

УДК 633.11:575.116

Г. К. Кичигіна, студент,

Г. О. Чеботар, к.б.н.,

С. В. Чеботар, д.б.н, професор

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,

кафедра генетики та молекулярної біології,

вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: s.v.chebotar@gmail.com

БІОІНФОРМАТИВНИЙ АНАЛІЗ НУКЛЕОТИДНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ АЛЕЛІВ ГЕНІВ КОРОТКОСТЕБЛОВОСТІ ПШЕНИЦІ *RHT-B1* ТА *RHT-D1*

Проведений біоінформативний аналіз нуклеотидних послідовностей алелів генів короткостебловості пшениці *Rht-B1* та *Rht-D1*. Встановлено, що множинні алелі гомеологічних генів *Rht-B1* та *Rht-D1* пов'язані з точковими мутаціями, інсерціями, делеціями та ампліфікацію фрагментів в регіоні, який кодує DELLA-домен однойменних білків.

Ключові слова: пшениця м'яка; гени короткостебловості; генотип; біоінформативний аналіз.

За останні 100 років продуктивність озимої пшениці на Півдні України зросла майже вдвічі – від 24,6 ц/га на початку минулого сторіччя до сучасного рівня 47,5 ц/га [2]. Збільшення врожаїв пшениці відбулось не тільки завдяки селекції на врожайність і стійкість до патогенів та абіотичних стресів, але й завдяки залученню до селекційних програм генів короткостебловості (*Rht*), що підвищили стійкість до вилягання за рахунок зміни архітекtonіки рослини [3]. Скорочення висоти рослин у злаків пов'язано зі зменшенням ризику полягання рослин і підвищенням потенційної врожайності завдяки перерозподілу більшої кількості асимілянтів, які поступають у зерно [1].

Гени *Rht-B1b* та *Rht-D1b*, локалізовані у коротких плечах хромосом 4В та 4D [12], кодують DELLA-протеїни [19]. DELLA є транскрипційними регуляторами, які репресують гіберелін-сигнальний шлях. За даними різних авторів [18, 19] зміни в білковій послідовності DELLA-протеїнів залежать від алельного стану генів *Rht-B1* та *Rht-D1*.

Навколишнє середовище та внутрішньоклітинні процеси стимулюють ріст рослини шляхом підвищення рівня біологічно активних гіберелових кислот (ГК), які активують деградацію DELLA-протеїнів [7]. Для рису було показано, що деградація репресорів росту рослин запускається зв'язуванням ГК з рецептором GID1 [20]. У ядрі комплекс ГК-GID1 зв'язується у потрійний комплекс з DELLA-протеїном через N-термінальний DELLA/TVHYNP мотив, після чого

може відбуватися зміна конформації такої молекули, але це не обов'язково. Потім F-box DELLA-протеїну зв'язується з GID2 та SLY1 протеїнами та з E3-убіквітин-лігазним-комплексом. Такий великий комплекс пізнається 26S протеасомою та руйнується. При відсутності ГК DELLA-протеїни негативно регулюють ГК-відповідь: SCF^{SLY1} E3-убіквітин лігаза не може взаємодіяти з білками DELLA. Таким чином, DELLA-білки зберігаються в клітинах і подавляють ГК-відповіді, такі, як проростання насіння, видовження стебла, цвітіння та інші.

Rht гени застосовуються у світовій селекції з 1960 року і більш, ніж 70% генотипів сучасних сортів м'якої пшениці в європейських країнах містить ці гени. На сьогодні визначено 11 і 9 алельних варіантів генів *Rht-B1* та *Rht-D1*, відповідно. Метою роботи було проаналізувати різницю між нуклеотидними послідовностями алелів генів короткостебловості *Rht-B1* та *Rht-D1*, якщо відомо, що на фенотиповому рівні алелі цих генів по різному позначаються на ознаці «висота рослин», а також відрізняються між собою за плеiotропними ефектами [11]. Для відповіді на це питання був застосований біоінформативний аналіз нуклеотидних послідовностей алелів генів *Rht-B1* та *Rht-D1*, наведених в базі даних GenBank (NCBI) [17].

