

Полиморфизм генов ферментов антиоксидантной системы у культурных видов пшеницы и дикорастущих сородичей

О. Б. Райзер¹, О. Н. Хапилина¹, А. С. Туржанова¹, Д. Е. Тагиманова¹✉, Р. Н. Календарь¹

¹Национальный центр биотехнологии, Нур-Султан, Республика Казахстан

✉ E-mail: tagds@mail.ru

Аннотация. Цель – исследование полиморфизма генов супероксиддисмутазы (СОД) и амилазы у культурных видов пшеницы и дикорастущих сородичей, возможность использования их в качестве молекулярно-генетических маркеров для оценки генетического разнообразия сортов пшеницы. **Методы.** В качестве объектов исследований использованы сорта пшеницы, возделываемые в различные периоды в Казахстане, отдаленные сородичи и дикие виды пшениц. Материал был любезно предоставлен сотрудниками лаборатории генофонда НППЦ ЗХ им. А. И. Бараева, а также получен из коллекций генетических ресурсов USDA (<http://wheat.pw.usda.gov/GG3>), John Innes Centre (Germplasm Resources Unit, BBSRC) (<http://data.jic.bbsrc.ac.uk/cgi-bin/germplasm/cereals.asp>), Всероссийского института растениеводства им. Н. И. Вавилова (ВИР) (<http://91.151.189.38/virdb>). Выделение общей ДНК из этиолированных проростков семян проводили с использованием СТАВ-метода. Подбор праймеров для ПЦР амплификации, *in silico* ПЦР, анализ олигонуклеотидов и множественное выравнивание ДНК последовательностей, производили с помощью программы FastPCR (<http://primerdigital.com/fastpcr.html>). Биоинформатический анализ генов кандидатов проведен по базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), UniProt <http://www.uniprot.org/uniprot>), Ensembl Plants (<http://plants.ensembl.org>). **Результаты.** Анализ генетического разнообразия по спектрам изоферментов супероксиддисмутазы и амилазы у культурных видов пшеницы и дикорастущих сородичей, возделываемых в различные периоды селекции, показал, что уровень дифференциации между исследуемыми группами оказался довольно высоким, большая часть генетического разнообразия выявлена внутри групп. Генетическое разнообразие современных сортов пшеницы имеет более низкое количество полиморфных локусов и эффективных аллелей генов запасных белков, СОД и амилаз в сравнении с отдаленными сородичами и стародавними сортами из мировой коллекции. **Практическая значимость.** Исследование полиморфизма генных семейств супероксиддисмутазы и амилазы позволит повысить эффективность идентификации сортов и гибридов, изучения их гетерогенности и целенаправленного подбора родительских пар для скрещиваний.

Ключевые слова: пшеница, генетическое разнообразие, полиморфизм, изоферменты, супероксиддисмутазы, амилаза, молекулярно-генетические маркеры.

Для цитирования: Райзер О. Б., Хапилина О. Н., Туржанова А. С., Тагиманова Д. Е., Календарь Р. Н. Полиморфизм генов ферментов антиоксидантной системы у культурных видов пшеницы и дикорастущих сородичей // Аграрный вестник Урала. 2020. № 11 (202). С. 85–92. DOI: 10.32417/1997-4868-2020-202-11-85-92.

Дата поступления статьи: 16.09.2020.

Постановка проблемы (Introduction)

В настоящее время состав современных сортов пшеницы, возделываемых как в нашей стране, так и за рубежом, отличается низким генетическим разнообразием. Генетическое сходство сортов может иметь опасные последствия однообразной восприимчивости к патогенам. При благоприятных для развития патогена условиях эпифитотия может охватить обширные территории [1, с. 13]. Для расширения генетического разнообразия привлекают генетический материал стародавних сортов, диких сородичей и родственных видов. В процессе длительного культивирования в определенных климатических условиях местные сорта накопили уникальные комбинации аллелей генов, контролирующую способность противостоять неблагоприятным факторам внешней среды [2, с. 3]. Они имеют более высокий уровень популяционного полиморфизма в сравнении с современными, что делает их ценным ис-

точником генетического разнообразия для улучшения современных сортов. Основная часть местных стародавних сортов и созданные на их основе новые сорта характеризуется специфическим типом индивидуального развития. Несмотря на то что в современном производстве стародавние сорта не используются, однако в условиях нестабильности климатических условий они могут составить конкуренцию коммерческим сортам.

Для проведения анализа генетического разнообразия пшеницы использование методов, основанных на морфологических критериях, затратно и во многом зависит от условий окружающей среды. Анализ генетического разнообразия, основанный на применении молекулярных маркеров, используется около трех десятилетий, при этом в последние годы основной акцент делается на ДНК-маркеры, которые обладают существенными преимуществами по сравнению с морфологическими маркерами

вследствие высокого уровня полиморфизма, отсутствия влияния условий внешней среды и стадии развития организма. В настоящее время ДНК-маркеры общепризнаны как эффективный и надежный способ характеристики генетических ресурсов пшеницы.

