

УДК 577.21

## ХАРАКТЕРИСТИКА МАЛОПОШИРЕНИХ ВИДІВ ГЕКСАПЛОЇДНОЇ ТА ТЕТРАПЛОЇДНОЇ ПШЕНИЦІ ЗА НУЛЬ-АЛЕЛЯМИ ГЕНІВ *ZCCT-1*.

Мутерко О.Ф., Балашова І.А., Сиволап Ю.М.

**Характеристика малопоширених видів гексаплоїдної та тетраплоїдної пшениці за нуль-алелями генів *ZCCT-1*.** – О.Ф. Мутерко, І.А. Балашова, Ю.М. Сиволап – Досліджувалась розповсюдженість нуль-алельних варіантів за генами *ZCCT-1* у малопоширених видів тетраплоїдної та гексаплоїдної пшениці. Методом ПЛР-аналізу проаналізовано 77 зразків п'яти видів гексаплоїдної пшениці (*T. spelta*, *T. macha*, *T. vavilovii*, *T. compactum*, *T. sphaerococcum*) та 104 зразки шести видів тетраплоїдної пшениці (*T. dicoccum*, *T. dicoccoides*, *T. turgidum*, *T. polonicum*, *T. carthlicum*, *T. durum*). Виявлені нуль-алельні варіанти за генами *ZCCT-A1*, *ZCCT-B1*, *ZCCT-D1* та подвійні мутанти. Встановлена найбільша розповсюдженість (60%) нуль-алеля за геном *ZCCT-A1* у виду *T. macha* та найбільша розповсюдженість (45%) нуль-алеля за геном *ZCCT-B1* у виду *T. polonicum*.

**Ключові слова:** пшениця, плр-аналіз, нуль-алелі, *ZCCT-1* гени, *Vrn2*.

**Адреса:** Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннізнавства та сортовивчення, відділ геноміки і біотехнології, Україна, м. Одеса, 65036, Овідіопольська дорога, 3, E-mail: muterko@gmail.com

**The characteristic of least widespread wheat species at null alleles of *ZCCT-1* genes.** – A.F. Muterko, I.A. Balashova, Yu.M. Sivolap – The distribution of null allele of *ZCCT-1* genes among least widespread hexaploid and tetraploid wheat species was investigated. It were analysed the 77 accessions of five hexaploid wheat species (*T. spelta*, *T. macha*, *T. vavilovii*, *T. compactum*, *T. sphaerococcum*) and 104 accessions of six tetraploid wheat species (*T. dicoccum*, *T. dicoccoides*, *T. turgidum*, *T. polonicum*, *T. carthlicum*, *T. durum*) by method of PCR assay. Null allelic variants at *ZCCT-A1*, *ZCCT-B1*, *ZCCT-D1* genes and double mutants have been revealed. It has been defined that maximum distribution (60%) of null allele *ZCCT-A1* gene is typical for species *T. macha* and maximum distribution (45%) of null allele *ZCCT-B1* gene is typical for species *T. polonicum*.

**Key words:** wheat, pcr-assay, null alleles, *ZCCT-1* genes, *Vrn2*.

**Address:** Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation, department of genomics and biotechnology, Ovidiopol'skaya road 3, Odessa, 65036, Ukraine, E-mail: muterko@gmail.com

### Вступ

Потреба пшениці у яровизації, що притаманна рослинам з озимим типом розвитку, визначається алельним станом генів системи *Vrn*. До складу локусу *Vrn2* входять три тандемно дупліковані гени, що є транскрипційними факторами *ZCCT*-типу (Zinc finger CCT), які утримують домен «цинкового пальця» та CCT мотив [9]. Завдяки наявності CCT домену, білки *Vrn2* здатні конкурентно взаємодіяти з іншими CCT-домену-утримуючими білками за зв'язування з НАР комплексом заміщуючи в ньому субодиночку НАР2 [4]. Утворений білковий комплекс НАР3-НАР5-*ZCCT* взаємодіє з регуляторними сайтами локусу *FT* (*Vrn3*) та пригнічує його транскрипцію [8]. В свою чергу, продукти експресії гена *FT* утворюють комплекс з білком *FLD2*, та стимулюють активність локусу *Vrn1* [5], який

безпосередньо або опосередковано пригнічує активність локусу *Vrn2* [6]. Таким чином виникає регуляторна петля із зворотнім зв'язком. Отже, наявність функціональних продуктів експресії генів *ZCCT* (домінантний алель гена *Vrn2*) обумовлює потребу пшениці у яровизації, звісно за умови рецесивності за всіма іншими *Vrn* генами. Існує дві причини, що обумовлюють виникнення рецесивних алелів генів *ZCCT*: делеція цього гена (нуль-алель) [10, 3] та мутації в екзоні-2 на ділянці, яка кодує консервативні залишки амінокислот CCT-домену [3, 9].