Матеріали та методи досліджень

Пошук та порівняння нуклеотидних послідовностей алелів *Rht-B1* та *Rht-D1* генів, представлених у базі даних GenBank (NCBI) здійснювали за допомогою програми MAFFT [16] та BLASTn [6]. Для проведення BLAST аналізу нуклеотидних послідовностей генів короткостебловості, референтною послідовністю був обраний алель *Rht-B1a*.

Результати та обговорення

Аналіз секвенованих нуклеотидних послідовностей генів *Rht-B1* та *Rht-D1*, показав що на сьогодні відомі нуклеотидні послідовності 8 алелів гена *Rht-B1*: *a, b, c, e, h, i, j, p* і 9 алелів гена *Rht-D1*: *a, b, c, d, e, f, g, h, i*, з яких в літературі описані *a, b, c, d, e* алелі гена *Rht-D1* та алелі *a, b, c, e, p* гена *Rht-B1* [7, 18]. Алельні варіанти *Rht-B1* (*h, i, j*) та *Rht-D1* (*e, f, g, h, i*) визначені методом екотілінг та анотовані в GenBank (NCBI) A. Li та A. Zhang [15].

За допомогою програми MAFFT проведено порівняння нуклеотидних послідовностей алелів зазначених генів *Rht-B1* і *Rht-D1* та охарактеризовані нуклеотидні заміни, які призвели до появи множинного алелізму за цими генами. Підтверджено, що нуклеотидна послідовність *Rht-B1b* має одну заміну нуклеотида С на Т у кодоні 64 у порівнянні з алелем дикого типу *Rht-B1a*, це співпадає з раніше опублікованими даними [18]. Алель *Rht-B1e* має одонуклеотидну заміну у 61 кодоні, що узгоджується з даними [18]. Послідовність алелю *Rht-B1c* має 4 одонуклеотидні заміни у кодонах: 15 (G на C), 25 (G на A), 241 (A на G),

294 (А на С) (рис. 1 А, Б) відносно нуклеотидної послідовності дикого типу та несе інсерцію у 508 п.н., яку показав Пірс зі співавторами [18]. За даними [18], *Rht-B1d* має ідентичну мутацію з алелем *Rht-B1b* і є припущення, що існують і інші мутації у цьому алелі поза кодуєчим регіоном, але нуклеотидна послідовність *Rht-B1d* в GenBank (NCBI) відсутня. Алель *Rht-B1f* був описаний [20] у рослин *T. aethiopicum*, але цей алель досі не секвенований. Алель *Rht-B1g* відповідає високорослому фенотипові [10]. Утворений цей алель завдяки невідомій делеції у нуклеотидній послідовності *Rht-B1b* гену, яка порушує його функцію. В послідовності *Rht-B1p* алелю Баженовим зі співавт. [7] детектовано заміну С на Т в положенні 178 нуклеотиду від стартового кодону, що призводить до появи стоп-кодону в DELLA домені. Наявність *Rht-B1p* призводила до зменшення висоти рослин приблизно на 30 і 50 % у м'якої та твердої пшениці, відповідно [7]. Алель *Rht-B1h* несе множинні однонуклеотидні заміни у кодонах: 15 (G на C), 25 (G на A), 241 (A на G) та 294 (А на С), а *Rht-B1i* має транзицію А на G у кодоні 205 порівняно з алелем *Rht-B1a* дикого типу. Для алелю *Rht-B1j* визначені 2 заміни: у 304 кодоні (Т на С) та у 305 (С на А) (рис. 1 В).

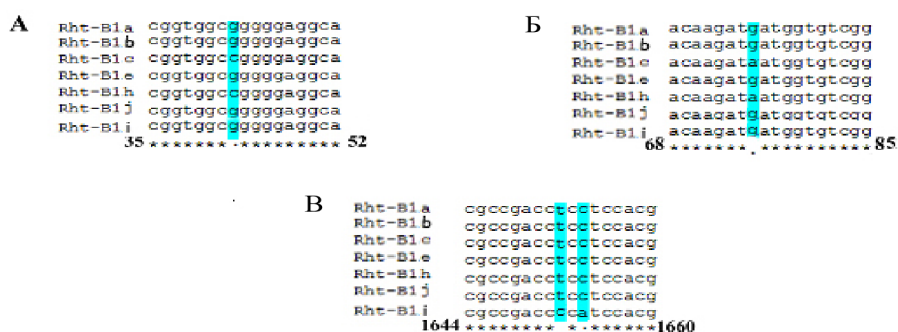


Рис. 1. Нуклеотидні послідовності алелів фрагменту гену *Rht-B1*: відмічено заміни у кодонах 15 (А), 25 (Б), 304 та 305 (В)

