

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/LettersVJ-2022-8-13

Оригинальное исследование

Тандемный повтор длиной 646 п.н. маркирует короткое плечо хромосомы 5В у образцов *Triticum* и *Aegilops*

Е.М. Сергеева , И.Г. Адонина, М.А. Нестеров, Е.А. Салина

Аннотация: Работы по изучению генома пшеницы *Triticum aestivum* L. и ее сородичей, интенсивно проводимые в течение последнего десятилетия, привели к накоплению большого массива данных, в том числе референсных последовательностей геномов. При этом разработка новых хромосомспецифичных цитогенетических и молекулярно-генетических маркеров, которые в перспективе могут быть применены для идентификации хромосом, не теряет актуальности. В данной работе, используя данные анализа BAC-FISH и информацию о референсной геномной последовательности мягкой пшеницы, мы идентифицировали новый тандемный повтор с длиной мотива 646 п.н., локализованный в дистальной части короткого плеча хромосомы 5В. ПЦР-скрининг 218 образцов поли- и диплоидных видов *Triticum* и *Aegilops* показал наличие внутривидового полиморфизма по присутствию данного повтора, что делает возможным его применение в качестве маркера для изучения хромосомных перестроек и анализа гибридного материала.

Ключевые слова: BAC_FISH; *Triticum aestivum*; *Triticum dicoccoides*; тандемный повтор.

Благодарности: Работа выполнена за счет средств проекта Министерства науки и высшего образования FWNR-2022-0017.

Для цитирования: Сергеева Е.М., Адонина И.Г., Нестеров М.А., Салина Е.А. Тандемный повтор длиной 646 п.н. маркирует короткое плечо хромосомы 5В у образцов *Triticum* и *Aegilops*. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;8(3):237-248. DOI 10.18699/LettersVJ-2022-8-13

Original article

Tandem repeat with unit length 646 bp marks the short arm of chromosome 5B in *Triticum* and *Aegilops* accessions and cultivars

Е.М. Sergeeva , I.G. Adonina, M.A. Nesterov, E.A. Salina

Abstract: The genomic studies of the bread wheat *Triticum aestivum* L. and its relatives, intensively carried out during the last decade, have led to the accumulation of a large amount of data, including reference genomic sequences. At the same time, the development of new chromosome-specific cytogenetic and molecular markers, which can be used for chromosome identification, stay relevant. In this work, using BAC-FISH analysis and information on the bread wheat reference genomic sequence, we identified a new 646 bp tandem repeat located at the distal part of the short arm of the chromosome 5B. PCR screening of 218 accessions of polyploid and diploid *Triticum* and *Aegilops* species revealed the intraspecific polymorphism in the presence of this repeat, that makes it possible to use this sequence as a marker for analysis of hybrid material and chromosome rearrangements.

Key words: BAC_FISH; *Triticum aestivum*; *Triticum dicoccoides*; tandem repeat.

Acknowledgements: The work was supported by the Ministry of Science and Higher Education, Project FWNR-2022-0017.

For citation: Sergeeva E.M., Adonina I.G., Nesterov M.A., Salina E.A. Tandem repeat with unit length 646 bp marks the short arm of chromosome 5B in *Triticum* and *Aegilops* accessions and cultivars. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;8(3):237-248. DOI 10.18699/LettersVJ-2022-8-13 (in Russian)

Введение

Злаки, относящиеся к трибе Triticeae, способны формировать межродовые и межвидовые гибриды с последующим образованием аллополиплоидов, что обеспечивает широкие возможности для переноса генов важных агрономических признаков. Полиплоидные пшеницы представлены двумя эволюционными линиями – Emmer и Timopheevii. Мягкая пшеница *Triticum aestivum* L. ($2n = 6x = 42$, AABBDD) является гексаплоидом, который образовался в результате двух раундов гибридизации: между тетраплоидом дикой двузернянкой группы Emmer *Triticum dicoccoides* Koern. ($2n = 4x = 28$, AABB) и диким видом *Aegilops tauschii* Coss. ($2n = 2x = 14$, DD), а *T. dicoccoides* в свою очередь возник в результате гибридизации диплоидного донора генома A *T. urartu* Thum. ex Gandil. ($2n = 2x = 14$, A⁴A⁴) и предполагаемого донора генома B *Aegilops speltoides* Tausch ($2n = 2x = 14$, SS). Другая группа полиплоидных пшениц, Timopheevi, включает тетраплоиды с геномной формулой A⁴A⁴GG: *T. timopheevii* Zhuk., *T. araraticum* Jakubz., *T. militinae* Zhuk. & Migush., которые образовались вследствие другого события гибридизации между *T. urartu* и *Ae. speltoides*.

Интенсивные геномные исследования мягкой пшеницы *T. aestivum* и ее сородичей, проводимые в течение последнего десятилетия Международным консорциумом по секвенированию генома пшеницы (IWGSC, www.wheatgenome.org), привели к опубликованию референсных геномных последовательностей для мягкой пшеницы *T. aestivum* (International Wheat Genome Sequencing Consortium, 2018); также в литературе представлены геномные сборки для тетраплоидной пшеницы *T. dicoccoides* (Avni et al., 2017) и ряда диплоидов (Ling et al., 2018; Avni et al., 2022; Wang et al., 2022).

При этом актуальными остаются разработка и использование цитогенетических и молекулярно-генетических методов идентификации хромосом и их участков, таких как FISH (флюоресцентная гибридизация *in situ*) и специфичные ПЦР-маркеры, которые могут быть использованы при анализе хромосомных перестроек у аллополиплоидов, гибридного материала и интрогрессивных линий.

В качестве зондов для идентификации хромосом у видов *Triticum* и *Aegilops* часто применяют тандемные повторы (Salina, Adonina, 2018). На данный момент известен целый ряд сателлитных (с длиной мономера свыше 100 п.н.) и микросателлитных повторов, необходимых для идентификации хромосом и анализа геномных перестроек: (AAG)_n, (AAC)_n, pTm30, pSc119.2, pAs1, Spelt1, Spelt52, pTa-465, pTa-k566, pTa-s120, pTa-s126, последовательности рибосомальных генов pTa71 и pTa794 (Gerlach, Dyer, 1980; Dubcovsky, Dvorak, 1995; Schneider et al., 2003; Salina et al., 2006; Megyeri et al., 2012; Komuro et al., 2013; Adonina et al., 2015).

