.foodres.2021.110769
- Kobylianskii V.D., Solodukhina O.V. Use of donors of valuable traits of plants in breeding of new varieties of winter rye. *Achievements of Science and Technology of AIC*. 2015;29(7):7-12. [in Russian] [Кобылянский В.Д., Солодухина О.В. Использование доноров ценных признаков растений в селекции новых сортов озимой ржи. *Достижение науки и техники АПК*. 2015;29(7):7-12].
- Kobyliansky V.D., Solodukhina O.V., Lunegova I.V., Novikova S.P., Hlopyuk M.S., Makarov V.I. Rye breeding for low-pentosans and possibility of its use in animal feeding. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2017;178(1):31-40. [in Russian] [Кобылянский В.Д., Солодухина О.В., Лунегова И.В., Новикова С.П., Хлопюк М.С., Макаров В.И. Создание низкопентозановой ржи и возможности ее использования на корм животным. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2017;178(1):31-40]. DOI: 10.30901/2227-8834-2017-1-31-40
- Kobylyansky V.D., Solodukhina O.V., Nikonorova I.M. Morphological features of rye grain with low pentosan content. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2021;182(2):123-130. [in Russian] [Кобылянский В.Д., Солодухина О.В., Никонорова И.М. Морфологические особенности низкопентозанового зерна ржи. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2021;182(2):123-130]. DOI: 10.30901/2227-8834-2021-2-123-130

- Kozlova L.V., Nazipova A.R., Gorshkov O.V., Gilmullina L.F., Sautkina O.V., Petrova N.V. et al. Identification of genes involved in the formation of soluble dietary fiber in winter rye grain and their expression in cultivars with different viscosities of wholemeal water extract. *The Crop Journal*. 2022;10(2):532-549. DOI: 10.1016/j.cj.2021.05.008
- Lovegrove A., Wilkinson M.D., Freeman J., Pellny T.K., Tosi P., Saulnier L. et al. RNA interference suppression of genes in glycosyl transferase families 43 and 47 in wheat starchy endosperm causes large decreases in arabinoxylan content. *Plant Physiology*. 2013;163(1):95-107. DOI: 10.1104/pp.113.222653
- Mortimer J.C., Faria-Blanc N., Yu X., Tryfona T., Sorieul M., Ng Y.Z., et al. An unusual xylan in Arabidopsis primary cell walls is synthesized by GUX3, IRX9L, IRX10L and IRX14. *The Plant Journal*. 2015;83(3):413-426. DOI: 10.1111/tpj.12898
- Pellny T.K., Lovegrove A., Freeman J., Tosi P., Love C.G., Knox J.P. et al. Cell walls of developing wheat starchy endosperm: comparison of composition and RNA-Seq transcriptome. *Plant Physiology*. 2012;158(2):612-627. DOI: 10.1104/pp.111.189191
- Tan J., Miao Z., Ren C., Yuan R., Tang Y., Zhang X. et al. Evolution of intron-poor clades and expression patterns of the glycosyltransferase family 47. *Planta*. 2018;247(3):745-760. DOI: 10.1007/s00425-017-2821-6
- Zhang B., Zhao T., Yu W., Kuang B., Yao Y., Liu T. et al. Functional conservation of the glycosyltransferase gene GT47A in the monocot rice. *Journal of Plant Research*. 2014;127(3):423-432. DOI: 10.1007/s10265-014-0631-5

Информация об авторах

Евгения Александровна Заикина, кандидат биологических наук, научный сотрудник, Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение УФИЦ РАН, 450054 Россия, Уфа, пр. Октября, 71, лит. 1Е, evisheva@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1070-0804>

Роза Рифгатовна Каюмова, аспирант, Башкирский государственный аграрный университет, 450001 Россия, Уфа, ул. 50 лет октября, 34, rail.alimgafarov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6919-5190>

Азат Разяпович Кулуев, кандидат биологических наук, научный сотрудник, Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение УФИЦ РАН, 450054 Россия, Уфа, пр. Октября, 71, лит. 1Е, kuluev.azat91@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8563-1244>

Рафаэль Ришатович Исмагилов, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, Башкирский государственный аграрный университет, 450001 Россия, Уфа, ул. 50 лет октября, 34, ismagilovr_bsau@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6818-1050>

Буллат Разяпович Кулуев, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией, Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение УФИЦ РАН, 450054 Россия, Уфа, пр. Октября, 71, лит. 1Е, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, kuluev@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1564-164X>

Information about the authors

Evgeniya A. Zaikina, Cand. Sci. (Biology), Researcher, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Institute of Biochemistry and Genetics, a subdivision of the UFRC RAS, 71-1E Oktyabrya Ave., Ufa 450054, Russia, evisheva@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1070-0804>

Roza R. Kayumova, Postgraduate Student, Bashkir State Agrarian University, 34 50 let Oktyabrya St., Ufa 450001, Russia, rail.alimgafarov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6919-5190>

Azat R. Kuluev, Cand. Sci. (Biology), Researcher, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Institute of Biochemistry and Genetics, a subdivision of the UFRC RAS, 71-1E Oktyabrya Ave., Ufa 450054, Russia, kuluev.azat91@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8563-1244>

Rafael R. Ismagilov, Dr. Sci. (Agriculture), Professor, Bashkir State Agrarian University, 34 50 let Oktyabrya St., Ufa 450001, Russia, ismagilovr_bsau@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6818-1050>

Bulat R. Kuluev, Dr. Sci. (Biology), Professor, Leading Researcher, Head of a Laboratory, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Institute of Biochemistry and Genetics, a subdivision of the UFRC RAS, 71-1E Oktyabrya Ave., Ufa 450054, Russia, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, kuluev@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1564-164X>

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 27.09.2022; одобрена после рецензирования 07.03.2023; принята к публикации 01.06.2023. The article was submitted on 27.09.2022; approved after reviewing on 07.03.2023; accepted for publication on 01.06.2023.