Відносно алеля *Rht-D1a* дикого типу нуклеотидна послідовність *Rht-D1b* алеля має одну нуклеотидну заміну (G на T) у 61 кодоні, яка призводить до утворення стоп-кодону [18, 19]. Алель *Rht-D1c*, що зустрічається у генотипі сорту Том Тумб, утворений внаслідок присутності декількох копій алелю *Rht-D1b*. У той же час розглядають *Rht-D1d* алель як похідний від *Rht-D1c*, тільки зі зменшеною кількістю копій [18]. Алель *Rht-D1e*, має трансверсію у кодоні 395 (G на C) (рис. 2 А). Алель *Rht-D1f* має транзицію у 26 кодоні (Т на С) (рис. 2 Б). Алель *Rht-D1g* відрізняється від алелю дикого типу делецією послідовності TCGAGATGCA, що розташована з 441 по 444 кодон (рис. 2 В). Аналіз нуклеотидної послідовності алелю *Rht-D1h* показав наявність заміни Т на G у 391 кодоні (рис. 2 А). Алель *Rht-D1i* несе транзицію – G на А у кодоні 196.

А		1165	1185	Б		73	89	В	1313	1332	
Rht-D1a	ggaagc	cgcccagttc	cgc	Rht-D1a	actcagtct	tcgagatgca	ca	Rht-D1a	actcagtct	tcgagatgca	ca
Rht-D1b	ggaagc	cgcccagttc	cgc	Rht-D1b	actcagtct	tcgagatgca	ca	Rht-D1b	actcagtct	tcgagatgca	ca
Rht-D1e	ggaagc	cgcccagttc	cgc	Rht-D1e	actcagtct	tcgagatgca	ca	Rht-D1e	actcagtct	tcgagatgca	ca
Rht-D1f	ggaagc	cgcccagttc	cgc	Rht-D1f	actcagtct	tcgagatgca	ca	Rht-D1f	actcagtct	tcgagatgca	ca
Rht-D1g	ggaagc	cgcccagttc	cgc	Rht-D1g	actcagtct	tcgagatgca	ca	Rht-D1g	actcagtct	tcgagatgca	ca
Rht-D1h	ggaagc	cgcccagttc	cgc	Rht-D1h	actcagtct	tcgagatgca	ca	Rht-D1h	actcagtct	tcgagatgca	ca
Rht-D1i	ggaagc	cgcccagttc	cgc	Rht-D1i	actcagtct	tcgagatgca	ca	Rht-D1i	actcagtct	tcgagatgca	ca

Рис. 2. Нуклеотидна послідовність алелів фрагменту гену *Rht-D1*: заміни у кодонах 26 (А), 391 та 395 (Б), 441 – 444 (В)

За допомогою програми MAFFT був проведений порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей алелів дикого типу *Rht-B1a* та *Rht-D1a* вивчаємих генів. Послідовність *Rht-B1a* (1866 п.н. виявилась на 387 п.н. коротшою за послідовність *Rht-D1a* (2253 п.н.). Встановлено наявність 39 трансверсій, серед яких найчастіше зустрічались заміни С на G (28 заміни), та 18 транзицій, 11 з яких – заміна С на Т. За даними [18] у пшениці алелі гену короткостебловості *Rht-D1* мають більший вплив на висоту рослини, ніж *Rht-B1*.

У генотипах сучасних сортів пшениці найчастіше зустрічаються алелі *Rht-B1b* та *Rht-D1b*, перенесені з японського сорту Норін 10 [9]. Алель *Rht-B1d* перенесено з японського сорту Сайтама 27, алель *Rht-B1e* характерний для сортів Краснодарський карлик 1 та Безоста карликова, *Rht-B1c* походить з сорту Том Тумб [18]. За проведеними нами дослідженнями алель *Rht-B1e* мають також сорти – Одеська 132, Тира, Одеська напівкарликова, Ювілейна 75 створені в (Одесі, ВСГІ). Алель *Rht-B1p* клоновано та секвеновано з лінії м'якої пшениці 'Chris Mutant', яка є носієм гену *Rht17* [7]. Джерелом алелів *Rht-D1c* та *Rht-D1d* є сорт Ай-Біан. Рослини з алелем *Rht-D1d* з'явилися спонтанно в популяції рослин носіїв *Rht-D1c* алеля та відрізнялися більшою висотою порівняно з носіями *Rht-D1c* [18].

