

## СЕКВЕНИРОВАНИЕ И АННОТАЦИЯ ХЛОРОПЛАСТНОГО ГЕНОМА *Triticum militinae* – “ЕСТЕСТВЕННОГО МУТАНТА” ТЕТРАПЛОИДНОЙ ПШЕНИЦЫ *Triticum timopheevii* Zhuk.

© 2024 г. А. Р. Кулуев<sup>1</sup>, \*, Р. Т. Матниязов<sup>1</sup>, Б. Р. Кулуев<sup>1</sup>, Л. Ю. Привалов<sup>1</sup>, А. В. Чемерис<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение  
Федерального государственного бюджетного научного учреждения

Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

\*e-mail: kuluev.azat91@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.12.2023 г.

После доработки 24.01.2024 г.

Принята к публикации 30.01.2024 г.

*Triticum militinae* Zhuk. et Migusch. – тетраплоидная пшеница с геномом GAA, считается естественным голозерным мутантом *Triticum timopheevii* Zhuk. Ранее для этой пшеницы проводились эксперименты по изучению кариотипа и особенностей скрещивания. Для выяснения происхождения и родства *T. militinae* с другими представителями пшеницевых большой интерес представляет анализ ее хлоропластного генома, который оставался неизученным. Нами впервые было проведено секвенирование и аннотация полного хлоропластного генома *T. militinae*, размер которого оказался равным 135898 пн. В структуре пластома этой пшеницы имеются пара инвертированных повторов размером 21552 пн каждый, область маленькой единичной копии (SSC) – 12791 пн, и область большой единичной копии (LSC) – 80003 пн. В составе хлоропластного генома *T. militinae* аннотировано 132 структурных гена, из которых 85 белок-кодирующих, 31 ген тРНК и четыре гена рРНК.

**Ключевые слова:** пшеница, *Triticum militinae*, *Triticum timopheevii*, хлоропластный геном, секвенирование.

**DOI:** 10.31857/S0016675824080114 **EDN:** BFGXHU

Тетраплоидная пшеница *Triticum militinae* Zhuk. et Migusch. (пшеница Милитины) считается естественным мутантом тетраплоидной пшеницы *Triticum timopheevii* Zhuk. Процесс обнаружения пшеницы Милитины от момента «выщепления» в посевах *T. timopheevii* в 1950 г. некоего мутанта до опубликования в 1969 г. информации о новом виде, названном *T. militinae* Zhuk. et Migusch., занял почти два десятилетия [1]. Но происхождение этого вида оставалось загадочным, и проведя ранее научное исследование, мы пришли к заключению, что это вполне может быть некий гибрид пшениц персидской и Тимофеева [2]. Схожее предположение высказал ранее и Н.А. Наврузбеков, отметивший, что *T. militinae* обнаруживает сходство с *T. persicum* ssp. *fuliginosum* и при скрещивании последней с *T. timopheevii* в F<sub>1</sub> образовывались черные плотные колосья, похожие на таковые у пшеницы Милитины [3]. Н.А. Наврузбеков заключил, что *T. militinae* представляет собой продукт интрогрессии части генома *T. persicum* в геном и цитоплазму *T. timopheevii*, при этом посчитал ее продуктом гибридизации этих видов. Но какой из этих видов

выступил материнской формой *T. militinae* можно выяснить путем анализа последовательностей хлоропластного генома этих пшениц. Поскольку о пластомае *T. militinae* до сих пор не было никакой информации, цель настоящей работы – секвенирование и аннотация хлоропластного генома пшеницы Милитины.

