

ГЕНЕТИКА, СЕЛЕКЦИЯ И СЕМЕНОВОДСТВО, БИОТЕХНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Известия ТСХА, выпуск 3, 2014 год

УДК 577.21:633.111:633.14

ВАЛИДАЦИЯ ДНК-МАРКЕРОВ ГЕНОВ КОРОТКОСТЕБЕЛЬНОСТИ У ТРИТИКАЛЕ (*TRITICOSECALE WITTM.*)

АД. КОРШУНОВА, М.Г. ДИВАШУК, И.А. ДАЕБЛЬ, Г.И. КАРЛОВ, А.А. СОЛОВЬЕВ

(РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

У пшеницы и ржи гены, регулирующие высоту растения, хорошо изучены и для их идентификации разработаны молекулярные маркеры. Однако исследований по применению этих маркеров на тритикале не проводилось. Присутствие субгеномов пшеницы и ржи в геноме тритикале может существенно влиять на эффективность использования ДНК-маркеров, а также затруднять интерпретацию получаемых результатов. В нашем исследовании показаны возможности и эффективность применения на тритикале ранее разработанных ДНК-маркеров генов короткостебельности пшеницы и ржи.

Ключевые слова: тритикале, гены короткостебельности, Rht-B1b, Rht-B1e, H1, ДНК-маркеры.

Тритикале — зерновая культура, искусственно созданная человеком в результате межвидовой гибридизации пшеницы и ржи. Она занимает все больше посевных площадей благодаря таким качествам, как высокая устойчивость к заболеваниям, неприхотливость к условиям выращивания, высокая урожайность [4, 5, 8]. При неоспоримых достоинствах у тритикале есть и ряд неблагоприятных качеств, ограничивающих ее широкое использование в производстве, одно из них — высокорослость [7, 9, 10].

У пшеницы и ржи — родительских видов тритикале — проблему высокорослости решили путем введения генов короткостебельности. Введение генов *Rht-B1b* и *Rht-D1b* в сорта пшеницы стало основой «зеленой революции» в 1960-е гг., так как вместе со снижением высоты повышалась технологичность и увеличивалась урожайность сортов. Это объяснялось повышением устойчивости к полеганию, а также улучшением притока питательных веществ к формирующемуся колосу, в результате чего развивалось большее количество цветков, повышалась фертильность пыльцы и увеличивалось количество зерен в колосе [33]. Благодаря способности снижать высоту растений и плейотропному влиянию на множество хозяйственно-ценных признаков гены короткостебельности стали быстро распространяться и присутствуют в сортах по всему миру [17, 31].

На данный момент у пшеницы обнаружено 22 гена короткостебельности [25]. Методами молекулярной генетики эти гены начали изучать с конца 1990-х гг., когда Peng с соавторами (1999) изолировали гены *Rht-B1b* и *Rht-D1b* и разработали на них ДНК-маркеры [27]. Наиболее распространенными среди современных сортов мягкой пшеницы являются гены *Rht-B1b* (*Rht1*), *Rht-D1b* (*Rht2*), *Rht8*, *Rht-B1e* (*Rht11*) (таблица). Данные гены получили широкое распространение среди сортов мягкой пшеницы благодаря своему наиболее существенному благоприятному эффекту на хозяйственно-ценные признаки.

**Гены короткостебельности пшеницы,
наиболее распространенные среди современных сортов**

Название гена (новая номенклатура)	Название гена (старая номенклатура)	Локализация
<i>Rht-B1b</i>	<i>Rht1</i>	4B
<i>Rht-D1b</i>	<i>Rht2</i>	4D
<i>Rht8c</i>		2D
<i>Rht-B1e</i>	<i>RhtKrasznodari 1</i> или <i>Rht11(BW)</i>	4B

Яровая гексаплоидная тритикале объединяет в своем геноме три субгенома: А и В пшеницы и R геном ржи. Поэтому из вышеперечисленных генов короткостебельности, при нормальной геномной конституции, гексаплоидная тритикале может нести гены *Rht-B1b* и *Rht-B1e*. Гены, расположенные на хромосомах генома D, также могут присутствовать в геноме гексаплоидной тритикале, но только в случае наличия замещений или транслокаций.

При наличии гена *Rht-B1b* снижение высоты растений может достигать 17%, а увеличение урожайности — 20% [17, 19]. Соответствующий аллель дикого типа, *Rht-B1a*, секвенирован, и показано, что он является ортологом гена *GAI* арабидопсиса, который кодирует белок DELLA, служащий, в свою очередь, репрессором сигнала гибберелловой кислоты (ГК) [20]. Белок DELLA у пшеницы и других видов состоит из N-терминального домена, чувствительного к ГК, и C-терминального региона, который обладает функцией репрессора [27]. Исследования на арабидопсисе и рисе показали, что белок DELLA дикого типа взаимодействует с рецептором ГК GID1 в присутствии ГК и образует комплекс ГК-GID1-DELLA, который способствует последующей деградации белка DELLA [20]. Аллель *Rht-B1b* образовался в результате мутации аллеля дикого типа *Rht-B1a*, заключающейся в замене одной пары нуклеотидов и приводящей к образованию стоп-кодона TAG вскоре после начала трансляции [27]. Эта мутация приводит к образованию белка DELLA, усеченного с N-конца, что нарушает взаимодействие ГК-GID1-DELLA и последующую деградацию белка DELLA [29].

Помимо аллеля «зеленой революции» *Rht-B1b* было обнаружено еще семь аллелей гена *Rht-B1*: *a*, *c*, *d*, *e*, *f g*, *Rht-B1^{IC2196}* [13, 25, 27]. Аллель *a* является диким аллелем и не снижает высоту растения. Остальные аллели образовались в результате различных мутаций. Среди них наиболее перспективным для практического применения является аллель *Rht-B1e* [14]. Он был обнаружен сравнительно недавно у российского мутанта *Krasznodari1* [30]. До недавнего времени считалось, что

существует два различных гена короткостебельности: *Rht-11* и *Rht-B1e*. Divashuk с соавторами (2012) доказали, что аллель *Rht-B1e* и ген *Rht-11* идентичны [15]. Этот аллель стимулирует существенно большее снижение высоты растений и большее увеличение урожайности по сравнению с аллелем зеленой революции *Rht-B1b* [2, 14, 26, 32]. Недавно аллель *Rht-B1e* был включен в европейские селекционные программы [9]. Pearce с соавторами (2011) сообщают, что мутация *Rht-B1e*, как и мутация *Rht-B1b*, состоит в замене одного нуклеотида [26], а Li и др. установили, что замена одного нуклеотида в *Rht-B1e* изменяет кодон K61 (AAG) на стоп-кодон (TAG) вскоре после начала трансляции и его позиция в *Rht-B1e* на три аминокислоты раньше, чем у *Rht-B1b* [24]. Они предполагают, что эта мутация, аналогично мутации *Rht-B1b*, приводит к образованию белка, усеченного с N-конца, что снижает чувствительность к ГК.

Помимо генов пшеницы, генотипы тритикале могут нести и гены короткостебельности ржи. Выделяют пять типов короткостебельности ржи, и наиболее удобным и значимым для селекции является тип короткостебельности, обеспечивающийся одним доминантным геном — *H1 (Ddw1)* [3]. Этот ген был обнаружен Кобылянским (1972) у естественного мутанта ржи EM-1. Наличие гена *H1* укорачивает высоту растений до 40% у диплоидной и до 55% — у тетраплоидной ржи. Этот ген, как и гены короткостебельности пшеницы, обладает широким плейотропным эффектом: увеличивает размер колоса, число цветков и зерен в колосе, мощность корневой системы, кустиность растений, площадь листовой поверхности [3].

Ген *H1* был включен во многие селекционные программы для предотвращения полегания ржи. С использованием источников и доноров гена доминантной короткостебельности создано около 80% сортов ржи в России и около 90% — в странах СНГ [3]. Установлено, что *H1* является гомеологом гена карликовости пшеницы *Rht12* [12, 31]. Он расположен на длинном плече хромосомы 5R [22] и тесно сцеплен с микросателлитным локусом *REMS1218*.

У пшеницы и ржи гены, регулирующие высоту растения, хорошо изучены и для их идентификации разработаны молекулярные маркеры. Однако исследование по применению и валидации этих маркеров на тритикале в полном объеме проведено не было [5]. Присутствие субгеномов пшеницы и ржи в геноме тритикале может существенно влиять на эффективность использования ДНК-маркеров, а также затруднять интерпретацию получаемых результатов. В нашем исследовании показаны возможности и эффективность применения на тритикале ранее разработанных ДНК-маркеров генов короткостебельности пшеницы и ржи.

Методика исследований

Растительный материал: рожь сорта Пурга (не несет аллелей короткостебельности пшеницы), пшеница линии ANDV 4A (аллель *Rht-B1b*) и ANDV 4D (аллель *Rht-B1e*), озимая тритикале сорта Vibate Носовське (аллель *Rht-B1e*) и Гренадо (ген *H1*), яровая тритикале сорта Dublet (аллель *Rht-B1b*) и линия Inia — Ann "S" (аллель *Rht-B1a*).

Семена проращивали в чашках Петри при температуре 25°C. Геномную ДНК выделяли из 3-дневных проростков по методу Bematzky и Tanksley с некоторыми модификациями [12].

Для определения наличия аллелей *Rht-B1b* и *Rht-B1a* использовали праймеры BF(5'-GGTAGGGAGGCGAGAGGCGAG-3'), MR1(5'-CATCCCCATGGCCAT-CTCGAGCTA-3') и WR1(5'-CATCCCCATGGCCATCTCGAGCTG-3') [16].

Для выявления аллеля *Rht-B1e* использовали праймеры BF(5'-GGTAGGGAGGCGAGAGGGCGAG-3'), WR3, MR3 [26] и праймеры NF.BF.2(5'-TCTCCTCCCTCCCCACCCCAAC-3') [16, 21] и Me.R(5'-ATGGCCATCTCCAGCTGCTCCAAGTA-3') [24].

Продукты ПЦР разделяли в 2% агарозном геле с буфером ТВЕ и окрашивали бромистым этидием.

Наличие гена *H1* определяли с помощью праймеров REMS1218 F (5'-CGCACAAACAAAAACACGAC-3'), R (5'-CAAACAAACCCATTGACACG-3') [28]. Определение наличия гена *H1* проводили с помощью фрагментного анализа.

Результаты и их обсуждение

Праймеры для определения наличия гена *Rht-B1b* разработаны Ellis с соавторами [16]. Они установили, что мутантный аллель *Rht-B1b* отличается от аллеля дикого типа одной парой нуклеотидов. Основываясь на этом различии, авторы разработали две пары праймеров: одна пара праймеров показывает присутствие аллеля дикого типа (*Rht-B1a*), вторая — мутантного (*Rht-B1b*). Определить наличие того или иного аллеля можно только при сопоставлении результатов двух реакций.

При использовании первой или второй пары праймеров амплифицируемый фрагмент имеет размер 237 п.н. На рисунке 1 представлены результаты гелеэлектрофорезов по определению наличия дикого и мутантного аллелей. В качестве контрольных образцов были выбраны сортообразцы ANDV 4A и ANDV 4D с известными аллелями гена *Rht-B1*. У сортов яровой тритикале амплификация фрагментов дикого и мутантного аллелей была такой же, как у сортов пшеницы. У ржи амплификации не наблюдалось. Никакой неспецифичной амплификации на геномах яровой и озимой тритикале, которая оказывала бы влияние на возможность интерпретации полученных данных, обусловленной наличием генома ржи, выявлено не было.

На сегодняшний день существуют два маркера для определения наличия аллеля *Rht-B1e*. Работа с первым маркером [26] аналогична работе с праймерами на аллель *Rht-B1b*, т.е. необходима постановка двух реакций ПЦР. Амплифицируемый

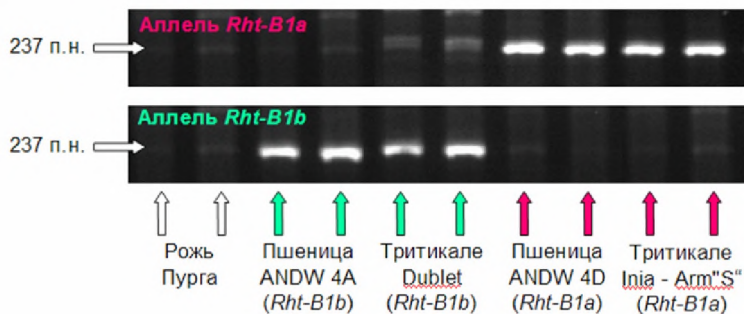


Рис. 1. Определение наличия аллелей гена короткостебельности пшеницы (*Rht-B1a* и *Rht-B1b*) у образцов ржи, тритикале и пшеницы. Зелеными стрелками обозначено наличие аллеля *Rht-B1b*, розовыми — наличие аллеля *Rht-B1a*, белой — отсутствие амплификации

фрагмент имеет размер 228 и.н. (рис. 2). У образца пшеницы ANDW 4A нет аллеля *Rht-B1e*, амплификация фрагментов соответствовала дикому типу аллеля. А у образца пшеницы ANDV 4D, несущего аллель *Rht-B1e*, амплификация фрагментов соответствовала мутантному типу. У ржи наблюдалась амплификация неспецифичных фрагментов размером около 210 п.н. при постановке ПЦР с праймерами, специфичными для аллеля дикого типа, и около 250 п.н. при постановке ПЦР с праймерами, специфичными для мутантного аллеля.

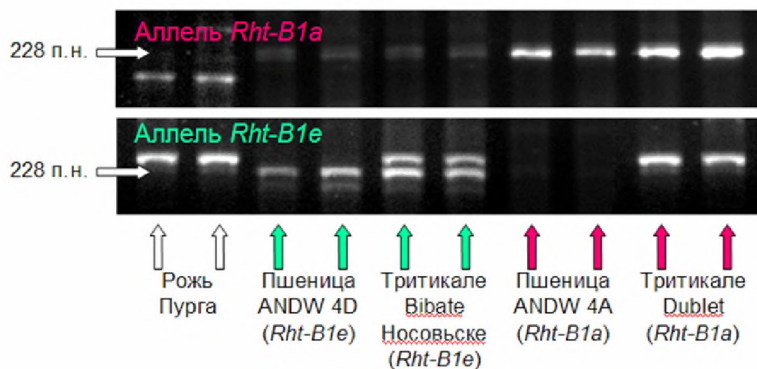


Рис. 2. Определение наличия аллелей гена короткостебельности пшеницы (*Rht-B1a* и *Rht-B1e*) у образцов ржи, пшеницы и тритикале с помощью праймеров BF, WR3 и MR3. Зелеными стрелками обозначено наличие аллеля *Rht-B1e*, розовыми — наличие аллеля *Rht-B1a*, белой — неспецифичная амплификация

Из-за наличия у тритикале генома ржи при постановке ПЦР с праймерами, специфичными для аллеля мутантного типа, у тритикале, так же как у ржи, в реакции на мутантный аллель амплифицировался неспецифичный фрагмент размером около 250 п.н. По размеру искомым и неспецифичный фрагменты различаются незначительно (228 п.н. и 250 п.н.). Это может стать причиной ложноположительных результатов при недостаточной продолжительности электрофореза. Для получения достоверных результатов необходим довольно длительный по времени электрофорез. В качестве примера мы приводим фотографии электрофореза разной продолжительности (рис. 3).

Второй тип маркера для определения наличия аллеля *Rht-B1e* разработали Li с соавторами (2012) [24]. В качестве прямого праймера они использовали праймер NF.BF.2, разработанный Ellis и др. [16], с некоторыми модификациями [21], а в качестве обратного — Me.R, который разработали на основе SNP между диким и мутантным аллелями. При использовании этих праймеров, в отличие от предыдущих, ставится всего одна реакция, показывающая наличие или отсутствие аллеля *Rht-B1e*. Но при этом применение данного маркера не позволяет идентифицировать гетерозиготу, так как маркер доминантный.

Результаты по определению наличия аллеля *Rht-B1e* с помощью праймеров BF, WR3, MR3 и NF.BF.2, Me.R полностью совпали (рис. 4).

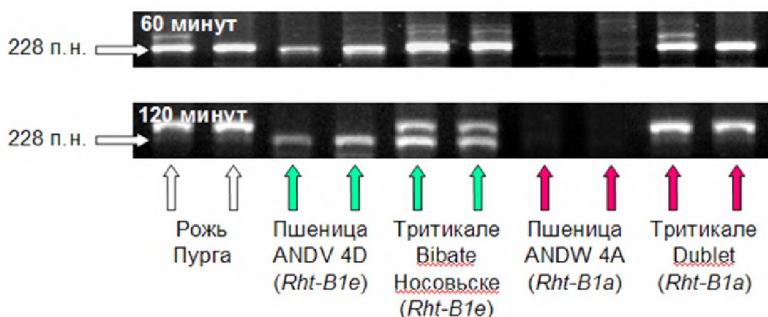


Рис. 3. Различная продолжительность электрофореза при определении наличия мутантного аллеля *Rht-B1e* с помощью праймеров BF и MR3. Зелеными стрелками обозначено наличие аллеля *Rht-B1e*, розовыми — наличие аллеля *Rht-B1a*, белой — неспецифичная амплификация. Напряжение 6 В/см

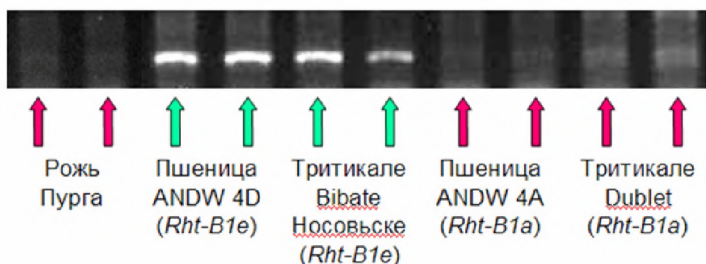


Рис. 4. Определение наличия аллеля гена короткостебельности пшеницы (*Rht-B1e*) у образцов ржи, тритикале и пшеницы с помощью праймеров NF.BF.2 и Me.R. Зелеными стрелками обозначено наличие аллеля *Rht-B1e*, розовыми — его отсутствие

Таким образом, при применении маркера, разработанного Li и др. [24], ложноположительных результатов не возникало, наличие генома ржи никак не сказывалось на его работе. Однако праймеры BF, WR3 и MR3 позволяют обнаруживать гетерозиготные растения, так как показывают наличие или отсутствие сразу двух аллелей — дикого и мутантного. Поэтому их применение будет удобным для оценки расщепляющихся популяций в работе по селекции тритикале. Еще одним достоинством этих праймеров является то, что они всегда показывают наличие одного из аллелей, и исследователь может не сомневаться в том, что не было ингибирования ПЦР. В отличие от них, праймеры NF.BF.2 и Me.R показывают наличие лишь мутантного аллеля, а в случае, если ПЦР не прошла, отсутствие бэнда можно принять за отрицательный результат. В любом случае для определения наличия аллеля *Rht-B1e* у сортов тритикале при скрининге коллекции возможно использование обоих ДНК-маркеров. Кроме того, продолжительность электрофореза и подбор условий амплификации при небольшом объеме оцениваемых образцов и возможности повторного выделения ДНК и постановки ПЦР не является проблемой. Однако при проведении селекционной работы на основе молекулярных маркеров, когда количе-

ство исследуемых растений велико, а временные и материальные ресурсы для проведения анализов ограничены, необходимость длительного электрофореза и трудность интерпретации данных представляют собой существенную проблему как с методической, так и с организационной стороны процесса. В то же время для селекции крайне необходимым является применение кодоминантных маркеров, позволяющих идентифицировать гетерозиготы. Поэтому при работе с тритикале в селекционном процессе мы рекомендуем применять следующую комбинацию маркеров: на аллель *Rht-Bla* использовать праймеры BF/WR3, а на аллель *Rht-Ble* — праймеры NF.BF.2/Me.R. При применении именно такой комбинации мы получим модифицированный кодоминантный маркер, на работу которого не будет оказывать влияние наличие генома ржи, что позволит, с одной стороны, существенно сэкономить как время, так и расходные материалы, а с другой — значительно облегчит интерпретацию полученных результатов.

Наличие гена *Hl* (*Ddw1*) можно определить только с помощью микросателлитного маркера REMS1218, тесно сцепленного с этим геном [28]. Длины амплифицируемых фрагментов у образцов, несущих и не несущих ген *Hl*, различаются всего на четыре нуклеотидных основания. Эти различия можно обнаружить только с помощью фрагментного анализа. По данным Tenhola-Roininen и Tanhuanpaa [28], если микросателлитный анализ показывает наличие одного фрагмента размером 317 п.н. — растение не несет ген *Hl*, если же анализ показывает наличие двух фрагментов размером 317 и 321 п.н., это значит, что у растения есть этот ген (рис. 5). Однако все исследования по этому вопросу ограничивались только двумя селекционными образцами.

У тритикале помимо фрагментов, показывающих наличие или отсутствие гена, были обнаружены еще два типа амплификации: 317 и 323 п.н., 317 и 325 п.н. (рис. 6).

При этом у контрольных образцов пшеницы амплификация с данным маркером полностью отсутствовала. Таким образом, выявленные нами различия связаны с вариативностью микросателлитной последовательности, на которую разработаны праймеры. Теоретически, так как ген *Hl* был изначально выявлен у образца EM-1 и ее тип амплификации соответствует 317 + 321 п.н., остальные типы амплификации можно интерпретировать как отсутствие гена *Hl*. Однако с учетом возможных ре-

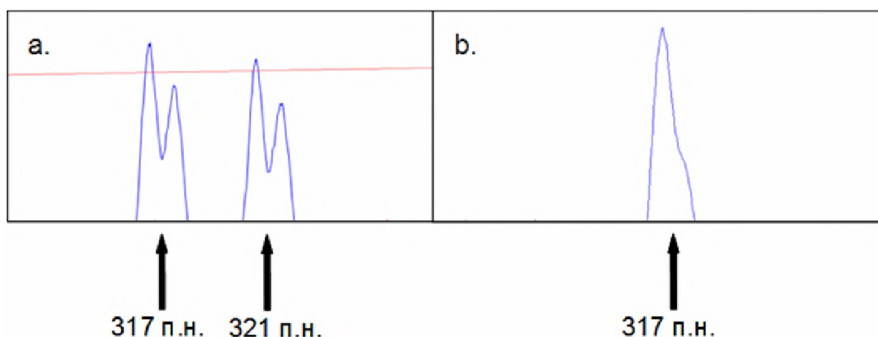


Рис. 5. Наличие гена *Hl*, сорт озимой тритикале Гренадо (а); отсутствие гена *Hl*, сорт яровой тритикале Dublet (б)

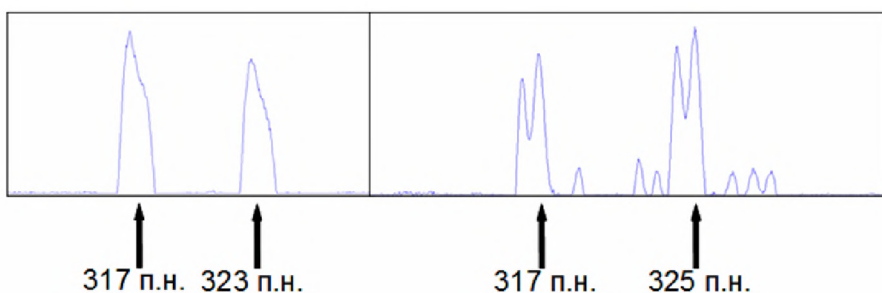


Рис. 6. Типы амплификации с праймеров на микросателлитную последовательность REMS1218

комбинаций в результате скрещиваний между тритикале необходимо проводить дополнительные анализы для выявления гена короткостебельности в том или ином образце. В случае проведения селекции с помощью молекулярных маркеров наиболее удобным представляется подбор пар для скрещивания, в которых у второго родителя (отсутствие гена короткостебельности) будет амплифицироваться фрагмент размером 317. Данная комбинация представляется наиболее удобной для проведения анализов на молекулярные маркеры, так как другие типы амплификации могут «скрывать» наличие гена *H1* в индивидуальных растениях расщепляющейся популяции.

Заключение

Таким образом, маркер, разработанный Ellis с соавторами [16] для определения наличия аллеля *Rht-B1b* у пшеницы, может применяться и на тритикале. Никакой неспецифичной амплификации на геноме гексаплоидной тритикале, которая оказывала бы влияние на возможность интерпретации полученных данных, обусловленной наличием генома ржи, выявлено не было. Для определения наличия аллеля *Rht-B1e* у небольшого количества образцов гексаплоидной тритикале возможно использование как маркера, разработанного Reagse с соавторами [26], так и маркера, разработанного Li с соавторами [24], с единственным уточнением, что при использовании первого маркера необходим более продолжительный по длительности электрофорез. Однако в селекционной работе мы рекомендуем использовать комбинацию этих праймеров: на аллель *Rht-B1a* использовать праймеры BF/WR3, а на аллель *Rht-B1e* — праймеры NF.BF.2/Me.R.

Маркер на микросателлитную последовательность ржи REMS1218, разработанный Tenhola-Roininen и Tanhuanpaa [28], также можно использовать на тритикале. Неспецифичной амплификации, связанной с наличием геномов пшеницы, не выявлено. Но обнаружены типы амплификации, связанные с вариативностью микросателлитной последовательности, не описанные авторами, разработавшими маркер. Для выявления гена *H1* у таких образцов необходимы дополнительные исследования. В случае проведения селекции с помощью молекулярных маркеров в качестве родителя без гена *H1* мы рекомендуем выбирать образцы, в которых будет амплифицироваться фрагмент размером 317.

И.А. Даебль выражает благодарность Министерству высшего образования Ирака за постоянную поддержку.

Библиографический список

1. Беспалова Л.А., Васильев А.В., Аблова П.Б., Филобок В.А., Худокормоев Ж.Н., Даво-ян Р.О., Давоян Э.Р., Карлов Г.П., Соловьев А.А., Дивашук М.Г., Майер Н.К., Дудников М.В., Алироненко Н.В., Баранова О.А. Применение молекулярных маркеров в селекции пшеницы в Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012. Т. 16 (1). С. 37-43.
2. Беспалова Л.А. Inheritance of Plant Height by Hybrids of Winter Bread Wheat: Сборник научных трудов Краснодарского научно-исследовательского института сельского хозяйства. Краснодар, 1982. С. 103-120.
3. Кобылянский В.Д., Солодухина О.В. Развитие идей Н.И. Вавилова в современных исследованиях рода *Secale L.* // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2012. Вып. 169. С. 53-64.
4. Крутин П.Ю., Дивашук М.Г., Хомякова О.В., Дьячук Т.П., Карлов Г.П. Молекулярно-цитогенетическая характеристика первичных тритикале, межамфидиплоидного гибрида и перспективных линий селекции НИИСХ Юго-Востока // Известия ТСХА. 2009. Вып. 3. С. 74-80.
5. Куркиев К.У. Генетические аспекты селекции коротко стебельных гексаплоидных тритикале. Диссертация. 2009.
6. Куркиев К.У., Тырышкин Л.Г., Колесова М.А., Куркиев У.К. Идентификация генов короткостебельности *Rht2* и *Rht8* у образцов гексаплоидного тритикале с помощью ДНК мар-керов // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2008. Т. 12 (3). С. 372-377.
7. Носова А.Ю., Сычева Е.А., Дубовец П.П. Аллельная характеристика генов коротко-стебельности у сортов и рекомбинантных форм гексаплоидных тритикале: Сборник докладов Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Инно-вационное развитие АПК в России». Саратов, 2013. С. 121-125.
8. Рубец В.С., Никитина Е.А., Пыльное В.В. Особенности опыления сортов озимой гек-саплоидной тритикале // Агро XXI. 2011. Вып. 7-9. С. 11-13.
9. Чеботарь С.В. Аллельная характеристика генов короткостебельности в генети-ческом пуле сортов озимой мягкой пшеницы Украины // Генетичш ресурси рослин. 2008. Вып. 6. С. 96-103.
10. Шевченко В.Е., Алещенко А.М., Гончаров С.В., Швырев Ю.В., Григоров П.П. Изуче-ние сортообразцов яровой тритикале в условиях лесостепи ЦЧР: Сборник научных трудов «Биологические основы и методы селекции и семеноводства полевых культур». Воронеж, 2006. С. 93-98.
11. Beales J., Fish L.J., Worland A.J., Pelica F. 'Green Revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators // Nature. 1999. 400. P. 256-261.
12. Bernatzky R., Tanksley S.D. Genetics of actin-related sequences // Theoretical and Ap-plied Genetics. 1986. 72. P. 314-321.
13. Borner A., Plaschke J., Korzun V., Worland A. J. The Relationship between the Dwarfing Genes of Wheat and Rye // Euphytica. 1996. 89. P. 69-75.
14. Divashuk M.G., Беспалова Л.А., Васильев А. В., Фесенко И.А., Пузырнова О.Ю., Кар-лов Г.И. Reduced height genes and their importance in winter wheat cultivars grown in southern Russia // Euphytica. 2013. 190. P. 137-144.
15. Divashuk M.G., Vasilyev A.V., Беспалова Л. А., Karlov G.I. Identity of the *Rht-11* and *Rht-12* Reduced Plant Height Genes // Russian Journal of Genetics. 2012. Vol. 48 (7). P. 761-763.
16. Ellis M.H., Spielmeier W, Gale K.R., Rebetzke G.J., Richards R.A. "Perfect" markers for the *Rht-B1b* and *Rht-D1b* dwarfing genes in wheat // Theoretical and Applied Genetics. 2002. 105. P. 1038-1042.
17. Flinham E., Borner A., Worland A., Gale M. Optimizing wheat grain yield effects of *Rht* (gibberellin-insensitive) dwarfing genes // The Journal of Agricultural Science. 1997. 128. P. 11-25.
18. Gale AID., Law C.N., Worland A.J. The chromosomal location of a major dwarfing gene from Norin 10 in new British semi-dwarf wheats // Heredity. 1975. 35. P. 417-421.

19. Gale M.D., Yousefian S. Dwarfing genes in wheat. Russel GE (ed) Progress in plant breeding. Butterworths and Co., London. 1985. P. 1-35.
20. Griffiths J., Murase K, Rieu I., Zentella R., Zhang Z.L., Powers S.J., Gong F., Phillips A.L., Hedden P., Sun T.P., Thomas S.G. Genetics characterization and functional analysis of the *GID1* gibberellin receptors in Arabidopsis // Plant Cell. 2006. 18. P. 3399-3414.
21. Guedira M., Guedira G.B., Sanford I'D., Sneller C., Souza E., Marshall D. Distribution of *Rht* genes in modern and historic winter wheat cultivars from the eastern and central USA // Crop Science. 2010. 50. P. 1811-1822.
22. Korzun V, Melz G., Borner A. RFLP mapping of the dwarfing (*Ddw1*) and hairy peduncle (*Up*) genes on chromosome 5 of rye (*Secale cereale* L.) // Theoretical and Applied Genetics. 1996. 92. P. 1073-1077.
23. Korzun V, Roder M, Worland A.J., Borner A. Intra-chromosomal mapping of genes for dwarfing (*Rht12*) and vernalization response (*Vrnl*) in wheat by using RFLP and microsatellite markers//Plant Breeding. 1997. 116. P. 227-232.
24. Li A., Yang W, Guo X., Liu D., Sun J., Zhang A. Isolation of a gibberellin-insensitive dwarfing gene, *Rht-Ble*, and development of an allele-specific PCR marker // Molecular Breeding. 2012. 30. P. 1443-1451.
25. McIntosh R.A., Yamazaki Y, Dubcovsky J., Rogers J., Morris C., Somers D.J., Appels R. and Devos K.M. Catalogue of Gene Symbols for Wheat. 2012.
26. Pearce S., Saville R., Vaughan S.P. Molecular Characterization of *Rht 1* Dwarfing Genes in Hexaploid Wheat//Plant Physiology. 2011. 157. P. 1820-1831.
27. Peng JR., Richards D.E., Hartley N.M., Murphy G.P., Devos K.M., Flintham J.E. 'Green Revolution' Genes Encode Mutant Gibberellin Response Modulators // Nature. 1999. 400. P. 256-261.
28. Tenhola-Roininen T., Tanhuanpaa P. Tagging the dwarfing gene *Ddw 1* in a rye population derived from doubled haploid parents // Euphytica. 2010. 172. P. 303-312.
29. Willige B.C., Ghosh S., Nill C., Zourelidou M., Dohmann E.M., Maier A., Schwechheimer C. The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of Arabidopsis // Plant Cell. 2007. 19. P. 1209-1220.
30. Worland A.J. Gibberellic Acid Insensitive Dwarfing Genes in Southern European Wheats //Euphytica. 1986. 35. P. 857-866.
31. Worland A.J., Korzun V, Roder M.S., Ganai M.W., Law C.N. Genetic analysis of the dwarfing gene *Rht8* in wheat. Part II. The distribution and adaptive significance of allelic variants at the *Rht8* locus of wheat as revealed by microsatellite screening // Theoretical and Applied Genetics. 1998. 96. P. 1110-1120.
32. Worland A.J., Sayers E.J. *Rht1* (*B.dw1*), an alternative allelic variant for breeding semi-dwarf wheat varieties//Plant Breed. 1995. 114. P. 397-400.
33. Yousefian S., Kirby E.J.M., Gale M.D. Pleiotropic effects of the GA-insensitive *Rht* dwarfing genes in wheat: effects on leaf, stem, ear and floret growth // Field Crops Research. 1992. 28. P. 191-210.

VALIDATION OF DNA MARKERS FOR SEMI-DWARF GENES IN TRITICALE (*TRITICOSECALE WITTM.*)

A.D. KORSHUNOVA, M.G. DIVASHUK, I.A. DAEBL, G.I. KARLOV, A.A. SOLOVIEV

(RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev)

Height reduction genes of wheat and rye are well-studied and molecular markers have been developed for identification of these genes. However, exploiting of these markers in triticale has not been investigated yet. Wheat and rye subgenomes in triticale genome can significantly affect the use efficiency of DNA markers and hinder the interpretation of obtained results. The

possibility and efficiency of wheat and rye DNA markers utilization in triticale have been shown in our study.

Primers developed by Ellis et al. [16] for detection of allele *Rht-B1b* in wheat varieties can be used in triticale. Non-specific amplification with rye genome which would influence the interpretation of the data has not been revealed. To determine allele *Rht-B1e* in the small number of hexaploid triticale samples both markers developed by Pearce et al. [26] and by Li et al. [24] can be used, but for the use of the former more electrophoresis time is needed. However, in breeding we recommend using combination of the following primers: *BF/WR3* for identification *Rht-B1A* allele and *NF.BF.2/Me.R* for identification *Rht-B1e* allele. Primers for the rye microsatellite locus *REMS1218* can also be used in triticale. Non-specific amplification from wheat genomes has not been identified. But we found two types of amplification which did not get reported previously. Further research is required to identify the *H1* gene in samples with new types of amplification.

Keywords: triticale, semi-dwarf genes, Rht-B1b, Rht-B1e, H1, DNA markers.

Коршунова Анастасия Дмитриевна — асп. кафедры генетики и биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел. (499) 977-70-01; e-mail: korshunova.ad88@gmail.com).

Дивашук Михаил Георгиевич — к. б. н., ст. науч. сотр. Центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел. (499) 977-70-01; e-mail: divashuk@gmail.com).

Даебль Иван Абдулхасан Мохаммед Али — студент второго курса магистратуры кафедры генетики и биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49).

Карлов Геннадий Ильич — д. б. н., руководитель Центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел. (499) 977-70-01; e-mail: karlov@timacad.ru).

Соловьев Александр Александрович — д. б. н., проф., зав. кафедрой генетики и биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; (499) 976-40-72; e-mail: asoloviev70@gmail.com).

Korshunova Anastasiya Dmitrievna — PhD student of the department of genetics and biotechnology, RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel. (499) 977-70-01; e-mail: korshunova.ad88@gmail.com).

Divashuk Mikhail Georgievich — PhD in Biology, senior research scientist of the Center of molecular biotechnology, RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel. (499) 977-70-01; e-mail: divashuk@gmail.com).

Daabl Ivan Abdulhasan Mohammed Ali — a 2nd-year master student of the department of genetics and biotechnology, RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49).

Karlov Gennadiy Ilich — Doctor of Biological Sciences, head of the Center of molecular biotechnology, RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel. (499) 977-70-01; e-mail: karlov@timacad.ru).

Soloviev Aleksandr Aleksandrovich — Doctor of Biological Sciences, professor, head of the department of genetics and biotechnology, RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel. (499) 976-40-72; e-mail: asoloviev70@gmail.com).