Вивчалися прямі та плейотропні ефекти алелів генів короткостебловості в умовах південного степу України [5, 14]. Привнесення алелів *Rht-B1b*, *Rht-B1e* або *Rht-D1b* в генотип, що характеризувався відсутністю гіберелін-нечутливих алелів карликовості, тобто мав генотип з алелями *Rht8c Rht-B1a Rht-D1a Ppd-D1a* знижувало ВР в середньому на 19, 31 або 16 %, відповідно [5]. Проте це зниження висоти рослин суттєво модифікується генетичним фоном рекурентних форм та умовами року. Комплекс алелів генів *Rht8c+ Rht-B1e* (за наявнос-

ті мажорного алеля *Ppd-D1a* – нечутливості до фотоперіоду) в генотипі зменшував висоту рослин в середньому на 52 %, а комплекс *Rht8c+Rht-B1b* на фоні *Ppd-D1a* на 30 % у порівнянні з високорослими та чутливими до фотоперіоду рослинами з комплексом алелів *Rht8a+ Rht-B1a* [5]. Алелі генів короткостебловості *Rht8c*, *Rht-B1e*, *Rht-B1b* та їхні комплекси *Rht8c+Rht-B1e*, *Rht8c+Rht-D1b* зменшують довжину колеоптіля ($P=0,01$). Рослини-носії одного (*Rht8c* – середньорослі) та двох алелів генів короткостебловості (*Rht8c+Rht-B1e*, *Rht8c+Rht-B1b*, *Rht8c+Rht-D1b* – напівкарликові) за довжиною колоса між собою достовірно не розрізняються, проте їм властива менша довжина колоса, ніж високорослим батьківським формам. Це зменшення розмірів колоса не позначається на кількості або масі зерна з рослини через збільшення щільності колоса. При цьому в колосі суттєво зменшується кількість стерильних квіток [11]. Маса 1000 зерен та розмір зерна більш значною мірою залежать від умов розвитку рослин, ніж від кількості та якості алелів за генами короткостебловості в генотипі. Наявність генів *Rht-B1e* у генотипі може призводити до зменшення кількості продуктивних стебел, хоча понад 95 % загальної мінливості цієї ознаки зумовлюється негенетичними чинниками. Продуктивність рослини пшениці, що визначалась масою зерна з рослини (МЗР), головним чином визначається продуктивністю її бокових пагонів, роль яких особливо зростає у середньорослих генотипів, які мають алелі *Rht8c* та *Ppd-D1a*, і напівкарликових рослин, що несуть алелі *Rht8c+Rht-B1b*, *Rht8c+Rht-B1e* або *Rht8c+Rht-D1b* та *Ppd-D1a*, це супроводжується зменшенням внеску частки головного колоса у загальну продуктивність рослини. При цьому максимальний вклад у МЗР вносить продуктивність пагонів (0,8 h) другого ярусу. По силі дії на зменшення висоти рослин пшениці деякі алелі вивчаємих генів короткостебловості можуть бути впорядковані таким чином: *Rht-B1a* (4B) < *Rht-B1d* < *Rht-B1b* < *Rht-B1e* < *Rht-B1c*; *Rht-D1a* (4D) < *Rht-D1b* < *Rht-D1d* < *Rht-D1c* [10]. Що узгоджується з дослідженнями на лініях-аналогах [4], в яких також показано, що алелі дикого типу домінують над мутантними алелями короткостебловості і за ступенем домінування розташовані: *Rht-B1a* > *Rht-B1b* > *Rht-B1e*.

Причина різного впливу на висоту рослин алелів генів короткостебловості лежить у відмінностях на нуклеотидному рівні, які, як слід очікувати, позначаються на амінокислотній послідовності та конформації DELLA-протеїну та, як наслідок, на рівні зв'язування його з Е3-убіквітин-лігазним-комплексом.