Потребность в использовании различного рода молекулярных маркеров обуславливается современными инновациями в развитии маркерных технологий. Для оценки уровня генетического разнообразия сортов пшеницы используют белковые маркеры, ДНК-маркеры, а также изоферменты.

По мнению Л. Е. Иваченко, изоферментные маркерные системы – идеальная генетическая основа для решения практических задач, в том числе и секвенирования [3, с. 150]. Изоферментные маркеры являются носителями определенных функций в метаболизме и наряду с генами или локусами генома могут быть факторами идентификации этих функций. Изоферменты – простые и надежные маркерные системы для изучения широкого класса биологических явлений. Главными же преимуществами изоферментов как генетических маркеров являются кодоминантный характер наследования, четкое фенотипическое проявление и легкость идентификации [4, с. 497], [5, с. 122].

Использование изоферментных маркерных систем для генетического анализа ДНК позволит выявить полиморфизмы на внутри- и межвидовом уровне [6, с. 243], [7, с. 961].

Данный метод позволит выделить образцы пшеницы, которые будут использоваться в скрещиваниях для получения нового исходного материала.

Методология и методы исследования (Methods)

В качестве объектов исследований были использованы сорта культурных видов пшеницы и дикорастущих сорочидей, возделываемых в различные периоды в Казахстане. Материал был любезно предоставлен сотрудниками лаборатории генофонда НПС ЗХ им. А. И. Бараева, а также получен из коллекций генетических ресурсов USDA (<http://wheat.pw.usda.gov/GG3>), John Innes Centre (Germplasm Resources Unit, BBSRC) (<http://data.jic.bbsrc.ac.uk/cgi-bin/germplasm/cereals.asp>), Всероссийского института растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВИР) (<http://91.151.189.38/virdb>).

Экстракцию ДНК проводили из этиолированных проростков с использованием лизирующего СТАВ-HEPES буфера в присутствии РНКазы А (2 % СТАВ, 2 М NaCl, 10 мМ Na₃EDTA, 50 мМ HEPES, pH 5.3). Качественные и количественные показатели ДНК определены с использованием гель-электрофореза и спектрофотометра NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) [8, с. 121].

Визуализацию экстрагированной ДНК проводили с использованием системы гель-документации ChemiDoc-It@TS2 Imager (UVP), для чего проводили горизонтальный электрофорез в 1-процентном агарозном геле, помещенном в камеру с 1 × TAE-буфером (40 мМ Tris-CH₃COOH, pH 8.0) или 1 × TBE (20 мМ Tris-HEPES, pH 8.06).

Электрофорез проводили при постоянном напряжении 90 В в течение 60 минут. Размеры молекул, анализируемых образцов ДНК, определяли путем сопоставления их электрофоретической подвижности в геле с подвижно-

стью маркеров – фрагмент ДНК известной молекулярной массы. В качестве маркера молекулярных масс (М) использовали GeneRuler DNA Ladder Mix (100–10,000 bp).

Подбор праймеров для ПЦР амплификации *in silico* ПЦР, анализ олигонуклеотидов и множественное выравнивание ДНК последовательностей производили с помощью программы FastPCR (<http://primerdigital.com/fastpcr.html>) [9, с. 271].

Биоинформатический анализ генов кандидатов, наиболее важных для злаков (пшеницы, ячменя и овса), проведен по базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>), Ensembl Plants (<http://plants.ensembl.org/>).

Систематику и классификацию генов проводили по базе данных Enzyme Nomenclature (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>). Были отобраны основные классы изоферментов, генное семейство амилаз (AADH, EC 1.1.1.90), супероксиддисмутаза (SOD, EC 1.15.1.1).

Для проведения ПЦР амплификации использовали реакционную смесь (на один образец в объеме 25 мкл) следующего состава: 25 нг ДНК, 1 × Phire® буфер с MgCl₂, 0,2 мМ dNTP, 0,3 мМ каждого праймера и 0,2 μl Phire® Hot Start II DNA Polymerase.

Результаты оценивали в 1,2-процентном агарозном геле в 1 × TBE (20 мМ Tris-HEPES, pH 8.06), в присутствии бромистого этидия, с использованием системы гель-документации ChemiDoc-It@TS2 Imager (UVP), помещенном в камеру с 1 × TBE электрофорезом буфером. Электрофорез проводили при постоянном напряжении 90 В в течение 5 часов.