Враховуючи те, що локус *Vrn2* в кожному з гомеологічних геномів пшениці утримує по три гени *ZCCT*, можна припустити, що рецесивний алель *vrn2*, який обумовлює ярий тип розвитку, визначається присутністю рецесивних гомозигот за всіма дев'ятьма варіантами *ZCCT* генів у

гексаплоїдної пшениці та за шістьма *ZCCT* генами – у тетраплоїдної, окрім того, для тетраплоїдної пшениці частим явищем є дуплікація гену *ZCCT-B2* (*ZCCT-B2a* та *ZCCT-B2b* копії) [3]. Проте, дослідження молекулярної структури цих генів та продуктів їх експресії встановило, що ген *ZCCT-3* має численні мутації, та редукований екзон-1, тому продукти його експресії не функціональні або зовсім відсутні [3, 9]. Послідовність ССТ-домени білків *ZCCT* містить в трьох позиціях: 16, 35 та 39 консервативні залишки аргініну. Мутації, що виникають в цих позиціях обумовлюють послаблення міцності зв'язків білків *ZCCT* у білок-білкових взаємодіях, що спричиняє зниження їх функціональної активності [3, 9]. Встановлено, що ССТ-домени білків *ZCCT-A1* та *ZCCT-B1* у тетраплоїдної пшениці виду *T. durum* мають фіксовану мутацію R39C [3], що також часто зустрічається, як і мутація R35W, в білках *ZCCT-A1* у гексаплоїдної пшениці *T. aestivum* [7]. Білок *ZCCT-A2* у гексаплоїдної, тетраплоїдної і диплоїдної пшениці містить, в ССТ-домені, фіксовану мутацію R16C [7, 3, 9]. Білок *ZCCT-D2* у виду *T. aestivum* має фіксовану мутацію у ССТ-домені – R33Q [7], проте вплив цієї мутації на функціональну активність білку не встановлено. Таким, чином загальна кількість генів *ZCCT*, які впливають на потребу у яровизації, значно зменшується.

Генофонд малопоширених видів гексаплоїдної (геном AABBDD) та тетраплоїдної (геном AABB) пшениці широко використовується багатьма селекційними центрами в якості джерела агрономічно-цінних ознак. Окрім того, малопоширені види пшениці можуть слугувати вихідним матеріалом для пошуку нових мутантних варіантів для генетичного аналізу або селекції. Дослідження нуль-алельних варіантів генів *ZCCT-1* проводилося лише у сортів *T. aestivum* L. [10] і наразі відсутня інформація, щодо їх ідентифікації у представників малопоширених видів тетраплоїдної та гексаплоїдної пшениці. Тому метою роботи була ідентифікація та оцінка розповсюдженості нуль-алельних мутантів генів *ZCCT-1* у представників п'яти видів гексаплоїдної та шести видів тетраплоїдної пшениці.

#### Об'єкти та методи дослідження

Генетичним матеріалом дослідження слугували 77 зразків п'яти видів гексаплоїдної пшениці, серед яких: культурні півкові види: *Triticum spelta* L. (24 зразки), *Triticum macha* Dekar (10 зразків), *Triticum vavilovii* Jakubz (3 зразки), культурні голозерні види: *Triticum compactum* Host (22 зразки), *Triticum sphaerococcum* Percival (18 зразків) та 104 представника шести видів тетраплоїдної пшениці: двозернянки (культурна та дика полба): *Triticum dicoccum* Schrank (12 зразків), *Triticum dicoccoides* Körn (12 зразків), культурні голозерні види:

*Triticum turgidum* L. (25 зразків), *Triticum polonicum* L. (20 зразків), *Triticum carthlicum* Nevski (13 зразків) і вид *Triticum durum* Desf. (22 зразки), які є представниками різних еколого-географічних зон з 56-ти країн світу. Та зразок виду *Aegilops speltoides* Tausch (SS геном). Генетичний матеріал наданий Національним центром зародкової плазми рослин (National Plant Germplasm System) (США), та Національним центром генетичних ресурсів рослин України.