Щодо змін у структурі DELLA-білків, то через мутації в нуклеотидній структурі гену синтезуються N-термінально скорочені DELLA. Саме N-термінальний DELLA-домен впливає на регуляцію ГК [7]. Делеції або специфічні місенс мутації консервативних мотивів (DELLA та/або VHYNP) всередині DELLA-домену надають мутантним протеїнам нечутливість до ГК-індукованої деградації, що веде до ГК-нечутливого «карликового фенотипу» [13, 14]. Цікавим є те, що немає чітко вираженої кореляції між ступенем репресії росту рослини, що є результатом прояву різних DELLA-мутацій та їх розміром [21].

Висновки

Для генів короткостебловості *Rht-B1* і *Rht-D1* характерний множинний алелізм. Аналіз відмінностей між нещодавно визначеними послідовностями за допомогою методу екотілінг та алелями генів короткостебловості, що знайдені в різних сортах і формах пшениці, показав, що множинні алелі гомеологічних генів *Rht-B1* та *Rht-D1* пов'язані з одонуклеотидними точковими мутаціями, інсерціями, делеціями та ампліфікацією послідовностей в регіоні, який кодує DELLA-домен однойменних білків.

Дані щодо секвенованих нуклеотидних послідовностей алелів *d*, *g*, *f* для *Rht-B1* на даний час в базі даних GenBank (NCBI) відсутні. Наразі не відомо, які фенотипові переваги або недоліки несуть алелі *h*, *i*, *j* *Rht-B1* та *e*, *f*, *g*, *h*, *i* *Rht-D1* генів короткостебловості. Дослідження їх фенотипового прояву є актуальними в майбутньому як пошук альтернативних джерел карликовості пшениці, які можуть бути використані у селекції.

Список використаної літератури

1. Абакуменко А. В. Коррелятивні зв'язи елементів структури урожаю у низкорослих озимих пшениц / А. В. Абакуменко // Научн.-техн. бюл. ВСГИ. – 1987. – Вып. 1 (63). – С. 64–71.
2. Литвиненко М. А. Дослідження з селекційного удосконалення зернових культур в наукових установах УААН за останні 75 років / М. А. Литвиненко // Збірник наукових праць СГІ – НЦНС. – 2007. – Вип. 10 (50). – С. 9–15.
3. Лыфенко С. Ф. Полукарликовые сорта озимой пшеницы / С. Ф. Лыфенко. – К.: Урожай, 1987. – 192 с.
4. Мощний І. І. Ступінь фенотипового домінування та успадкованість за ознакою висота рослин у гібридів пшениці з різними алелями *Rht*-генів / І. І. Мощний, А. І. Гончарова, Г. О. Чеботар, С. В. Чеботар // Цитологія та генетика. – 2017. – Т. 51, № 1. – С. 25–33.
5. Чеботарь Г. А. Прямые эффекты генов короткостебельности на генофоне известных сортов пшеницы юга Украины / Г. А. Чеботарь, И. И. Мощный, С. В. Чеботар, Ю. М. Сиволап // Цитология та генетика. – 2012. – Т. 46, № 6 – С. 44–52.
6. Altschul S. Basic local alignment search tool / S. Altschul, W. Gish, W. Miller [et al.] // Journal of Molecular Biology. – 1990. – Vol. 215 (3). – P. 403–410.
7. Bazhenov M. S. Isolation of the dwarfing *Rht-B1p* (*Rht17*) gene from wheat and the development of an allele-specific PCR marker: new strategies in plant improvement / M. S. Bazhenov, M. G. Divashuk, Y. Amagai, N. Watanabe, G. I. Karlov // Molecular breeding. – 2015. – Vol. 35, № 11. – P. 213–213.
8. Bolle C. The role of GRAS protein in plant signal transduction and development / C. Bolle // Planta. – 2004. – Vol. 218. – P. 683–692.
9. Borojevic K. The transfer and history of “reduced height genes” (*Rht*) in wheat from Japan to Europe / K. Borojevic, K. Borojevic // Journal of Heredity. – 2005. – Vol. 94, № 4. – P. 455–459.
10. Börner A. The relationships between the dwarfing genes of wheat and rye / A. Börner, J. Plaschke, V. Korzun [et al.] // Euphytica. – 1996. – Vol. 89. – P. 69–75.
11. Chebotar G. A. Pleiotropic effects of gibberellin-sensitive and gibberellin-insensitive dwarfing genes in common wheat of the southern steppe region of the Black Sea / G. A. Chebotar, S. V. Chebotar, I. I. Motsnyy // Cytology and Genetics. – 2016. – Vol. 50, № 1. – P. 26–35.
12. Ellis M. H. Molecular mapping of gibberellin-responsive dwarfing genes in bread wheat / M. H. Ellis, G. J. Rebetzke, F. Azanza [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2005. – Vol. 111. – P. 423–430.
13. Gubler F. Gibberellin signaling in barley aleurone cells: Control of SLN1 and GAMYB expression / F. Gubler, P. M. Chandler, R. G. White [et al.] // Plant Physiol. – 2002. – Vol. 129. – P. 191–200.
14. Itoh H. The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei / H. Itoh, M. Ueguchi-Tanaka, Y. Sato [et al.] // Plant Cell. – 2002. – Vol. 14. – P. 57–70.
15. Li A. Novel natural allelic variations at the *Rht-1* loci in wheat / A. Li, W. Yang, X. Lou [et al.] // Integr. Plant Biol. – 2013. – Vol. 55 (11). – P. 1026–1037.