Важным ресурсом разработки маркеров для хромосомного анализа являются хромосомспецифичные ВАС-клоны, которые представляют собой клонированные в искусственные бактериальные хромосомы протяженные (около 100 тыс. п.н.) участки геномной ДНК. ВАС-библиотека короткого плеча хромосомы 5B (далее 5BS), полученная в ходе работ по физическому картированию, включает 43,776 клонов (Salina et al., 2018). Для 20 ВАС-клонов хромосомы 5BS,

локализованных в разных участках хромосомного плеча, проведена гибридизация *in situ* на метафазных хромосомах *T. aestivum* сорта Чайниз Спринг. ВАС_029E07 показал наличие точечного сигнала гибридизации в дистальной части хромосомы 5BS мягкой пшеницы. Анализ участка референсной геномной последовательности, соответствующей ВАС_029E07, позволил идентифицировать новую хромосомспецифичную тандемную последовательность ДНК длиной 646 п.н., обозначенную нами как Rep646. ПЦР-анализ с праймерами, специфичными к последовательности Rep646, продемонстрировал полиморфизм по присутствию данного повтора среди разных образцов полиплоидных пшениц и их диплоидных сородичей, что делает перспективным использование Rep646 в качестве маркера для анализа гибридного материала.

Материалы и методы

Растительный материал

Для FISH использовали *T. aestivum* сорт Чайниз Спринг ($2n = 6x = 42$, AABBDD), *T. urartu* (A⁴A⁴), *Ae. speltoides* (SS), *Ae. tauschii* (DD), а также линию *T. aestivum* сорта Чайниз Спринг с замещенной хромосомой 5B от *T. dicoccoides*.

Для ПЦР-анализа применяли ДНК 218 образцов пшеницы и ее сородичей, подробно перечисленные в Приложении 1. Диплоидные виды пшеницы составили 6 линий *T. urartu* ($2n = 2x = 14$, A⁴A⁴), 3 линии *T. monosocum* ($2n = 2x = 14$, A^mA^m), 3 линии *T. boeoticum* ($2n = 2x = 14$, A^bA^b), 16 линий *Ae. speltoides* ($2n = 2x = 14$, SS); тетраплоидные виды – 16 линий *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* ($2n = 4x = 28$, AABB), 25 сортов *T. durum* ($2n = 4x = 28$, AABB), 21 линия *T. dicocum* ($2n = 4x = 28$, AABB), 6 линий *T. araraticum* ($2n = 4x = 28$, AAGG), 3 линии *T. timopheevii* ($2n = 4x = 28$, GGAA); гексаплоидные виды – 95 линий *T. aestivum* ($2n = 6x = 42$, AABBDD), 24 линии *T. spelta* ($2n = 6x = 42$, AABBDD).

Выделение ДНК растений и ВАС-клона

Тотальная ДНК растений выделена из 5–7-дневных проростков по методике, описанной J. Plaschke и коллегами (1995). Препараты ДНК ВАС-клона выделены из бактериальной культуры *E. coli* с использованием набора NucleoSpin 96 Plasmid kit (Macherey-Nagel, Германия).

Концевое секвенирование ВАС-клона

Концевое секвенирование ВАС_029E07 осуществляли методом Сэнгера с использованием универсальных праймеров M13 (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') и T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') с помощью набора BigDye Terminator kit (Applied Biosystems, США). Реакция объемом 20 мкл содержала ~200 мкг ВАС-ДНК, 1.5 мкл BigDye 3.1, 0.25 рМ одного из праймеров (M13 или T7), 4 мкл 5x буфера, деионизированную воду. Реакцию проводили при следующих параметрах: предварительная денатурация 95 °С – 5 мин, затем 80 циклов: 95 °С – 30 с, 55 °С – 15 с, 60 °С – 4 мин. Продукты реакции очищали с помощью преципитации этанолом и разделяли на приборе 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems). Секвенирование выполнено на мощностях ЦКП «Геномика» СО РАН (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/corefacility>).

Флуоресцентная гибридизация *in situ*

Приготовление метафазных хромосом, FISH и идентификацию хромосом осуществляли согласно протоколу, описанному Е.А. Салиной и коллегами с незначительными модификациями (Salina et al., 2006). Общее количество проанализированных метафаз от каждого растения для каждого зонда составило 15–30. ДНК ВАС_029E07 мечена биотином либо дигоксигенином с помощью ник-трансляции. Биотинилированные пробы детектировали с помощью флуоресцеин авидина D (Vector Laboratories, США). Для усиления сигнала гибридизации использовали флуоресцеин антиавидин (Vector Laboratories). Меченные дигоксигенином ДНК-зонды выявлены с помощью антител к антидигоксигенин-родамину (Fab fragments, Sigma-Aldrich, США). Препараты помещали в среду Vectashield (Vector Laboratories), содержащую 0.5 мкг/мл DAPI (4', 6-диамидино-2-фенилиндол, Sigma-Aldrich) для окрашивания хромосом. Анализ препаратов проводили с помощью микроскопа Axioskop 2 Plus (Zeiss, Германия) и записывали на камеру VC-44 (PCO) CCD. Чтобы идентифицировать хромосомы, несущие сигнал, использовали зонд pSC119.2 (Bedbrook et al., 1980). Работы выполняли в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (Новосибирск).

Компьютерный анализ последовательностей ДНК

Локализацию ВАС-клона 029E07 на референсной последовательности генома пшеницы осуществляли с помощью поиска алгоритмом BLAST с использованием в качестве запроса секвенированных ВАС-концевых последовательностей. Базой данных для поиска служили псевдомолекулы референсной последовательности генома мягкой пшеницы *T. aestivum* Чайниз Спринг RefSeq v2.1, расположенной в депозитории последовательностей IWGSC (<https://urgi.versailles.inra.fr>). Аннотирование участка референсной последовательности, соответствующей ВАС_029E07, проводили с помощью алгоритма BLAST с использованием базы данных повторов пшеницы TREP (<https://trep-db.uzh.ch/>) и баз данных нуклеотидных последовательностей NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Сателлитный повтор с длиной мономерной единицы 646 п.н. идентифицирован с помощью визуализации в программе для поиска сходства последовательностей YASS (<http://bioinfo.lifl.fr/yass/index.php>) при параметрах: E-value = e^{-5} , диапазон области сравнения 50–40,000 п.н. (Noé, Kucherov, 2005).

Последовательность мономера сателлитного повтора Rep646 использована как запрос для поиска в базах данных TREP, NCBI, RepBase (<https://girinst.org/repbase/>) (Kohany et al., 2006), а также в последовательностях депозитария IWGSC (IWGSC RefSeq v2.1. chromosomes, Durum Capelli v1, Durum Strongfield v1, Monococcum v1, Sharonensis v1, Speltoides v1, Tauschii v1, Urartu v1) и *T. dicoccoides* сорта Завитан на сайте GrainGenes (https://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/seqserve/blast_wheat.cgi). Для участка псевдомолекулы *T. dicoccoides* сорта Завитан, содержащего повтор Rep646, и соответствующего участка *T. aestivum* сорта Чайниз Спринг построена карта сходства с помощью программы YASS, чтобы оценить степень гомологии последовательностей у двух видов. Множественное выравнивание последовательностей ДНК отдельных мономеров повтора Rep646 проведено с по-

мощью программы MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (Corpet, 1988).