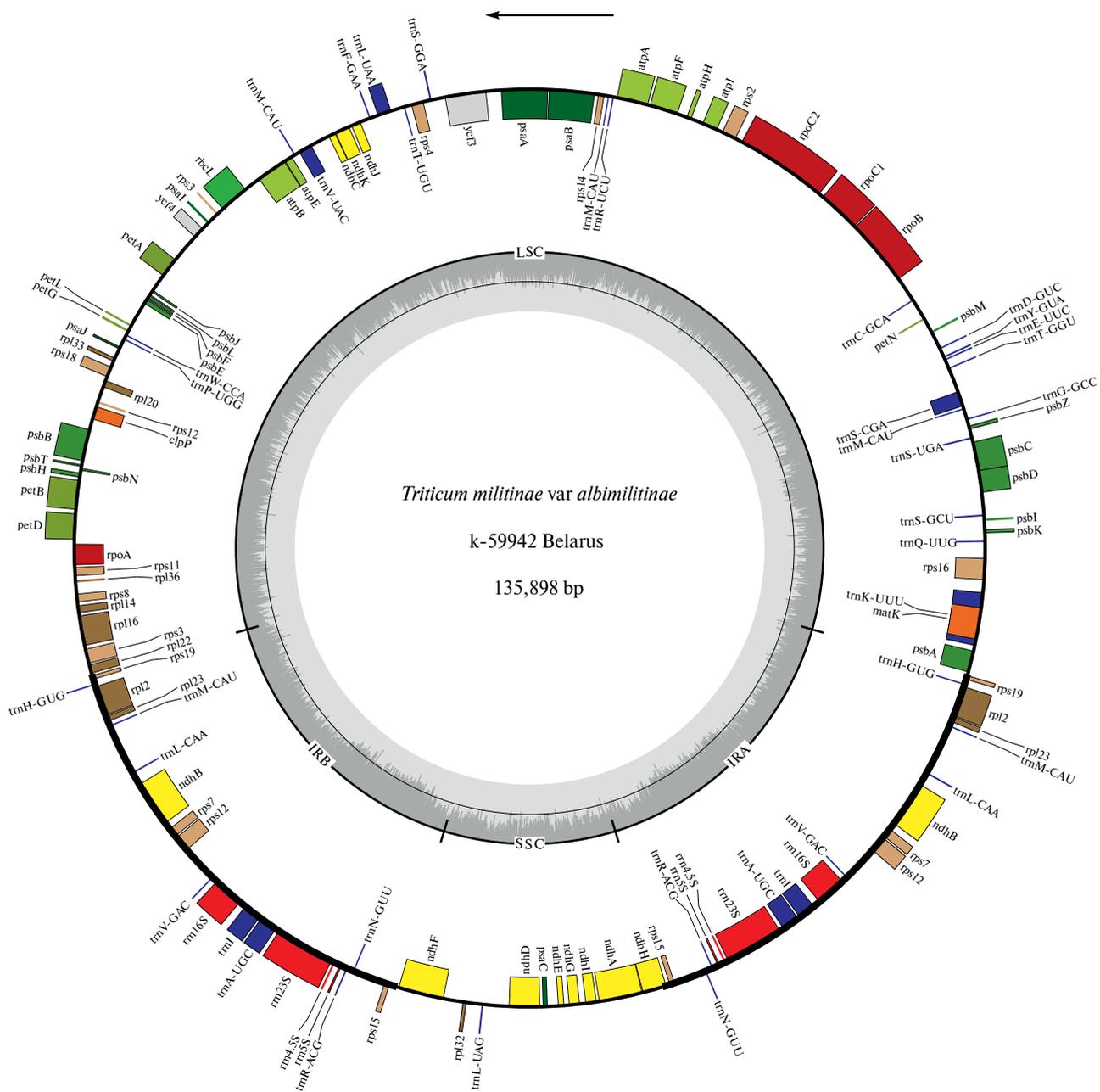
Семена *T. militinae* var. *albimilitinae* k-59942 (Белоруссия) были предоставлены Федеральным исследовательским центром Всероссийский институт генетических ресурсов растений (ВИР, Санкт-Петербург). Растения проращивались в теплице при 21 °С в течение трех недель, затем было собрано около 20 г зеленых листьев. Далее эти листья были помещены на 48 ч в холод (+4 °С) и темноту для уменьшения содержания крахмала.

Для выделения хлоропластной ДНК из листьев использовали метод сахарозного градиента [4] с некоторыми модификациями, к примеру, на этапе выделения хлоропластной ДНК из интактных хлоропластов использовали 0.15%-ный Triton X-100 к конечному объему образцов и далее применяли метод фенольно-хлороформной экстракции [5].

Гомогенизацию листьев проводили при помощи ступки и пестика в жидком азоте.

На начальном этапе секвенирования был проведен контроль качества выделенной хлоропластной ДНК. Для этого концентрация ДНК была измерена на спектрофотометре NanoDrop OneC (Thermo

Fisher Scientific, США) и проведена оценка соотношений A260/280 и A260/230. Количество ДНК определяли флуориметрическим методом с использованием набора SpectraQ BR (Raissol, Россия) и флуориметра Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific). Подготовка ДНК-библиотек проводилась методом



**Рис. 1.** Представление в виде кольца хлоропластного генома *T. militinae* var. *albimilitinae* k-59942. Визуализация пластома проведена при помощи ресурса OGDRAW. Разными цветами отображены гены, участок серого круга посередине отображает уровень GC-участков. IRA – инвертированная область повтора А, IRB – инвертированная область повтора В. Гены, расположенные за пределами внешнего круга, транскрибируются по часовой стрелке, а расположенные внутри гены – против часовой стрелки.