16. MAFFT – Multiple sequence alignment program [Електронний ресурс] / Режим доступу до інструменту: <http://mafft.cbrc.jp/alignment/software>
17. NCBI – National Center for Biotechnology Information [Електронний ресурс] / Режим доступу до бази даних: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
18. Pearce S. Molecular characterisation of *Rht-1* dwarfing genes in wheat / S. Pearce, R. Saville, S. P. Vaughan [et al.] // *Plant Physiol. Preview*. – 2011. – Vol. 157. – P. 1820–1831.
19. Peng J. R. Green revolution genes encode mutant gibberellin response modulators / J.R. Peng, D. E. Richards, N. M. Hartley // *Nature*. – 1999. – Vol. 400. – P. 256–261.
20. Ueguchi-Tanaka M. Gibberellin insensitive dwarf1 encodes a soluble receptor for gibberellin / M. Ueguchi-Tanaka, M. Ashikari, M. Nakajima // *Nature*. – 2005. – Vol. 437. – P. 693–698.
21. Willige B. The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of *Arabidopsis* / B. Willige, S. Ghosh, C. Nill [et al.] // *Plant Cell*. – 2007. – Vol. 19. – P. 1209–1220. – Режим доступу до журналу: www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.107.051441

Стаття надійшла до редакції 12.04.2016

А. К. Кичигина, Г. А. Чеботарь, С. В. Чеботарь

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, кафедра генетики и молекулярной биологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: s.v.chebotar@gmail.com

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОВ КОРОТКОСТЕБЕЛЬНОСТИ ПШЕНИЦЫ *RHT-B1* И *RHT-D1*

Резюме

Введение. Гены короткостебельности *Rht-B1* и *Rht-D1* широко используются в селекционных программах в мире с 1960-х годов и имеют значительные прямые и плейотропные эффекты на рост и развитие растений пшеницы. **Целью** нашей работы было проанализировать различия между нуклеотидными последовательностями аллелей *Rht-B1* и *Rht-D1*. В качестве референсной была выбрана последовательность аллеля *Rht-B1a* из базы данных GenBank (NCBI). Поиск и сравнение последовательностей аллелей *Rht-B1* и *Rht-D1* проводили с использованием программ BLASTn и MAFFT. **Результаты.** В GenBank в настоящее время представлены секвенированные последовательности 8 аллелей гена *Rht-B1*: *a, b, c, e, h, i, j, p* последовательности *g, f, d* аллелей до сих пор остаются неизвестными, а также 9 аллелей гена *Rht-D1*: *a, b, c, d, e, f, g, h, i*. Более подробно описаны в литературе аллели *a, b, c, e, p* (*Rht-B1*) и *a, b, c, d, e* (*Rht-D1*) [7, 18]. Аллели *Rht-B1* (*h, i, j*) и *Rht-D1* (*e, f, g, h, i*) выделены методом экотипинга (Li and Zhang, 2013). Аллель *Rht-B1h* имеет несколько одиночных нуклеотидных замен в кодонах: 15 (G на C), 25 (G на A), 241 (A на G) и 294 (A на C), а *Rht-B1i* характеризуется транзицией A в G в кодоне 205 по сравнению с аллелем дикого типа *Rht-B1a*. Для аллеля *Rht-B1j* обнаружены две замены в кодонах 304 (T на C) и 305 (C на A). *Rht-D1f* имеет транзицию в кодоне 26 (T на C). Аллель *Rht-D1g* отличается от аллеля дикого типа делецией последовательности TCGAGATGCA, расположенной от 441 до 444 кодона. Анализ нуклеотидной последовательности *Rht-D1h* показал наличие замены T на G в кодоне 391. Аллель *Rht-D1i* имеет транзицию G в A в кодоне 196.