Результаты (Results)

Одним из подходов к изучению генетического разнообразия сельскохозяйственных культур является использование молекулярных маркеров, представляющих собой полиморфные последовательности ДНК. Использование ДНК-маркеров открыло большие перспективы для детального картирования хромосом растений, идентификации генов и их клонирования. В связи с этим возникла необходимость разработки эффективных методов анализа генетического полиморфизма. Широкое применение нашли варианты амплификации ДНК со специфическими и произвольными праймерами, с помощью которых можно быстро обнаружить варибельность большого числа локусов по всему геному растений. Для анализа генетического разнообразия сельскохозяйственных культур наряду с анализом ДНК важным методом получения информации о генотипе является исследование полиморфизма белков и ферментов. Супероксиддисмутаза (SOD, СОД, КФ 1.15.1.1) является специфическим ферментом, препятствующим повреждающему влиянию супероксиданион-радикала кислорода на биологические структуры, превращающая этот радикал в пероксид водорода [10, с. 557]. Гены, кодирующие супероксиддисмутазу, сложно организованы, они различаются по происхождению и внутриклеточной локализации. Аллельные вариации фермента определяют устойчивость растений к биотическим и абиотическим факторам окружающей среды [11, с. 153].

Последовательность ПЦР праймеров для детекции полиморфизма генов семейств супероксиддисмутазы (SOD)

ID	Последовательность (5'-3')	T_m , °C	GC-состав, %	LC, %	Координаты праймеров JX398977
5069	CGGAGGCTCTCCAAGGTCGTSTCC	65,6	66,7	81	113 ≥ 136
5070	CCAAGGTCGTSTCCTACTACGGCCT	65,6	60,7	85	123 ≥ 150
5071	CCTCACCCTCCGCCGTACAAA	61,6	59,1	78	145 ≥ 166
5072	ACTGGGATATTTGGTTCACCAAGGT	58,1	42,3	89	749 ≤ 774
5073	AAGCCTCSGCGCGCATCATGCGTA	66,5	62,5	83	720 ≤ 743
5074	CCTTGTAATCTAAGTAGTAAGCATG	51,6	36,0	77	632 ≤ 656
5075	CTCCCACAAGTCTAGGCTGATGATT	61,3	51,9	93	605 ≤ 631

Примечания:

T_m – температура отжига праймера.

GC-состав – гуанин-цитозиновый состав.

LC – лингвистическая сложность.

Table 1

Sequence of PCR primers for detecting polymorphism of genes of superoxide dismutase (SOD) families

ID	Sequence (5'-3')	T_m , °C	GC-composition, %	LC, %	Primer coordinates JX398977
5069	CGGAGGCTCTCCAAGGTCGTSTCC	65.6	66.7	81	113 ≥ 136
5070	CCAAGGTCGTSTCCTACTACGGCCT	65.6	60.7	85	123 ≥ 150
5071	CCTCACCCTCCGCCGTACAAA	61.6	59.1	78	145 ≥ 166
5072	ACTGGGATATTTGGTTCACCAAGGT	58.1	42.3	89	749 ≤ 774
5073	AAGCCTCSGCGCGCATCATGCGTA	66.5	62.5	83	720 ≤ 743
5074	CCTTGTAATCTAAGTAGTAAGCATG	51.6	36.0	77	632 ≤ 656
5075	CTCCCACAAGTCTAGGCTGATGATT	61.3	51.9	93	605 ≤ 631

Notes:

T_m – primer annealing temperature.

GC-composition – guanine-cytosine composition.

LC – linguistic complexity.

В результате исследований проведен биоинформационный анализ нескольких генов пшеницы (JX398977, Traes_4AL_433F090E0, Traes_2AL_D0D84176E и Traes_4AL_7742FFD9E), который позволил выявить в последовательностях интронов потенциальные участки полиморфизма, проявляющиеся в виде протяженных вставок и делеций. Их можно детектировать с помощью ПЦР. Были разработаны универсальные праймеры к консервативным участкам концевых экзонов (таблица 1) [12, с. 43].

Для праймеров с наибольшим удалением друг от друга продукты амплификации располагались в диапазоне 1000–1200 п. н., для праймеров с самым коротким расстоянием наблюдали продукты амплификации размером 300–600 п. н.

При использовании пары праймеров 5071 + 5073 продукты амплификации отличались низким уровнем полиморфизма. У большинства сортообразцов казахстанской современной селекции полиморфизм был выявлен только у нескольких генотипов, в числе которых Асыл Сапа, Ертiс 97, Казахстанская 15, сорт-дигаллоид Байтерек, и пшеницы *T. spelta*, *T. timofeevii*, *T. diccicum*, var. *T. persicum*, которые по биологическому состоянию относятся к ландрасам или местным экотипам.