ПЦР-анализ

Специфичные праймеры для амплификации повтора Rep646 разработаны с использованием программы Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) и соответствовали консервативным участкам повтора. Последовательности праймеров: Rep646F (5'-CTTAGTTTCGTCGCCGTTTG-3'), Rep646R (5'-CCATTATCCCAACGATTGC-3'). Ожидаемая длина продукта амплификации составила 476 п.н. Качество амплификации ДНК проверено методом ПЦР с праймерами к гену 5S рРНК. Для образцов, показавших отсутствие продукта амплификации с праймерами Rep646F и Rep646R, применяли повторный ПЦР-анализ. Реакцию проводили в объеме 20 мкл: 50 нг ДНК-матрицы, 0.25 пМ прямого и обратного праймеров, 2 мкл буфера для ПЦР (65 мМ Трис-НСI, рН 8.9; 1.5 мМ MgCl₂; 16 мМ (NH₄)₂SO₄; 0.05 % Tween 20), 0.2 мМ каждого дНТФ и 1 ед. акт. Taq ДНК-полимеразы. Параметры реакции: предденатурация 94 °С – 4 мин; затем 35 циклов: 94 °С – 30 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 30 с. Продукты ПЦР разделяли в 1 % агарозном геле, фотографировали с помощью системы GelDoc XR⁺ (Bio-Rad, США).

Результаты

FISH с ВАС_029E07 и Rep646

Гибридизация ВАС_029E07 на метафазных хромосомах полиплоидных пшениц и их диплоидных сородичей показала различающиеся спектры. Так, наблюдали четкий точечный сигнал в дистальной области короткого плеча хромосомы 5В мягкой пшеницы сорта Чайниз Спринг. При этом у *Ae. speltoides* (SS), *Ae. tauschii* (DD) и *T. urartu* (A⁴A⁴), *T. timopheevii* (A^tA^tGG), линии пшеницы сорта Чайниз Спринг с хромосомой 5В, замещенной на хромосому *T. dicoccoides*, точечный сигнал отсутствовал, отмечена дисперсная локализация сигнала в субтеломерных районах всех хромосом (рис. 1).

Также проведен FISH-анализ непосредственно с последовательностью повтора Rep646, амплифицированной с использованием праймеров Rep646F и Rep646R. Сигналов гибридизации выявить не удалось, что, вероятно, связано с недостаточной длиной тракта для определения с помощью гибридизации стандартным протоколом *in situ* и требует применения другого протокола FISH, например с прямым мечением (Danilova et al., 2012).

Анализ структуры ВАС_029E07 и идентификация повтора Rep646

BLAST-поиск концевых последовательностей ВАС-клона 029E07 длиной 443 и 604 п.н. на референсной геномной последовательности мягкой пшеницы *T. aestivum* сорта Чайниз Спринг RefSeq v2.1 показал, что участок, соответствующий данному ВАС-клону, локализован в дистальном участке короткого плеча хромосомы 5В (координаты на псевдомолекуле 7007841...7101414 при общей длине хромосомы 714,697,677 п.н.) и имеет протяженность 93,573 п.н.

Аннотирование участка продемонстрировало, что данный район содержит кластер длиной 10,060 п.н., сформированный 16 повторяющимися единицами tandemного