С помощью MAFFT было показано, что последовательность *Rht-B1a* (1866 п.н.) короче, чем *Rht-D1* (2253 п.н.), также эти последовательности отличаются наличием 39 трансверсий и 18 транзиций.

Заключение. Множественные аллели гомеологичных генов *Rht-B1* и *Rht-D1* связаны с точечными мутациями, инсерциями, делециями и амплификацией фрагментов в регионе, который кодирует DELLA-домен одноименных белков. Идентификация фенотипического проявления этих аллелей будет актуальным для привлечения альтернативных источников короткостебельности в селекционные программы в будущем.

Ключевые слова: пшеница мягкая, гены короткостебельности, генотип, биоинформатический анализ.

G. K. Kychygina, G. O. Chebotar, S. V. Chebotar

Odesa National Mechnykov University, Department of Genetics and Molecular Biology, 2, Dvoryanska Str., Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: s.v.chebotar@gmail.com

BIOINFORMATIC ANALYSIS OF NUCLEOTIDE SEQUENCES OF DWARFING GENES *RHT-B1* AND *RHT-D1*

Abstract

Introduction. Dwarfing *Rht-B1* and *Rht-D1* genes have been used in world breeding programs since 1960s and have significant direct and pleiotropic effects on wheat plants growth and development. **The aim** of our work was to analyze the differences between the nucleotide sequences of alleles of *Rht-B1* and *Rht-D1*. As a reference sequence allele *Rht-B1a* from database GenBank (NCBI) was selected. Comparison of sequences of alleles *Rht-B1* and *Rht-D1* was carried out using BLASTn and MAFFT tools.

Results. In the GenBank currently represented are sequences of 8 alleles *Rht-B1*: *a*, *b*, *c*, *e*, *h*, *i*, *j*, *p* sequences of *g*, *f*, *d* alleles remained unknown, and 9 alleles of *Rht-D1* gene: *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f*, *g*, *h*, *i*. Alleles *a*, *b*, *c*, *e*, *p* (*Rht-B1*) and *a*, *b*, *c*, *d*, *e* (*Rht-D1*) [7, 18] have been described in literature in more detail and. Alleles *Rht-B1* (*h*, *i*, *j*) and *Rht-D1* (*e*, *f*, *g*, *h*, *i*) were defined by EcoTILLING (Li and Zhang, 2013).

Allele *Rht-B1h* has multiple single nucleotide substitutions in codons: 15 (G to C), 25 (G to A), 241 (A to G) and 294 (A to C), a *Rht-B1i* has transition A to G in codon 205 in comparison with wild type allele *Rht-B1a*. For allele *Rht-B1j* two replacements in codons 304 (T to C) and 305 (C to A) were detected.

Rht-D1f has transition in codon 26 (T to C). Allele *Rht-D1g* differs from the wild-type allele by deletion of TCGAGATGCA sequence located from 441 to 444 codons. The analysis of *Rht-D1h* nucleotide sequence showed presence of T to G substitution in codon 391. Allele *Rht-D1i* has transition – G to A in codon 196.

It was shown with MAFFT that *Rht-B1a* sequence (1866 bp) appeared to be shorter than *Rht-D1a* (2253 bp), with 39 transversions and 18 transitions.

Conclusion. The multiple alleles of homeologous genes *Rht-B1* and *Rht-D1* are associated with point mutations, insertions, deletions and amplification of fragments in the region that encodes DELLA-domain of DELLA-proteins. Identification of phenotypic manifestations of these alleles will be actual for future involving of alternative dwarfing sources in wheat breeding.

Key words: bread wheat, dwarfing genes, genotype, bioinformatics analysis.