По результатам амплификации с праймерами к генам семейства СОД была построена бинарная матрица, которая была использована для статистического анализа GeneAlex 6.5. Было установлено, что наибольшая варибельность генов СОД была выявлена у стародавних сортов мировой и современной казахстанской селекции (рис. 1).

Современные сорта имеют более разнообразные спектры этих изоферментов, что обусловлено направлением селекции пшеницы на устойчивость к стрессовым факторам.

С целью оценки изменчивости проводили анализ молекулярной дисперсии AMOVA (таблица 2). Преимуществами и отличиями AMOVA для анализа генетических данных от классического дисперсионного анализа (ANOVA) является то, что при анализе молекулярной дисперсии могут использоваться различные эволюционные модели без видоизменения базовой структуры анализа.

Анализ молекулярной изменчивости AMOVA продемонстрировал, что различия внутри групп сортов (60 %) существенно выше различий между группами (28 %).

Анализ генетического разнообразия исследуемых групп сортов пшеницы показал, что уровень дифференциации между исследуемыми группами оказался довольно

Анализ молекулярной изменчивости (АМОВА) различных групп пшеницы

Таблица 2

Source	Df	SS	MS	Est. Var.	%
Among Pops	5	128,693	25,739	1,466	40
Within Pops	100	222,430	2,224	2,224	60
Total	105	351,123		3,690	100

Примечания:

Df – число степеней свободы.

SS – модель случайных эффектов Est.

MS – метод моментов.

Est. Var. – оценка компонентов дисперсии.

Molecular variation analysis (АМОВА) of different groups of wheat

Table 2

Source	Df	SS	MS	Est. Var.	%
Among Pops	5	128.693	25.739	1.466	40
Within Pops	100	222.430	2.224	2.224	60
Total	105	351.123		3.690	100

Note:

Df – number of degrees of freedom.

SS – random effects model Est.

MS – method of moments.

Est. Var. – variance component estimation.

Последовательность ПЦР праймеров для детекции полиморфизма генов ВАМУ и у видов семейства Poaceae

Таблица 3

ID	Последовательность (5'-3')	T _m , °C	Координаты праймеров	
			ВМУ1 (FJ161080)1	ВМУ2 (DQ889983)2
3162	TCCAAGTCTACGTCATGCTCC	56,4	1389 ≥ 1409	54 ≥ 74
3816	GCTGCTGCTGCTTTGAAGTCTGCT	62,3	3660 ≤ 3683	1386 ≤ 1409

Примечание:

T_m – температура отжига праймера.

Sequence of PCR primers for detecting polymorphism in ВАМУ genes in species of the Poaceae family

Table 3

ID	Sequence (5'-3')	T _m , °C	Primer coordinates	
			ВМУ1 (FJ161080)1	ВМУ2 (DQ889983)2
3162	TCCAAGTCTACGTCATGCTCC	56.4	1389 ≥ 1409	54 ≥ 74
3816	GCTGCTGCTGCTTTGAAGTCTGCT	62.3	3660 ≤ 3683	1386 ≤ 1409

Note:

T_m – primer annealing temperature.

высоким, большая часть выявленного генетического разнообразия выявлена внутри групп (60 %), это может быть связано с географической и генетической изоляцией сортов различиями экологических условий существования. В целом наибольшее количество переменных локусов генов СОД было идентифицировано у следующих образцов: 2014179 и 2014205 (*A. tauschii*), 2014185 (*A. biuncialis*), 2014192 (*A. triuncialis*), а также образцы пшеницы 201998 (*T. persicum*), 2019101 (*T. timofeevii*), 2014055 (*T. monocoocum*), 2014076 (*T. dicocum*) а также сорта Байтерек, Тәуелсіздік 20, Новосибирская 145 и стародавний сорт Зерноградка. Эти сортообразцы имеют наиболее насыщенный спектр амплификации с ген-специфичными праймерами, что указывает на наличие разнообразных аллельных форм генов. Дальнейшая оценка образцов в лабораторных условиях к воздействию абиотических стрессов позволит выявить корреляцию признака с наличием полиморфных аллелей этого гена, чтобы в дальнейшем целенаправленно использовать эти образцы в селекционных программах.

Также был проведен генетический анализ генных семейств спектров амилазы у культурных видов пшеницы и дикорастущих сородичей. Фермент β-амилаза достаточно хорошо изучен и используется для идентификации генотипов, маркирования хромосом, а также для поиска корреляций между кодирующими амилазу аллелями и хозяйственно ценными признаками, и свойствами пшеницы. Полиморфизм локусов β-амилазы определяет устойчивость пшеницы к прорастанию на корню, тип развития (яровость или озимость), а также находятся в одной группе сцепления с селекционно значимыми генами, такими как карликовость (Rht), остистость. Для анализа были использованы «универсальные» праймеры, ориентированные на наиболее консервативные белок-кодирующие регионы генов семейства β-амилаз (bamy1 и bamy2) (таблица 3). Праймеры разработаны в результате множественного выравнивания генов β-амилаз с использованием программы Multain [13, с. 10].