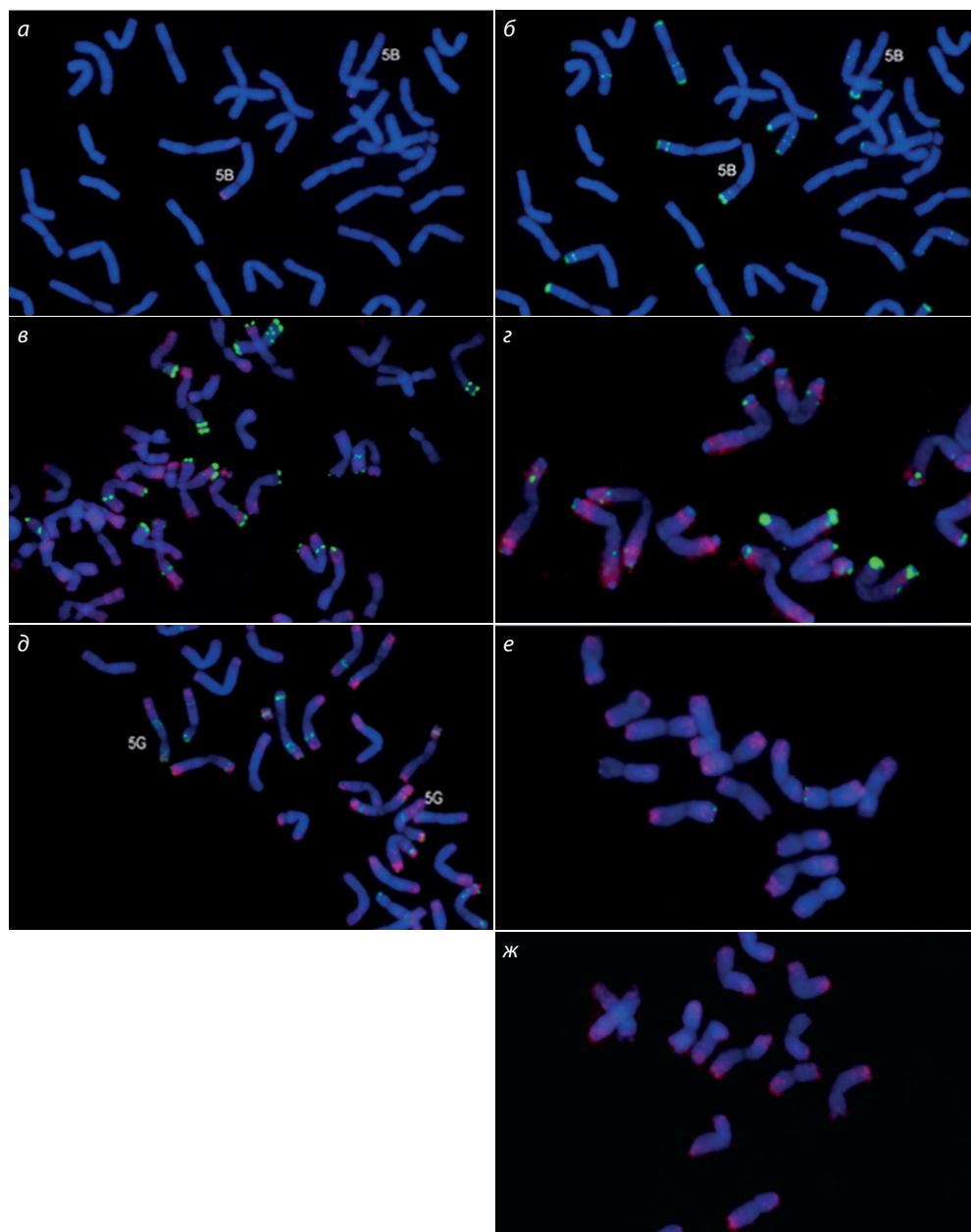


Рис. 1. FISH с зондами pSc119.2 и BAC_029E07 на митотические метафазные хромосомы видов *Triticum* и *Aegilops*: а – *T. aestivum* сорта Чайниз Спринг, BAC_029E07 (красный); б – *T. aestivum* сорта Чайниз Спринг, pSc119.2 (зеленый); в – *T. aestivum* сорта Чайниз Спринг с замещенной хромосомой 5В *T. dicoccoides*, BAC_029E07 (красный) + pSc119 (зеленый); г – *Ae. speltoides*, BAC_029E07 (красный) + pSc119.2 (зеленый); д – *T. timopheevii*, BAC_029E07 (красный) + pSc119.2 (зеленый); е – *Ae. tauschii*, BAC_029E07 (красный) + pSc119.2 (зеленый); ж – *T. urartu*

повтора с длиной мономера 646 п.н. Тандемный повтор составляет 10.8 % длины BAC-клона. Также участок, соответствующий данному BAC-клону, содержит 11.9 % ретро-транспозонов и 14.8 % ДНК-транспозонов, кроме того, 25 % BAC-клона приходится на гипотетические гены с неизвестной функцией (Приложение 2). Поиск по референсной геномной последовательности показал, что в других районах генома *T. aestivum*, а также в базах данных повторов TREP и RepBase и базе данных GenBank (NCBI) полные гомологи Rep646 отсутствовали. При этом отмечена частичная (на участке 1...134 п.н. последовательности повтора, мак-

симальная степень сходства 95 %) гомология с non_LTR-ретротранспозонами семейства Karin. Вероятно, тандемный повтор Rep646 служит частью последовательности неавтономного (неспособного к размножению) мобильного элемента Karin в составе BAC_029E07. На референсной последовательности хромосомы 5В мягкой пшеницы (RefSeq2.1) кластер мономеров повтора Rep646 имеет координаты 7057895...7066936. Согласно аннотации псевдомолекулы хромосомы 5В, данный участок обозначен как фрагментированная последовательность мобильного элемента Karin, однако уровень гомологии ограничивается 143 п.н. из 646

для каждого мономера. В базы данных повторов пшеницы запись о Rep646 не внесена, однако координаты на псевдомолекуле позволяют однозначно идентифицировать изучаемую последовательность. Среди последовательностей сородичей мягкой пшеницы повтор Rep646 найден у *Ae. speltoides* и *T. durum* в составе коротких скафолдов длиной до 1000 п.н., с уровнем гомологии последовательности повтора 99 %.

Протяженный кластер тандемных повторов Rep646 идентифицирован в дистальной части хромосомы 5B *T. dicoccoides* Завитан. Данный участок содержал 29 целых и 2 усеченные мономерные единицы. Сравнение участков референсных последовательностей геномов *T. aestivum* Чайниз Спринг и *T. dicoccoides* Завитан, содержащих тандемные повторы Rep646, показало коллинеарность и отсутствие хромосомных перестроек на участке, соответствующем BAC_029E07 у *T. aestivum* и *T. dicoccoides* (рис. 2).

ПЦР-анализ образцов поли- и диплоидных пшениц со специфичными праймерами к повтору Rep646

С целью разработки специфичных праймеров проведено множественное выравнивание 16 мономерных последовательностей Rep646 *T. aestivum* и 29 *T. dicoccoides*. К консервативным участкам подобраны специфичные праймеры Rep646F и Rep646R, позволившие амплифицировать участок тандемного повтора длиной 476 п.н. (Приложение 3). Проведен анализ 218 образцов полиплоидных пшениц и их диплоидных сородичей (см. Приложение 1). Разные образцы демонстрировали наличие либо отсутствие ожидаемого фрагмента амплификации длиной около 476 п.н. (Приложение 4). Показано, что фрагмент, соответствующий повтору Rep646, отсутствует у всех изученных образцов диплоидных пшениц (*T. monococcum*, *T. boeoticum*, *T. urartu*, *Ae. speltoides*). При этом у ряда образцов тетра- и гексаплоидных пшениц специфичный фрагмент Rep646 присутствует: у 62 из 95 сортов мягкой пшеницы *T. aestivum*, 22 из 24 *T. spelta*, 18 из 25 *T. durum*, 3 из 16 *T. dicoccoides*, 5 из 21 *T. dicocum* и у 1 из 6 *T. araraticum*. У образца мягкой пшеницы сорта Чайниз Спринг с замещенной 5B-хромосомой от *T. dicoccoides* фрагмент амплификации отсутствовал. Таким образом, с помощью ПЦР-анализа можно наблюдать вариабельность по признаку наличия/отсутствия последовательности Rep646 у разных сортообразцов и линий полиплоидных пшениц.

Обсуждение

Сателлитные повторы с длиной мономера свыше 100 п.н. (максосателлиты) часто располагаются в служебных районах хромосом (центро- и теломеры) и выступают изменчивой фракцией генома, количество последовательностей которой может варьировать у близкородственных видов или различных образцов, при этом сами последовательности мономерных единиц остаются консервативными (Bedbrook et al., 1980; Salina et al., 2006; Su et al., 2019). Молекулярным механизмом, поддерживающим постоянство их структуры, является гомогенизация, а изменение количества копий и распространение в геноме обеспечивают неравный кроссинговер, проскальзывание репликации и амплификация с помощью механизма катящегося кольца (Sharma, Raina, 2005). Показано, что в течение эволюции, а также при об-