Геномну ДНК виділяли з 3-и денних паростків СТАВ-методом: лізис у СТАВ-буфері (3% СТАВ, 1.7М NaCl, 30mM Na<sub>3</sub>EDTA, 100mM Tris-HCl (pH8.0)), депротеїнізація хлороформом (1 об'єм), осад ДНК 96% етанолом (1,5 об'єма). ПЛР-аналіз проведено з використанням пари праймерів V2ABD-F1 (GAAAGAAATCAACGATGGATC) – V2ABD-R2 (ACTGCTAGCTAGCTCCAAGG) [10]. Реакційна суміш об'ємом 12 мкл містила: ДНК, 20 мМ Tris-HCl (pH 8,8); 10 мМ (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 2,4 мМ MgCl<sub>2</sub>; 1mM KCl; 0,1% Triton X-100; 250mkM dNTPs; 0,5 mkM кожного праймера; 1,2 ОД Таq-полімерази. Для запобігання випаровування реакційної суміші в пробірки додавали по 15 мкл парафінової олії. Для ампліфікації використовували прилад "Терцик" ("ДНК-технологія", Росія) з наступними параметрами: 94° (2хв), 30 циклів: денатурація 94° (10с), відпал 60° (15с), елонгація 74°(50с), 3 цикли: 54° (5с), 74°(40с), та фінальна елонгація 72° (3хв). Продукти ампліфікації фракціонували методом електрофорезу у 8% не денатуруючому поліакриламідному гелі в буфері ТВЕ при напрузі 15 В/см впродовж 2,5 годин. Візуалізацію продуктів ампліфікації у ПАА гелях проводили шляхом їх фарбування 0,15% AgNO<sub>3</sub> [1].

#### Результати досліджень та їх обговорення

Пара праймерів V2ABD-F1-V2ABD-R2 фланкує ділянку промотору генів *ZCCT-1*. Встановлена чітка кореляція між відсутністю певного продукту ампліфікації, за даною парою праймерів, та наявністю нуль-алеля (повної делеції) відповідного гена *ZCCT-1*, що пов'язано з високою консервативністю нуклеотидних послідовностей сайтів відпалу праймерів [10].

В результаті дослідження 77 зразків гексаплоїдної пшениці виявлено нуль-алельні варіанти за генами *ZCCT-1* у А, В та D геномах (табл.1). Нуль-алельні варіанти за геном *ZCCT-A1* детектовані з найбільшою частотою зустрічаємості у виду *T. macha* (60%). Два представника виду *T. compactum* (з Казахстану (PI 262666) та Киргизстану (PI 41023)) є подвійними мутантами за нуль-алелями генів *ZCCT-A1* та *ZCCT-D1* (рис.1). Та лише один зразок виду *T. spelta* виявився носієм нуль-алеля *ZCCT-B1*. Не ідентифіковано жодного нуль-алельного варіанта за генами *ZCCT-1* у таких видів гексаплоїдної пшениці як *T. sphaerococcum* та *T. vavilovii*.

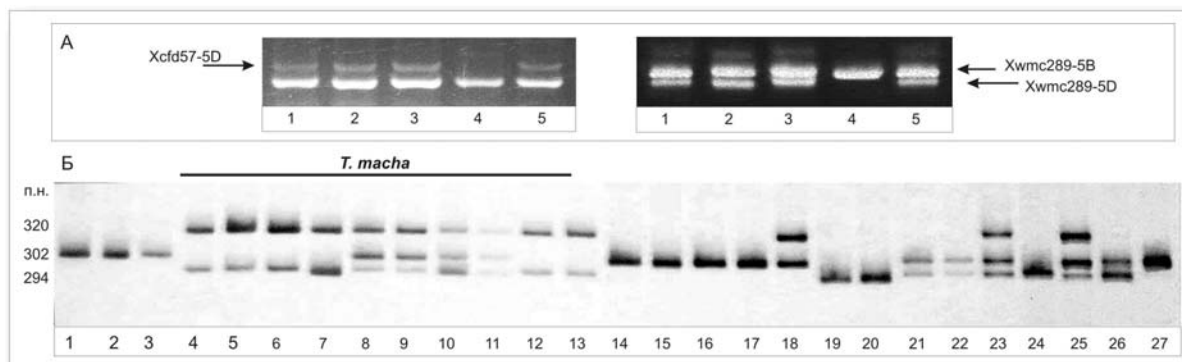


Рис.1. А. Электрофореграмма розподілу продуктів ампліфікації за мікросателітними локусами *Xwmc289-5B/5D*, *Xcf57-5D*: 1 – PI 182471, 2 – PI 585015, 3 – PI 94692, 4 – тетраплоїдна пшениця, 5 – гексаплоїдна пшениця. Б. Электрофореграмма розподілу продуктів ампліфікації ділянки промотору генів *ZCCT-1* у гексаплоїдної та тетраплоїдної пшениці. Нуль-алельні варіанти за геном *ZCCT-A1*: 4-7, 12, 13; *ZCCT-B1*: 1-3, 14-18, 27; *ZCCT-A1*, *ZCCT-D1*: 19, 20. *Ae. speltoides* – 24. Інтектні за промотором *ZCCT-1* генів зразки тетраплоїдної пшениці: 21, 22, 26; гексаплоїдні: 8-11. *T. carthlicum* (PI 182471) – 23, *T. durum* (PI 94692) – 26.

Fig.1. A. DNA band patterns for amplicons of microsatellites *Xwmc289-5B/5D*, *Xcf57-5D*: 1 – PI 182471, 2 – PI 585015, 3 – PI 94692, 4 – tetraploid wheat, 5 – hexaploid wheat. B. DNA band patterns for amplicons of promoter area *ZCCT-1* genes from hexaploid and tetraploid wheat species. Null allele *ZCCT-A1*: 4-7, 12, 13; *ZCCT-B1*: 1-3, 14-18, 27; *ZCCT-A1*, *ZCCT-D1*: 19, 20. *Ae. speltoides* – 24. Intact promoter *ZCCT-1* genes in tetraploid wheat: 21, 22, 26; hexaploid wheat: 8-11. *T. carthlicum* (PI 182471) – 23, *T. durum* (PI 94692) – 26.

Табл.1. Нуль-алельні варіанти за генами *ZCCT-1* у видів гексаплоїдної та тетраплоїдної пшениці.

Table.1. The null *ZCCT-1* alleles of hexaploid and tetraploid wheat species

Нуль алель	Зразки
<i>ZCCT-A1</i>	<i>T. spelta</i> (PI 168680, PI 295056), <i>T. macha</i> (PI 272554, PI 352466, PI 355511, PI 355514, PI 542466, PI 572905), <i>T. compactum</i> (PI 262666, PI 41023)
<i>ZCCT-B1</i>	<i>T. spelta</i> (PI 520066), <i>T. carthlicum</i> (PI 168672), <i>T. durum</i> (PI 94578), <i>T. turgidum</i> (Citr 14445, PI 213571), <i>T. polonicum</i> (PI 134945, PI 167622, PI 185309, PI 208911, PI 223171, PI 254214, PI 272564, PI 384265, UA0300219)
<i>ZCCT-D1</i>	<i>T. compactum</i> (PI 262666, PI 41023)

Серед 104-х зразків п'яти видів тетраплоїдної пшениці, що підлягали аналізу, не ідентифіковано жодного нуль-алельного мутанта за геном *ZCCT-A1*. Нуль-алелі за геном *ZCCT-B1* найбільш поширені у виду *T. polonicum* (45%). У пшениці видів *T. dicoccum* та *T. dicoccoides* не виявлено жодного нуль-алельного варіанта за генами *ZCCT-I*. Також, під час дослідження представників тетраплоїдної пшениці у зразків: *T. carthlicum* (PI 182471), *T. polonicum* (PI 585015) та *T. durum* (PI 94692) спостерігали присутність продуктів ампліфікації довжиною у 320 п.н., які маркують ген *ZCCT-D1*. Наявність D геному у цих зразках підтверджували ПЛР-аналізом за мікросателітними локусами, що специфічні для D геному (*Xwmc289-5B/5D*, *Xcf57-5D*) (рис.1). Проте не має можливості встановити на якому саме етапі сівозміну чи сортування насіння відбулася помилка.

Кількість функціональних генів *ZCCT-1* має дозовий вплив на темп розвитку та згідно моделі епістатичної взаємодії з іншими *Vrn* генами може впливати на морозостійкість, тривалість яровизації, тощо. Наразі, не виявлено жодних представників м'якої пшениці ярий генотип яких був би обумовлений рецесивною гомозиготою за всіма генами *ZCCT*, цей факт разом з нестачею джерела природних мутантів значно сповільнює дослідження локусу *Vnr2* у гексаплоїдної пшениці. Встановлені нуль-алельні варіанти можуть бути використані в якості генетичного джерела мутантів у дослідженні впливу окремих *ZCCT-1* генів на якісні та кількісні показники агрономічно-цінних ознак.

## Висновки

Досліджено 77 зразків п'яти видів гексаплоїдної та 104 зразка шести видів тетраплоїдної пшениці за нуль-алельними варіантами генів *ZCCT-1*. Виявлені нуль-алельні варіанти за генами *ZCCT-A1*, *ZCCT-B1* та *ZCCT-D1* серед 13 зразків гексаплоїдної пшениці, та

нуль-алелі за генами *ZCCT-A1*, *ZCCT-B1* у 13 зразків тетраплоїдної пшениці. Оцінено розповсюдженість нуль-алельних мутантів за генами *ZCCT-1* з А, В та D геному у певних представників видів тетраплоїдної та гексаплоїдної пшениці.

1. Budowle B., Chakraborty R., Giusti A.M., Eisenberg A.J., Allen R.C. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE // *Am J Hum Genet.* – 1991. – Vol. 48(1). – P. 137-144.
2. Diallo A., Kane N., Agharbaoui Z., Badawi M., Sarhan F. Heterologous expression of wheat VERNALIZATION 2 (TaVRN2) gene in *Arabidopsis* delays flowering and enhances freezing tolerance // *PLoS One.* – 2010. – Vol. 5(1). – P. 11.
3. Distelfeld A., Tranquilli G., Li C., Yan L., Dubcovsky J. Genetic and molecular characterization of the VRN2 loci in tetraploid wheat // *Plant Physiology.* – 2009. – Vol. 149. – P. 245–257.
4. Li C., Distelfeld A., Comis A., Dubcovsky J. Wheat flowering repressor VRN2 and promoter CO2 compete for interactions with NUCLEAR FACTOR-Y complexes // *Plant.* – 2011. – Vol. 67(5). – P. 763-73.
5. Li C., Dubcovsky J. Wheat FT protein regulates VRN1 transcription through interactions with FDL2 // *Plant.* – 2008. – Vol. 55. – P. 543-554.
6. Loukoianov A., Yan L., Blechl A., Sanchez A., Dubcovsky J. Regulation of VRN1 vernalization genes in normal and transgenic polyploid wheat // *Plant Physiol.* – 2005. – Vol. 138. – P. 2364-2373.
7. Ma Li Juan, Wang Xiang, Wei Li, Feng Ya lan, Ren Jiang ping, Yin Jun Sequences analysis of the vernalization gene VRN2 in different development characteristic common wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Journal of Triticeae Crops.* – 2012. – Vol.32(4). – P. 603–609.
8. Wenkel S., Turck F., Singer K., Gissot L., José Le Gourrierec, Samach A., Coupland G. CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis* // *The Plant Cell.* – 2006. – Vol. 18. – P. 2971–2984.
9. Yan L., Loukoianov A., Blechl A., Tranquilli G., Ramakrishna W., SanMiguel P., Bennetzen J.L., Echenique V., Dubcovsky J. The wheat VRN2 gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization // *Science.* – 2004. – Vol. 303(5664). – P.1640-1644.
10. Zhu X., Tan C., Cao S., Yan L. Molecular differentiation of null alleles at *ZCCT-1* genes on the A, B, and D genomes of hexaploid wheat // *Molecular Breeding.* – 2011. – Vol. 27(4). – P. 501-510.

Отримано: 11 березня 2013 р.

Прийнято до друку: 12 листопада 2013 р.