Таблица 3

Последовательность ПЦР праймеров для детекции полиморфизма генов *BAMY* и у видов семейства *Poaceae*

ID	Последовательность (5'-3')	T_m , °C	Координаты праймеров	
			ВМУ1 (FJ161080)1	ВМУ2 (DQ889983)2
3162	TCCAAGTCTACGTCATGCTCC	56,4	1389 ≥ 1409	54 ≥ 74
3816	GCTGCTGCTGCTTTGAAGTCTGCT	62,3	3660 ≤ 3683	1386 ≤ 1409

Примечание:

 T_m – температура отжига праймера.

Table 3

Sequence of PCR primers for detecting polymorphism in *BAMY* genes in species of the *Poaceae* family

ID	Sequence (5'-3')	T_m , °C	Primer coordinates	
			ВМУ1 (FJ161080)1	ВМУ2 (DQ889983)2
3162	TCCAAGTCTACGTCATGCTCC	56.4	1389 ≥ 1409	54 ≥ 74
3816	GCTGCTGCTGCTTTGAAGTCTGCT	62.3	3660 ≤ 3683	1386 ≤ 1409

Note:

 T_m – primer annealing temperature.

Таблица 4

Генетическое разнообразие локусов β -амилаз у различных сортов и видов пшеницы

Группа сортов	P (%)	N_a	N_e	I
Стародавние сорта (мир.)	50,9	1,525	1,336	0,161
Стародавние (РК)	47,8	1,485	1,359	0,159
Современные РК	41,5	1,857	1,230	0,136
Синтетическая пшеница	24,0	1,340	1,123	0,119
Отдаленные сородичи	58,5	1,994	1,655	0,231
Среднее	17,833	1,976	1,671	0,389

Примечания:

 P – полиморфизм. N_a – разнообразие аллелей. N_e – эффективное число аллелей. I – информационный индекс Шеннона.

Table 4

Genetic diversity of β -amylase loci in different varieties and species of wheat

Group of varieties	P (%)	N_a	N_e	I
Old varieties (world)	50.9	1.525	1.336	0.161
Ancient (KZ)	47.8	1.485	1.359	0.159
Modern (KZ)	41.5	1.857	1.230	0.136
Synthetic wheat	24.0	1.340	1.123	0.119
Distant relatives	58.5	1.994	1.655	0.231
The average	17.833	1.976	1.671	0.389

Note:

 P – polymorphism. N_a – allele diversity. N_e – effective number of alleles. I – Shannon information index.

Сравнительный анализ спектров амплификации с праймерами к геным семействам амилаз выявил, что культурные сорта пшеницы, целенаправленно подвергшиеся селекции на технологические и мукомольные качества зерна, отличаются меньшим разнообразием аллелей этих генов в сравнении с образцами дикорастущих сородичей. Результаты амплификации показали, что наибольший уровень полиморфизма локусов β -амилазы наблюдали у дикорастущих сородичей пшеницы (*T. dicocum*, *T. compactum*, *T. Monococum*, *Aegilops* spp.).

При этом анализ аллельного разнообразия внутри культурных сортов по группам выявил, что образцы пшеницы стародавних сортов мировой коллекции отличаются наибольшей вариабельностью аллелей в сравнении с казахстанскими образцами (таблица 4).

Проведенный анализ разнообразия показывает, что разработанные праймеры для детекции полиморфизма изоферментных спектров амилаз позволяют получать уникальные, хорошо воспроизводимые спектры продуктов амплификации, удобные для дискриминации генотипов и могут быть использованы в качестве дополнительных молекулярно-генетических маркеров.

Наибольшее значение информационного индекса Шеннона, который является основным показателем, отражающим генетическое разнообразие исследуемых аллелей генов, было отмечено у отдаленных видов пшеницы – 0,231. Высокий уровень генетической изменчивости дикарей может быть связан с сохранением механизмов адаптации к неблагоприятным внешним факторам среды.

Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

Генетическое разнообразие пшеницы, возделываемой в Казахстане, значительно возросло, это связано как с использованием в гибридизации сортов иностранной селекции, а также внедрением современных биотехнологических, генно-инженерных методов. Вопросы экологии и биоразнообразия и сохранение исследуемой культуры определяются возможностью контроля разнообразия генов, и в первую очередь изоферментов и других важных и полиморфных генов, кодирующие белки, определяющие особенность данного вида, его полезных свойств и разнообразие [14, с. 21], [15, с. 476].