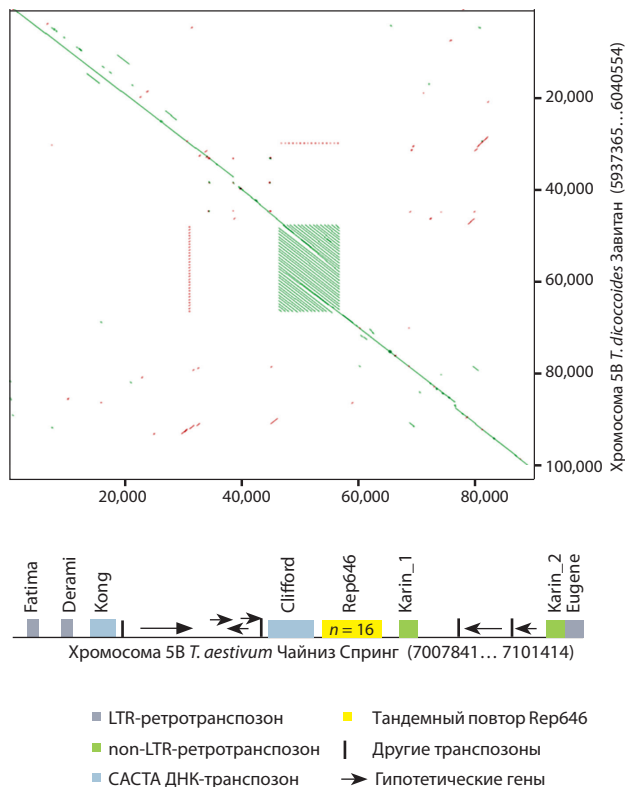


Рис. 2. Карта локального сходства участков геномов *T. aestivum* сорта Чайниз Спринг (ось x) и *T. dicoccoides* сорта Завитан (ось y), содержащих тандемный повтор Rep646

Идентичные последовательности ДНК (поиск сходства проведен при параметрах E-value = e^{-5} , диапазон длин сравниваемых последовательностей 50–40,000 п.н.) обозначены диагональной линией зеленого цвета, группа параллельных диагональных линий соответствует участку кластера тандемного повтора Rep646. Перпендикулярные зеленой красные линии обозначают инвертированные области. Указаны соответствующие координаты на псевдомолекулах хромосом 5B обоих видов. Схема организации BAC_029E07 приведена в нижней части рисунка.

разовании природных и искусственных аллополиплоидов сателлитные повторы могут элиминироваться из генома (Salina et al., 2004).

Тандемные повторы часто используют для идентификации хромосом и гибридного материала, хромосомных перестроек и эволюционных взаимоотношений между видами *Triticum* и *Aegilops* (Salina, Adonina, 2018). Так, для субтеломерного тандемного повтора Spelt1 показаны внутривидовой полиморфизм по количеству сайтов гибридизации у полиплоидных пшениц группы Emmer и уменьшение количества сайтов по сравнению с образцами группы Timopheevii и *Ae. speltoides*, что может быть обусловлено реорганизацией повторяющихся последовательностей при формировании полиплоидов и элиминацией повтора в процессе эволюции пшеницы (Зошук и др., 2009).

В качестве зондов для хромосомного FISH-анализа зачастую используют непосредственно последовательности тандемных повторов. Однако в настоящем исследовании нам не удалось локализовать на хромосомах последовательность Rep646, вероятно, из-за недостаточной

протяженности кластеров повтора (порог чувствительности FISH на хромосомах пшеницы ограничен 10 тыс. п.н.). Для хромосомного анализа применен ВАС_FISH с клоном 029E07, содержащим тракт тандемных повторов Rep646 длиной 10 тыс. п.н. (порядка 10 % длины ВАС-клона), а также 25 % гипотетических генов, что позволило выявить четкий и единственный сигнал гибридизации на хромосоме 5B *T. aestivum*. Необходимо отметить, что при гибридизации *in situ* ВАС-клоны пшеницы часто демонстрируют дисперсный сигнал на хромосомах, что обусловлено соотношением семейств мобильных элементов в составе клонов (Zhang et al., 2004). Дисперсную гибридизацию ВАС_029E07 в субтеломерных районах хромосом других видов (*T. urartu*, *Ae. tauschii*, *Ae. speltooides*, *T. timopheevii*) можно объяснить невысоким содержанием мобильных элементов в составе клона – 26 % (при их общем содержании 85 % в геноме пшеницы) – и присутствием САСТА ДНК-транспозона семейства Clifford, которое характерно для субтеломерных районов хромосом (Sergeeva et al., 2010). Вероятно, возможно использование повтора Rep646 для хромосомного FISH-анализа с применением других протоколов, например прямого мечения либо Тур-FISH (Khrustaleva, Kik, 2001; Danilova et al., 2012).

ПЦР-анализ 218 образцов поли- и диплоидных пшениц с использованием специфичных праймеров к повтору Rep646 показал наличие существенного внутривидового полиморфизма по присутствию сигнала амплификации у *T. aestivum*, *T. spelta*, *T. dicoccoides*, *T. durum*, *T. dicoccum*, *T. araraticum* и отсутствие специфичного фрагмента амплификации у диплоидов *T. monococcum*, *T. boeoticum*, *T. urartu*, *Ae. speltooides* и полиплоида *T. timopheevii*. Отсутствие сигнала у *Ae. speltooides*, предполагаемого донора генома В, можно объяснить небольшой выборкой изучаемых образцов либо тем, что в течение эволюции повтора Rep646 был элиминирован. В перспективе наблюдаемый внутривидовой полиморфизм позволяет использовать последовательность Rep646 для анализа гибридного материала пшениц.

Список литературы / References

Зошук С.А., Зошук Н.В., Амосова А.В., Дедкова О.С., Бадаева Е.Д. Исследование внутривидовой дивергенции пшениц группы Emmer методом гибридизации *in situ* с семейством тандемных повторов Spelt-1. *Генетика*. 2009;45(11):1556-1564. DOI 10.1134/S102279540911012X.
[Zoshchuk S.A., Zoshchuk N.V., Amosova A.V., Badaeva E.D., Dedkova O.S. Intraspecific divergence in wheats of the Emmer group using *in situ* hybridization with the Spelt-1 family of tandem repeats. *Russ. J. Genet.* 2009;45(11):1376-1384. DOI 10.1134/S102279540911012X]
Adonina I.G., Goncharov N.P., Badaeva E.D., Sergeeva E.M., Petrash N.V., Salina E.A. (GAA)n microsatellite as an indicator of the A genome reorganization during wheat evolution and domestication. *Comp. Cytogenet.* 2015;9(4):533-547. DOI 10.3897/CompCytogen.v9i4.5120.
Avni R., Nave M., Barad O., Baruch K., Twardziok S.O., ... Ronen G., Peleg Z., Pozniak C.J., Akhunov E.D., Distelfeld A. Wild emmer genome architecture and diversity elucidate wheat evolution and domestication. *Science*. 2017;357(6346):93-97. DOI 10.1126/science.aan0032.
Avni R., Lux T., Minz-Dub A., Millet E., Sela H., ... Stein N., Mascher M., Spannagl M., Wulff B.B.H., Sharon A. Genome sequences of three *Aegilops* species of the section Sitopsis reveal phylogenetic relationships and provide resources for wheat improvement. *Plant J.* 2022;110(1):179-192. DOI 10.1111/tpj.15664.
Bedbrook J.R., Jones J. O'Dell M., Thompson R.D., Flavell R.B. A molecular description of telomeric heterochromatin in secale species. *Cell*. 1980;19(2):545-560. DOI 10.1016/0092-8674(80)90529-2.

Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(22):10881-10890. DOI 10.1093/nar/16.22.10881.
Danilova T.V., Friebe B., Gill B.S. Single-copy gene fluorescence *in situ* hybridization and genome analysis: Acc-2 loci mark evolutionary chromosomal rearrangements in wheat. *Chromosoma*. 2012;121(6):597-611. DOI 10.1007/s00412-012-0384-7.
Dubcovsky J., Dvorak J. Ribosomal RNA multigene loci: nomads of the *Triticeae* genomes. *Genetics*. 1995;140(4):1367-1377. DOI 10.1093/genetics/140.4.1367.
Gerlach W.L., Dyer T.A. Sequence organization of the repeated units in the nucleus of wheat which contains 5S-rRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 1980;8(21):4851-4865. DOI 10.1093/nar/8.21.4851.
International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC). Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science*. 2018;361(6403):eaar7191. DOI 10.1126/science.aar7191.
Khrustaleva L.I., Kik C. Localization of single-copy T-DNA insertion in transgenic shallots (*Allium cepa*) by using ultra-sensitive FISH with tyramide signal amplification. *Plant J.* 2001;25(6):699-707. DOI 10.1046/j.1365-313x.2001.00995.x.
Kohany O., Gentles A.J., Hankus L., Jurka J. Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: RepbaseSubmitter and Censor. *BMC Bioinformatics*. 2006;7:474. DOI 10.1186/1471-2105-7-474.
Komuro S., Endo R., Shikata K., Kato A. Genomic and chromosomal distribution patterns of various repeated DNA sequences in wheat revealed by a fluorescence *in situ* hybridization procedure. *Genome*. 2013;56(3):131-137. DOI 10.1139/gen-2013-0003.
Ling H.Q., Ma B., Shi X., Liu H., Dong L., ... Zhao S., Li Z., Zhang A., Wang D., Liang C. Genome sequence of the progenitor of wheat A subgenome *Triticum urartu*. *Nature*. 2018;557(7705):424-428. DOI 10.1038/s41586-018-0108-0.
Megyeri M., Farkas A., Varga M., Kovacs G., Molnar-Lang M., Molnar I. Karyotypic analysis of *Triticum monococcum* using standard repetitive DNA probes and simple sequence repeats. *Acta Agron. Hung.* 2012;60(2):87-95. DOI 10.1556/AAgr.60.2012.2.1.
Noé L., Kucherov G. YASS: enhancing the sensitivity of DNA similarity search. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Web Server issue):W540-W543. DOI 10.1093/nar/gki478.
Plaschke J., Ganai M.W., Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 1995;91(6-7):1001-1007. DOI 10.1007/BF00223912.
Salina E.A., Numerova O.M., Ozkan H., Feldman M. Alterations in subtelomeric tandem repeats during early stages of allopolyploidy in wheat. *Genome*. 2004;47(5):860-867. DOI 10.1139/g04-044.
Salina E.A., Lim K.Y., Badaeva E.D., Shcherban A.B., Adonina I.G., Amosova A.V., Samatadze T.E., Vatolina T.Y., Zoshchuk S.A., Leitch A.R. Phylogenetic reconstruction of *Aegilops* section Sitopsis and the evolution of tandem repeats in the diploids and derived wheat polyploids. *Genome*. 2006;49(8):1023-1035. DOI 10.1139/g06-050.
Salina E.A., Adonina I.G. Cytogenetics in the study of chromosomal rearrangement during wheat evolution and breeding. In: Larramendy M., Soloneski S. (Eds.). *Cytogenetics – Past, Present and Further Perspectives*. London: IntechOpen, 2018. DOI 10.5772/intechopen.80486.
Salina E.A., Nesterov M.A., Frenkel Z., Kiseleva A.A., Timonova E.M., Magni F., Vrána J., Šafař J., Šimková H., Doležel J., Korol A., Sergeeva E.M. Features of the organization of bread wheat chromosome 5BS based on physical mapping. *BMC Genom.* 2018;19(Suppl 3):80. DOI 10.1186/s12864-018-4470-y.
Schneider A., Linc G., Molnar-Lang M. Fluorescence *in situ* hybridization polymorphism using two repetitive DNA clones in different cultivars of wheat. *Plant Breed.* 2003;122(5):396-400. DOI 10.1046/j.1439-0523.2003.00891.x.
Sharma S., Raina S.N. Organization and evolution of highly repeated satellite DNA sequences in plant chromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 2005;109(1-3):15-26. DOI 10.1159/000082377.
Sergeeva E.M., Salina E.A., Adonina I.G., Chalhoub B. Evolutionary analysis of the CACTA DNA-transposon *Caspar* across wheat species using sequence comparison and *in situ* hybridization. *Mol. Genet. Genomics*. 2010;284(1):11-23. DOI 10.1007/s00438-010-0544-5.

Su H., Liu Y., Liu C., Shi Q., Huang Y., Han F. Centromere Satellite Repeats Have Undergone Rapid Changes in Polyploid Wheat Subgenomes. *Plant Cell*. 2019;31(9):2035-2051. DOI 10.1105/tpc.19.00133.

Wang X., Hu Y., He W., Yu K., Zhang C., ..., Kong L., Ling H., Zhao S., Liu D., Zhang A. Whole-genome resequencing of the wheat A subgenome progenitor *Triticum urartu* provides insights into its demographic

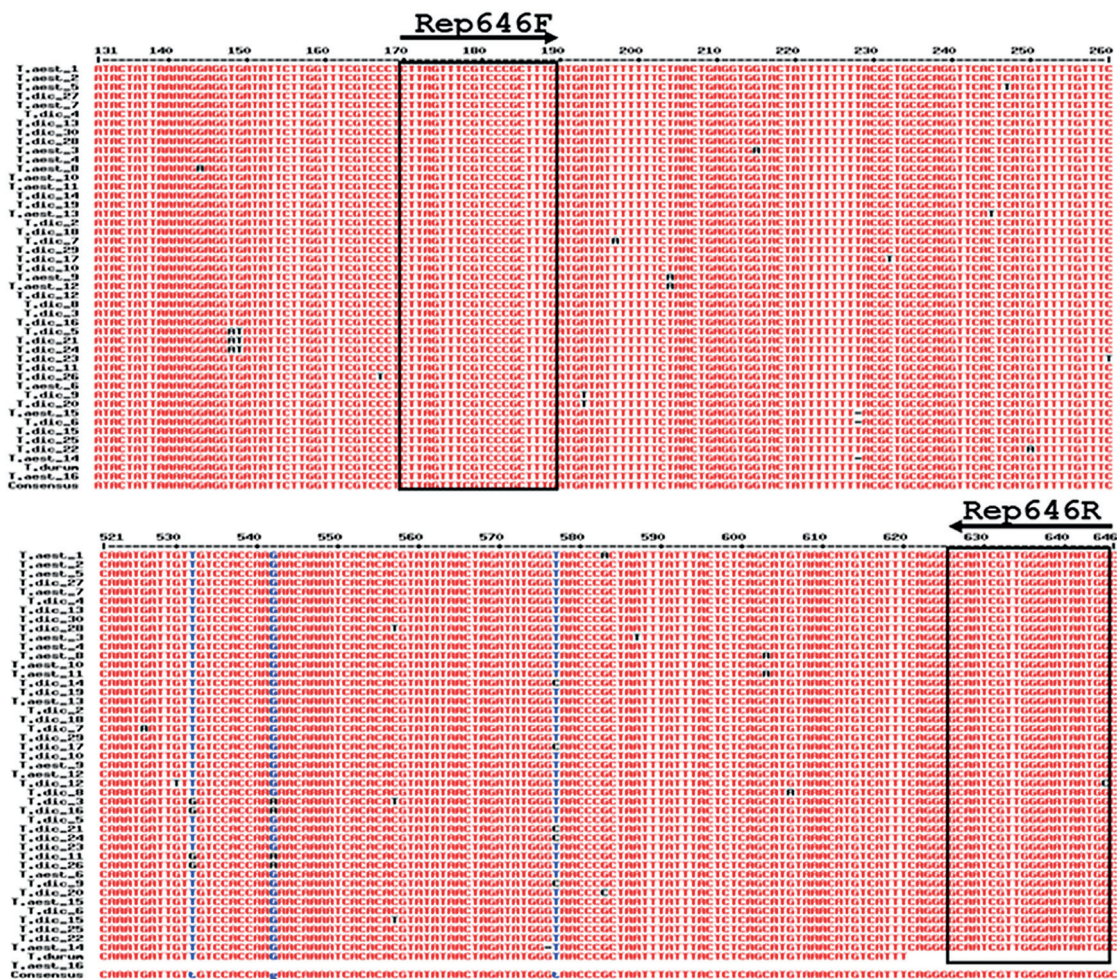
history and geographic adaptation. *Plant Commun.* 2022;100345. DOI 10.1016/j.xplc.2022.100345.

Zhang P., Li W., Fellers J., Friebe B., Gill B.S. BAC-FISH in wheat identifies chromosome landmarks consisting of different types of transposable elements. *Chromosoma*. 2004;112(6):288-299. DOI 10.1007/s00412-004-0273-9.

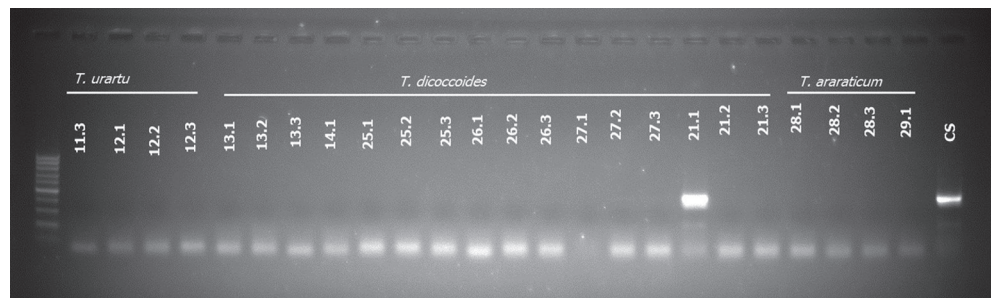
Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 21.08.2022. После доработки 25.08.2022. Принята к публикации 29.08.2022.

Приложение 1. Множественное выравнивание мономерных последовательностей повтора Rep646, выделенных из геномных последовательностей *T. aestivum* Чайниз Спринг и *T. dicoccoides* Завитан, *T. durum*, результат приведен для участков 131–260 и 521–646 п.н. Для выравнивания использовали программу MultAlin. Мономеры последовательностей *T. aestivum* обозначены как T. aest., *T. dicoccoides* – как T. dic. Нумерация мономеров отражает их порядковый номер в кластере тандемных повторов. Красным цветом отмечены консервативные позиции, голубым и черным – полиморфные. Стрелками указаны участки праймеров Rep646F и Rep646R



Приложение 2. ПЦР-анализ образцов видов *T. urartu* (11.3 – TRI 17119, 12.1, 12.2, 12.3 – TRI 17129), *T. dicoccoides* (13.1, 13.2, 13.3 – IG 113301, 14.1 – IG 131234, 25.1, 25.2, 25.3 – IG 46287, 26.1, 26.2, 26.3 – IG 117890, 27.1, 27.2, 27.3 – IG 119430, 21.1, 21.2, 21.3 – IG 139189), *T. araraticum* (28.1, 28.2, 28.3 – PI 427400, 29.1 – PI 427403), *T. aestivum* Чайниз Спринг с использованием праймеров Rep646L и Rep646R. У образцов *T. dicoccoides* 21.1 и *T. aestivum* Чайниз Спринг видно присутствие продукта амплификации длиной 476 п.н.



Приложение 3. Список ди- и полиплоидных видов пшеницы и результаты ПЦР-анализа образцов со специфичными праймерами 464L и 464R. Оценивали наличие либо отсутствие специфичного фрагмента длиной 476 п.н.

№	Вид, геномная формула	Сорт/сортообразец	Наличие/отсутствие фрагмента
1	<i>T. monococcum</i> ,	TRI 19310	-
2	$2n = 2x = 14$,	TRI 4322	-
3	A ^m A ^m	TRI 19319	-
4	<i>T. boeoticum</i> ,	TRI 17103	-
5	$2n = 2x = 14$,	TRI 17098	-
6	A ^b A ^b	TRI 17081	-
7		TRI 17135	-
8		TRI 17146	-
9	<i>T. urartu</i> ,	TRI 18411	-
10	$2n = 2x = 14$,	TRI 17118	-
11	A ^u A ^u	TRI 17119	-
12		TRI 17129	-
13		K-453	-
14		K-77	-
15		K-911	-
16		K-1597	-
17		K-1018	-
18		K-66	-
19		K-1596	-
20	<i>Ae. speltoides</i> ,	I-570060	-
21	$2n = 2x = 14$,	K-2371	-
22	SS	K-2303	-
23		K-2276	-
24		K-443	-
25		K-48	-
26		K-1593	-
27		K-1706	-
28		K-1594	-
29		IG 113301	-
30		IG 131234	-
31		IG 131232	-
32		IG 109085	-
33		127H	-
34		IG 46283	-
35	<i>T. turgidum = dicoccoides</i> ,	IG 46277	-
36	$2n = 4x = 28$,	IG 46288	-
37	AABB	k-5198	-
38		IG 139189	+
39		IG 46388	-
40		IG 46297	-
41		IG 46528	+
42		IG 46287	-
43		IG 117890	-
44		IG 119430	+
45		Алтайка	+
46		Гордеиформе 53	-
47		Салют Алтая	-
48		Ангел	-
49		Омский корунд	+
50		Омский кристалл	+
51		Омская степная	+
52		Оренбургская 10	-
53		Безенчукская 200	+
54		Памяти Чеховича	+
55	<i>T. durum</i> ,	Елизаветинская	+
56	$2n = 4x = 28$,	Николаша	+
57	AABB	Гордеиформе 553	+
58		Башкирская 27	+
59		Воронежская 9	-
60		Каргала 28	-
61		Каргала 303	+
62		Медора	+
63		Стюарт 63	+
64		Дилс	+
65		Гордеиформе 950/99	+
66		Лавина	+
67		Дамсинская юбилейная	-
68		Гордеиформе 18567-6	+
69		Гордеиформе 18585-2	+

70		K 20750	-
71		K 45544	-
72		K 21169	-
73		K 14292	-
74		K 81	-
75		K 21278	-
76		K 14236	-
77		K 81416	-
78		PI 355496	-
79	<i>T. dicocum</i> ,	PI 352367	-
80	2n = 4x = 28,	Несбитт	+
81	AABB	TRI 16880	-
82		TRI 3424	-
83		TRI 584	-
84		Ku 8028	-
85		PI 552329	+
86		TA 10480	+
87		TRI 17058	+
88		PI 355507	+
89		K 30091	-
90		PI 606325	-
91		PI 427400	+
92		PI 427403	-
93	<i>T. araraticum</i> ,	PI 654340	-
94	2n = 4x = 28,	KU-8926	-
95	AAGG	PI 654340	-
96		TRI 17417	-
97	<i>T. timopheevii</i> ,	K-29558	-
98	2n = 4x = 28,	PI 119442	-
99	GGAtA ¹	ICG	-
100		Куйбышевская 2	+
101		Лютеценс 840	+
102		Тулайковская белозерная	+
103		Тулайковская степная	-
104		Тулайковская золотистая	-
105		Тулайковская 1	-
106		Тулайковская 10	+
107		Кинельская 40	+
108		Кинельская 60	-
109		Волгоуральская	+
110		Лютеценс 80	+
111		Лютеценс 85	+
112		Лютеценс 148	-
113		Алтайский простор	-
114		Алтайская 92	-
115		Алтайская 99	-
116		Алтайская 100	-
117		Алтайская 325	+
118		Алтайская 530	-
119		Эритроспермум 72	-
120		Сибирская 12	+
121	<i>T. aestivum</i> ,	Новосибирская 15	-
122	2n = 6x = 42,	Новосибирская 20	-
123	AABBDD	Новосибирская 22	+
124		Новосибирская 29	-
125		Новосибирская 67	+
126		Новосибирская 81	-
127		Новосибирская 89	+
128		Новосибирская 91	-
129		Лютеценс 25	+
130		Лютеценс 101	+
131		Обская 14	+
132		Кантегирская 89	+
133		Александрина	+
134		Удача	-
135		Полюшко	+
136		Баганская 93	+
137		Сирена	+
138		Краса 2	+
139		Туба	-
140		Красноярская 90	+
141		Веснянка 8	+
142		Альбидум 73	+
143		Рыбинская 127	+
144		Казачка	-
145		Ангарида	+

146	Мана 2	+
147	Тулеевская	+
148	Изида	+
149	Мария	+
150	АН 34	+
151	Мариинка	+
152	Салимовка	-
153	Киевская	+
154	Ностальгия	+
155	Алешина	+
156	Дарница	+
157	Серебрина	-
158	Речка	-
159	Латона	+
160	Провинция	-
161	Бэль	+
162	Устья	+
163	Чернява 13	+
164	Златозара	+
165	Тюменская 99	+
166	Икар	+
167	Скент 1	+
168	Илинская	+
169	Туринская	+
170	Сурента 1	+
171	Сурента 4	+
172	Сурента 5	+
173	Сурента 6	+
174	Сурента 7	-
175	Диас 2	+
176	Катюша	-
177	Тарская 6	+
178	Соната	+
179	Страда Сибири	+
180	Отрада Сибири	+
181	Терция	+
182	Прииртышская 86	-
183	Росинка 2	+
184	Омская 20	-
185	Омская 23	+
186	Омская 24	+
187	Омская 26	+
188	Омская 28	-
189	Омская 29	-
190	Омская 31	-
191	Омская 32	-
192	Омская 33	-
193	Омская 34	-
194	Омская 36	-
195	15014	-
196	15016	+
197	1731	+
198	1734	+
199	19092	+
200	19097	+
201	20538	+
202	20548	+
203	20625	+
204	21439	+
205	24724	+
206	39730	+
207	44741	+
208	45365	+
209	45366	+
210	45367	+
211	45750	+
212	46020	+
213	5038	+
214	5219	+
215	53660	+
216	62501	+
217	62995	+
218	6535	-

T. spelta,
2n = 6x = 42,
AABBDD

Приложение 4. Состав ВАС-клона 029E07 (длина 93,576 п.н.). Номера гипотетических генов даны согласно аннотации RefSeq v1.0. Названия семейств мобильных элементов указаны в соответствии с классификацией повторов Triticeae, где RLG – LTR-ретротранспозоны надсемейства Gypsy, RIX – non-LTR-ретротранспозоны, DTC – ДНК-транспозоны надсемейства САСТА, DTT – ДНК-транспозоны Mariner, DTH – ДНК-транспозоны Helitron [Wicker et al., 2007]

Класс	Семейство	Длина, п.н.	Общая длина, п.н.	% последовательности ВАС-клона
Ретротранспозон	RLG_Fatima	978	11,114	11.9
	RLG_Derami	423		
	RIX_Karin	6082		
	RLG_Eugene	3631		
ДНК-транспозон	DTC_Kong	2252	13,831	14.8
	DTT_Icarus	264		
	DTM_Charon	234		
	DTC_Clifford	10,817		
	DTH_Kerberos	264		
Гены	<i>TraesCS5B01G005600</i>	9993	23,686	25.3
	<i>TraesCS5B01G007600LC</i>	2523		
	<i>TraesCS5B01G007700LC</i>	1702		
	<i>TraesCS5B01G007800LC</i>	1075		
	<i>TraesCS5B01G005700</i>	5474		
	<i>TraesCS5B01G007900LC</i>	2919		
Тандемный повтор	646 п.н.	10,063	10,063	10.8