References

1. Abakumenko AV (1987) "Correlative connection structure elements in low-yield winter wheat" ["Korelyatyvni zv'yazku elementiv struktury vrozhayu u nyz'koroslykh ozymykh pshenyts"], Sci.-Tech. Bull. PBGI, 1 (63), pp 64-71.
2. Litvinenko MA (2007) "Research on improving the breeding crops in scientific institutions UAAN for last 75 years" ["Doslidzhennya z selektsiynoho udoskonalennya zernovykh kul'tur v naukovykh ustanovakh UAAN za ostanni 75 rokiv"], Proceedings of PBGI – NCSCI, 10 (50), pp 9-15.
3. Lyfenko SF (1987) Semidwarfing varieties of winter wheat [Napivkarlykovi sorty ozymoi pshenytsi], Kyiv: Harvest, 192 p.
4. Motsnyy II, Goncharova AI, Chebotar GA, Chebotar SV (2017) "The degree of heritability and phenotypic dominance of plant height in wheat hybrids with different alleles Rht-genes" ["Stupin' uspadkovanoho i fenoty-pova dominuvannya na osnovi vysoty roslyn u hibrividiv pshenytsi z riznymy aleyamy *Rht-hena*"], Cytol Genet, 51, No 1, pp 25-33.
5. Chebotar GA, Motsnyy II, Chebotar SV, Sivolap YuM (2012) "Effects of dwarfing genes on the genetic background of wheat varieties in Southern Ukraine", Cytol Genet, 46, No 6, pp 366-372.
6. Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D (1990) "Basic local alignment search tool", Journal of Molecular Biology, 215 (3), pp 403-410.
7. Bazhenov MS, Divashuk MG, Amagai Y, Watanabe N, Karlov GI (2015) "Isolation of the dwarfing *Rht-B1p* (*Rht17*) gene from wheat and the development of an allele-specific PCR marker: new strategies in plant improvement", Molecular breeding, 35 (11), pp 213-213.
8. Bolle C (2004) "The role of GRAS protein in plant signal transduction and development", Planta, 218, pp 683-692.
9. Borojevic K, Borojevic K (2005) "The transfer and history of "reduced height genes" (*Rht*) in wheat from Japan to Europe", Journal of Heredity, 94, № 4, pp 455-459.
10. Börner A, Plaschke J, Korzun V et al. (1996) "The relationships between the dwarfing genes of wheat and rye", Euphytica, 89, pp 69-75.
11. Chebotar GA, Chebotar SV, Motsnyy II (2016) "Pleiotropic effects of gibberellin-sensitive and gibberellin-insensitive dwarfing genes in common wheat of the southern steppe region of the Black Sea", Cytology and Genetics, 50, 1, pp 26-35.
12. Ellis MH, Rebetzke GJ, Azaña F et al. (2005) "Molecular mapping of gibberellin-responsive dwarfing genes in bread wheat", Theor Appl Genet, 111, pp 423-430.
13. Gubler F, Chandler PM, White RG et al. (2002) "Gibberellin signaling in barley aleurone cells: Control of SLN1 and GAMYB expression", Plant Physiol, 129, pp 191-200.
14. Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Sato Y et al. (2002) "The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei", Plant Cell, 14, pp 57-70.
15. Li A, Yang W, Lou X, Liu D, Sun J, Guo X, Wang J, Li Y, Zhan K, Ling HQ, Zhang AJ (2013) "Novel natural allelic variations at the *Rht-1* loci in wheat", Integr Plant Biol, 55 (11), pp 1026-1037.
16. MAFFT Multiple sequence alignment program, <http://mafft.cbrc.jp/alignment/software>
17. NCBI National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
18. Pearce S, Saville R, Vaughan SP et al. (2011) "Molecular characterisation of *Rht-1* dwarfing genes in wheat", Plant Physiol Preview, 157, pp 1820-1831.
19. Peng JR, Richards DE, Hartley NM (1999) "Green revolution genes encode mutant gibberellin response modulators", Nature, 400, pp 256-261.
20. Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M (2005) "Gibberellin insensitive dwarf1 encodes a soluble receptor for gibberellins", Nature, 437, pp 693-698.
21. Willige B, Ghosh S, Nill C et al. (2007) "The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of Arabidopsis", Plant Cell, 19, pp 1209-1220, www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.107.051441