Анализ генетического разнообразия по спектрам изоферментов СОД и амилазы сортов пшеницы, возделываемых в различные периоды селекции, показал, что уровень дифференциации между исследуемыми группами

оказался довольно высоким, большая часть выявленного генетического разнообразия выявлена внутри групп. Генетическое разнообразие современных сортов пшеницы имеет более низкое количество полиморфных локусов и эффективных аллелей генов запасных белков, СОД и амилазы в сравнении с отдаленными сороридичами и стародавними сортами из мировой коллекции. Выделенные образцы могут быть использованы в качестве родительских форм как доноры разнообразных аллелей хозяйственно полезных генов, влияющих на устойчивость растений к биотическим и абиотическим факторам окружающей среды. Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что изоферменты СОД и амилазы могут быть использованы как эффективные инструменты для выявления генетического полиморфизма пшеницы.

Библиографический список

1. Шаманин В. П., Потоцкая И. В., Трущенко А. Ю., Чурсин А. С., Кузьмина С. П., Кротова Л. А. Расширение генетического разнообразия генофонда пшеницы // Известия Алтайского государственного университета. 2012. № 5. С. 13.
2. Гончаров П. Л. Методические основы селекции растений // Генофонд сельскохозяйственных культур для селекции устойчивых сортов: сборник научных трудов. Новосибирск, 1993. С. 12.
3. Иваченко Л. Е. Использование электрофоретических спектров ферментов дикорастущей сои как маркеров процесса биохимической адаптации к условиям выращивания // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. 2012. № 1 (150). С. 56–61.
4. Phillips R. L., Vasil I. K. DNA-based markers in plants // In: DNA-based markers in plants. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2001. 497 p.
5. Khlestkina E. K., Roder M. S., Efremova T. T., Borner A., Shumny V. K. The genetic diversity of old and modern Siberian varieties of common spring wheat as determined by microsatellite markers // Plant Breeding. 2004. Vol. 123. Pp. 122–127.
6. Юдина Р. С. Генетика и фенотипика малатдегидрогеназы растений // Информационный вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 2. С. 243–254.
7. Reif J. C., Gowda M., Maurer H. P., Longin C. F., Korzun V., Ebmeyer E., Bothe R., Pietsch C., Würschum T. Association mapping for quality traits in soft winter wheat // Theoretical and Applied Genetics. 2011. Vol. 122. Pp. 961–970.
8. Kalendar R., Antonius K., Smýkal P., Schulman, A. H. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation // Theoretical and Applied Genetics. 2010. Vol. 121. No. 8. DOI: 10.1007/s00122-010-1398-2.
9. Kalendar R., Lee D., Schulman A. H. FastPCR software for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis // DNA Cloning and Assembly Methods. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 1116. Humana Press, Totowa, NJ. DOI: 10.1007/978-1-62703-764-8_18.
10. Fried R. Enzymatic and non-enzymatic assay of superoxide dismutase // Biochimie. 1975. Vol. 57. No. 5. Pp. 657–660.
11. Inze D., Montagu M. Oxidative stress in plants // Current Opinion Biotechnology. 1995. Vol. 6. Pp. 153–158.
12. Молекулярно-генетический анализ пшеницы и близкородственных злаков: методические рекомендации / Сост.: Р. Календарь, А. Мутерко, О. Стратула, О. Хапилина, А. Новаковская, Д. Тагиманова, А. Аменов, А. Увашов, А. Туржанова, Е. Раманкулов. Астана, 2016. 43 с.
13. Стратула О. Р., Коцера В. В., Календарь Р. Н. Применение генов β -амилазы в качестве филогенетических маркеров // Биотехнология. Теория и практика. 2014. № 4. С. 10–21. DOI: 10.11134/btp.4.2014.2.
14. Бондаренко Л. С. Изоферменты альфа-амилазы и их генетический контроль у мягкой пшеницы: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.07. Москва, 2017. 21 с.
15. Novoselskaya-Drachovich A. Y. Genetics and genomics of wheat: storage proteins, ecological plasticity, and immunity // Russian Journal Genetics. 2015. Vol. 51. No. 5. Pp. 476–490. DOI: 10.1134/S102279541505004X.