shotgun при помощи набора SG GM Plus (Raissol). В работу по секвенированию брали 200 нг хлоропластной ДНК. На первом этапе подготовки проводилась ферментативная фрагментация хлоропластной ДНК до размера фрагментов 350 пн с одновременным восстановлением концов. На втором этапе проводились лигирование адаптеров и очистка продукта реакции на магнитных частицах Smart beads (Raissol, Россия). На третьем этапе проводились индексная ПЦР и очистка продукта реакции на магнитных частицах Smart beads (Raissol). Контроль качества полученной ДНК-библиотеки проводили при помощи биоанализера Qsep400 (Bioptic, Тайвань). Флуориметрическое измерение концентрации ДНК-библиотеки проводили с использованием набора SpectraQ BR (Raissol) и флуориметра Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific). ДНК-библиотеки пулировали и проводили секвенирование при помощи набора FASTASeq 300 Sequencing Kit V1.0 100 M reads/flow cell на секвенаторе Genolab M (GeneMind, Китай). Режим секвенирования 2'-х 150 пн. Файлы формата base были демультимплексированы на приборе Genolab M с получением файлов с расширением fastq. В общей сложности было получено 13 млн чтений. Чистку чтений проводили при помощи программы Trimmomatic v0.22 [6]. Чтения, содержащие неопределенные нуклеотиды "N", были удалены. Сборку пластома проводили при помощи программы NOVOmap [7] с использованием последовательности хлоропластного генома *T. timopheevii* (KJ614408) в качестве референсного. Полный хлоропластный геном *T. militinae* был аннотирован при помощи ресурса Chloroplast Genome Annotation, Visualization, Analysis, and GenBank Submission 2 (CPGAVAS2) (<http://47.96.249.172:16019/analyzer/home>) [8]. Круговую карту хлоропластного генома визуализировали при помощи программы OGDRAW (<https://chlorobox.mpimp-golm.mpg.de/OGDraw.html>) [9].

Размер хлоропластного генома *T. militinae* var. *albimilitinae* составил 135898 пн. Длина области инвертированных повторов – 21552 пн, области SSC – 12791 пн, области LSC – 80003 пн. Содержание GC-пар во всем пластидном геноме *T. militinae* – 38.3%, в области SSC оно составляет 32.19%, в области LSC – 36.28%. В области IR *T. militinae* GC-содержание достигает 43.91%.

У пшеницы Милитины было аннотировано 132 структурных гена, из которых 85 белок-кодирующих, 31 ген тРНК и четыре гена рРНК. Семь генов, кодирующих белки (*rps19*, *rpl2*, *rpl23*, *ndhB*, *rps7*, *rps12*, *rps15*), восемь генов тРНК (*trnH-GUG*, *trnM-CAU*, *trnL-CAA*, *trnV-GAC*, *trnT-CGU*, *trnA-UGC*, *trnR-ACG*, *trnN-GUU*), четыре гена рРНК (*rRNA4.5*, *rRNA23*, *rRNA16* и *rRNA5*) были дублированы из-за того, что находятся в области повтора IR. При этом в SSC-области обнаружено девять белок-кодирующих генов и один ген тРНК, в LSC-области – 69

белок-кодирующих генов и 22 гена тРНК. Кроме того, из 132 генов 14 имеют по одному интрону (*trnK-UUU*, *rps16*, *trnS-CGA*, *atpF*, *trnV-UAC*, *petB*, *petD*, *rpl16*, *rpl2*, *ndhB*, *trnI-GAU*, *trnA-UGC*, *ndhA*, *trnL-UAA*) и один ген (*yef3*) – два интрона. Самый крупный интрон (2558 пн) находится в гене *trnK-UUU*, внутри которого располагается другой ген – *matK*. Также в хлоропластном геноме *T. militinae* присутствует транс-сплайсируемый ген *rps12*. Все полученные результаты представлены на рис. 1 в виде кольцевой структуры, полученной при помощи программы OGDRAW. Различные цветовые блоки отображают принадлежность генов к тем или иным функциональным группам.

Представляет большой интерес происхождение пшеницы Милитины, чаще всего она считается мутантом пшеницы Тимофеева. Но секвенирование хлоропластного генома этого вида и его сравнение с другими подобными геномами пшеницы показывает, что *T. militinae*, скорее всего, не мутант, а гибрид, чему мы уделили отдельное внимание в нашей предыдущей публикации [2]. Однако для окончательных выводов требуются еще дополнительные исследования хлоропластных геномов других пшениц, в особенности *T. persicum*. Нуклеотидная последовательность хлоропластного генома *T. militinae* была депонирована в GenBank и доступна по номеру OR936057.

Авторы выражают искреннюю признательность коллективу Отдела пшениц Всероссийского института генетических ресурсов растений (ВИР, Санкт-Петербург) за предоставление семенного материала для исследований.

Работа выполнена в рамках государственного контракта по проекту РНФ № 23-24-00275 “Филогенетические взаимоотношения отдельных видов пшенично-эгилопсного комплекса разных уровней пloidности через призму их полных хлоропластных геномов с прицелом на происхождение В- и G-субгеномов полиплоидных форм пшениц линий *turgidum*–*aestivum* и *timopheevii*–*zhukovskiy*”.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объектов животных и людей.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жуковский П.М., Мигушова Э.Ф. Наиболее высокоиммунный эндемичный генофонд для выведения устойчивых сортов пшеницы путем отдаленной гибридизации // Вестник с.-х. наук. 1969. № 2. С. 9–20.
2. Кулуев А.Р., Матниязов Р.Т., Кулуев Б.Р., Чермерис А.В. *Triticum militinae* Zhuk. et Migusch. – точно не мутант *T. timopheevii* Zhuk., как считалось

- долгие годы // *Biomics*. 2023. V. 15. № 3. P. 213–217. <https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2023-19>
3. *Наврзбеков Н.А.* К происхождению *Triticum militinae* Zhuk. et Migusch. // Ботанические и генетические ресурсы флоры Дагестана. Махачкала: Даг. фил. АН СССР, 1981. С. 121–122.
  4. *Shi C., Hu N., Huang H. et al.* An improved chloroplast DNA extraction procedure for whole plastid genome sequencing // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031468>
  5. *Graham D.E.* The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms of large tissue masses // *Anal. Biochem*. 1978. V. 78. P. 673–678.
  6. *Bolger A.M., Lohse M., Usadel B.* Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. 2014. V. 30. P. 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
  7. *Wu P., Xu C., Chen H. et al.* NOVOWrap: An automated solution for plastid genome assembly and structure standardization // *Mol. Ecol. Res.* 2021. V. 21(6). P. 2177–2186. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13410>
  8. *Shi L., Chen H., Jiang M. et al.* CPGAVAS2, an integrated plastome sequence annotator and analyzer // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. P. W65–W73. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz345>
  9. *Greiner S., Lehwark P., Bock R.* Organellar Genome DRAW (OGDRAW) version 1.3.1: expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes // *Nucl. Acids. Res.* 2019. V. 47. P. W59–W64.

## Sequencing and Annotation of the Chloroplast Genome of *Triticum militinae* – a “Natural Mutant” of Tetraploid Wheat *Triticum timopheevii* Zhuk.

A. R. Kuluev<sup>1, \*</sup>, R. T. Matniyazov<sup>1</sup>, B. R. Kuluev<sup>1</sup>, L. Yu. Privalov<sup>1</sup>, A. V. Chemeris<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Federal State Budgetary Scientific Institution of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

\*e-mail: [kuluev.azat91@yandex.ru](mailto:kuluev.azat91@yandex.ru)

*Triticum militinae* Zhuk. et Migusch. – tetraploid wheat with the GAA genome, considered a natural naked mutant of *T. timopheevii* Zhuk. Previously, experiments were conducted for this wheat to study the karyotype and crossing characteristics. To clarify its origin and relationship with other representatives of the wheat family, analysis of the chloroplast genome of *T. militinae*, which has previously remained unstudied, is of great interest. The sucrose gradient method was used to isolate chloroplast DNA from leaves. Sequencing was performed using the FASTASeq 300 Sequencing Kit V1.0 100 M reads/flow cell on a Genolab M sequencer (GeneMind, China). For the first time, we sequenced and annotated the complete chloroplast genome of *T. militinae* with a size of 135898 bp. In the structure of the plastid genome there are a pair of inverted repeats with a size of 21552 bp each, the region of a small single copy (SSC) – 12791 bp and the region of a large single copy (LSC) – 80003 bp. As part of the chloroplast genome of *T. militinae* 132 structural genes were found, of which 85 protein-coding genes, 31 tRNAs and 4 rRNA genes.

**Keywords:** wheat, *Triticum militinae*, *Triticum timopheevii*, chloroplast genome, sequencing.