Об авторах:

Олеся Борисовна Райзер¹, магистр сельскохозяйственных наук, научный сотрудник лаборатории геномики и биоинформатики растений, ORCID 0000-0003-0754-3342, AuthorID 57216895212, +7 777 880-12-02, 2008olesya@mail.ru
 Оксана Николаевна Хапилина¹, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории геномики и биоинформатики растений, ORCID 0000-0002-7256-568, AuthorID 57194829297, +7 705 749-14-75, oksfur@mail.ru
 Айнура Сериковна Туржанова¹, магистр биологических наук, научный сотрудник лаборатории геномики и биоинформатики растений, ORCID 0000-0001-6205-9292, AuthorID 57216895766; +7 775 536-95-42, turzhanova-ainur@mail.ru
 Дамеля Сеитовна Тагиманова¹, магистр биологических наук, научный сотрудник лаборатории геномики и биоинформатики растений, ORCID 0000-0002-9020-4247, AuthorID 57194835810, +7 701 429-01-84, tagds@mail.ru

Руслан Николаевич Календарь¹, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией геномики и биоинформатики растений, ORCID 0000-0003-3986-2460, AuthorID 6602789279, +7 705 144-88-85, ruslan.kalendar@mail.ru

¹ Национальный центр биотехнологии, Нур-Султан, Республика Казахстан

Polymorphism of genes of antioxidant system enzymes in cultivated wheat species and wild-growing relatives

O. B. Raizer¹, O. N. Khapilina¹, A. S. Turzhanova¹, D. S. Tagimanova¹✉, R. N. Kalendar¹

¹ National Center for Biotechnology, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan

✉ E-mail: tagds@mail.ru

Abstract. The purpose of the study. Investigation of the polymorphism of genes of superoxide dismutase (SOD) and amylase in cultivated wheat species and wild relatives, the possibility of using them as molecular genetic markers to assess the genetic diversity of wheat varieties. **Methods.** The objects of research were wheat varieties cultivated in different periods in Kazakhstan, distant relatives and wild wheat species. The material was kindly provided by the staff of the laboratory of the gene pool of the SPC ZH im. A.I. Baraev, and also obtained from the USDA genetic resource collections (<http://wheat.pw.usda.gov/GG3>), John Innes Center (Germplasm Resources Unit, BBSRC) (<http://data.jic.bbsrc.ac.uk/cgi-bin/germplasm/cereals.asp>), All-Russian Institute of Plant Industry named after N.I. Vavilov (VIR) (<http://91.151.189.38/virdb>). Isolation of total DNA from etiolated seedlings was performed using the CTAB method. Selection of primers for PCR amplification, in silico PCR, analysis of oligonucleotides, and multiple alignment of DNA sequences were performed using the FastPCR program (<http://primerdigital.com/fastpcr.html>). Bioinformatic analysis of candidate genes was carried out using the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), UniProt <http://www.uniprot.org/uniprot>), Ensembl Plants (<http://plants.ensembl.org>). **Results.** Analysis of genetic diversity based on the spectra of superoxide dismutase and amylase isoenzymes in cultivated wheat species and wild relatives cultivated in different breeding periods showed that the level of differentiation between the studied groups was quite high, most of the genetic diversity was revealed within the groups. The genetic diversity of modern wheat varieties has a lower number of polymorphic loci and effective alleles of storage proteins, SOD, and amylases genes in comparison with distant relatives and ancient varieties from the world collection. **Practical significance.** The study of the polymorphism of the gene families of superoxide dismutase and amylase will increase the efficiency of identification of varieties and hybrids, study of their heterogeneity and targeted selection of parental pairs for crosses.

Keywords: wheat, genetic diversity, polymorphism, isozymes, superoxide dismutase, amylase, molecular genetic markers.

For citation: Raizer O. B., Khapilina O. N., Turzhanova A. S., Tagimanova D. E., Kalendar R. N. Polimorfizm genov fermentov antioksidantnoy sistemy u kul'turnykh vidov pshenitsy i dikorastushchikh sorodichey [Polymorphism of genes of antioxidant system enzymes in cultivated wheat species and wild-growing relatives] // Agrarian Bulletin of the Urals. 2020. No. 11 (202). Pp. 85–92. DOI: 10.32417/1997-4868-2020-202-11-85-92. (In Russian.)

Paper submitted: 16.09.2020.

References

1. Shamanin V. P., Pototskaya I. V., Trushchenko A. Yu., Chursin A. S., Kuz'mina S. P., Krotova L. A. Rasshirenje geneticheskogo raznoobraziya genofonda pshenitsy [Expansion of the genetic diversity of the wheat gene pool] // Izvestiya of Altai State University. 2012. No. 5. P. 13. (In Russian.)
2. Goncharov P. L. Metodicheskie osnovy selektsii rasteniy [Gene pool of agricultural crops for breeding resistant varieties] // Genofond sel'skokhozyaystvennykh kul'tur dlya selektsii ustoychivyykh sortov: sbornik nauchnykh trudov. Novosibirsk. 1993. P. 12. (In Russian.)
3. Ivachenko L. E. Ispol'zovanie elektroforeticheskikh spektrov fermentov dikorastushchey soi kak markerov protessa biokhimicheskoy adaptatsii k usloviyam vyrashchivaniya [The use of electrophoretic spectra of wild-growing soybean enzymes as markers of the process of biochemical adaptation to growing conditions] // Maslichnye kul'tury. Nauchno-tekhnicheskii byulleten' Vserossiyskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta maslichnykh kul'ur. 2012. No. 1. Pp. 56–61. (In Russian.)
4. Phillips R. L., Vasil I. K. DNA-based markers in plants // In: DNA-based markers in plants. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2001. 497 p.
5. Khlestkina E. K., Roder M. S., Efremova T. T., Borner A., Shumny V. K. The genetic diversity of old and modern Siberian varieties of common spring wheat as determined by microsatellite markers // Plant Breeding. 2004. Vol. 123. Pp. 122–127.
6. Yudina R. S. Genetika i fenogenetika malatdegidrogenazy rasteniy [Genetics and phenogenetics of plant malate dehydrogenase] // The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists. 2010. T. 14. No. 2. Pp. 243–254. (In Russian.)
7. Reif J. C., Gowda M., Maurer H. P., Longin C. F., Korzun V., Ebmeyer E., Bothe R., Pietsch C., Würschum T. Association mapping for quality traits in soft winter wheat // Theoretical and Applied Genetics. 2011. Vol. 122. Pp. 961–970.

8. Kalendar R., Antonius K., Smýkal P., Schulman, A. H. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation // *Theoretical and Applied Genetics*. 2010. Vol. 121. No. 8. DOI: 10.1007/s00122-010-1398-2.
9. Kalendar R., Lee D., Schulman A. H. FastPCR software for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis // *DNA Cloning and Assembly Methods. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 1116. Humana Press, Totowa, NJ. DOI: 10.1007/978-1-62703-764-8_18.
10. Fried R. Enzymatic and non-enzymatic assay of superoxide dismutase // *Biochimie*. 1975. Vol. 57. No. 5. Pp. 657–660.
11. Inze D., Montagu M. Oxidative stress in plants // *Current Opinion Biotechnology*. 1995. Vol. 6. Pp. 153–158.
12. Molekulyarno-geneticheskiy analiz pshenitsy i blizkorodstvennykh zlakov: metodicheskie rekomendatsii [Molecular genetic analysis of wheat and closely related cereals: Method. recommend] / Compilers: R. Kalendar', A. Muterko, O. Stratula, O. Khapilina, A. Novakovskaya, D. Tagimanova, A. Amenov, A. Uvashov, A. Turzhanova, E. Ramankulov. Astana, 2016. 43 p. (In Russian.)
13. Stratula O. R., Kotseruba V. V., Kalendar' R. N. Primenenie genov β -amilazy v kachestve filogeneticheskikh markerov [Application of β -amylase genes as phylogenetic markers] // *Biotechnology. Theory and practice*. 2014. No. 4. Pp. 10–21. DOI: 10.11134/btp.4.2014.2. (In Russian.)
14. Bondarenko L. S. Izofermenty al'fa-amilazy i ikh geneticheskiy kontrol' u myagkoy pshenitsy: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk: 03.02.07 [Alpha-amylase isozymes and their genetic control in common wheat: abstract of dis. ... candidate of biological sciences: 03.02.07]. Moscow, 2017. 21 p. (In Russian.)
15. Novoselskaya-Dragovich A. Y. Genetics and genomics of wheat: storage proteins, ecological plasticity, and immunity // *Russian Journal Genetics*. 2015. Vol. 51. No. 5. Pp. 476–490. DOI: 10.1134/S102279541505004X.

Authors' information:

Olesya B. Raizer¹, master of agricultural sciences, researcher of laboratory of plant genomics and bioinformatics, ORCID 0000-0003-0754-3342, Author ID 57216895212, +7 777 880-12-02, 2008olesya@mail.ru

Oksana N. Khapilina¹, candidate of biological sciences, leading researcher of laboratory of plant genomics and bioinformatics, ORCID 0000-0002-7256-568, Author ID 57194829297, +7 705 749-14-75, oksfur@mail.ru

Ainura S. Turzhanova¹, master of biological sciences, researcher of laboratory of plant genomics and bioinformatics, ORCID 0000-0001-6205-9292, AuthorID 57216895766, +7 775 536-95-42, turzhanova-ainur@mail.ru

Damelya S. Tagimanova¹, master of biological sciences, researcher of laboratory of plant genomics and bioinformatics, ORCID 0000-0002-9020-4247, Author ID 57194835810, +7 701 429-01-84, tagds@mail.ru

Ruslan N. Kalendar¹, candidate of biological sciences, Head of the Laboratory of Plant Genomics and Bioinformatics, ORCID 0000-0003-3986-2460, Author ID 6602789279, +7 705 144-88-85, ruslan.kalendar@mail.ru

¹ National Center for Biotechnology, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan