

УДК 577.21 581.14 633.11

АКСЕНТЬЕВА О.А., ШУЛИК В.В., ЖМУРКО В.В.

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина,  
Украина, 61022, г. Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: avksentyeva@rambler.ruАЛЛЕЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНОВ *VRN* И ТЕМПЫ РАЗВИТИЯ  
ИЗОГЕННЫХ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Переход растений пшеницы от вегетативного развития к генеративному является важнейшим этапом онтогенеза, детерминирующим многие хозяйственно ценные признаки. Ключевыми в этом процессе являются гены *VRN* (vernalization response) и *PPD* (photoperiod response), определяющие реакцию пшеницы на яровизацию и длину дня, а также гены *VRD*, которые определяют продолжительность яровизационного периода и комплекс генов *EPS-earliness per se* (скороспелость как таковая) [1–3]. Эти гены, влияя на скорость развития растений [4], определяют также ряд других хозяйственно ценных признаков: структуру урожая, морозо- и зимостойкость, устойчивость к заболеваниям [5]. Роль этих генетических систем в контроле перехода растений пшеницы от вегетативного к генеративному развитию неодинакова. Большинство исследователей считает, что главной среди данных генетических систем является система генов *VRN* (три-пять локусов), которая влияет на сроки перехода к колошению и, соответственно, на общую продолжительность вегетационного периода [6–8]. Реакция на яровизацию у пшеницы контролируется, по меньшей мере, пятью генами. Три основных гена *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1*, локализованы соответственно в хромосомах 5A, 5B и 5D. Озимый тип развития растений проявляется только в том случае, если эти три основных гена рецессивные. При этом присутствие только одного доминантного гена *Vrn-A1* обеспечивает полную нечувствительность растений к яровизации, доминантные гены *Vrn-B1* и *Vrn-D1* лишь частично снижают потребность в ней. Гены *VRN* активно исследуются на молекулярно-генетическом уровне, они клонированы и в последние годы для пшеницы описано несколько их аллельных вариантов [9, 10]. Показано, что гены *Vrn-A1a* и *Vrn-B1a* являются транскрипционными факторами [8]. Ген *Vrn-A1* кодирует MADS-box транскрипционный фактор, локус *Vrn-B1* содержит два tandemно дублированных гена, коди-

рующих подавляющий цветение фактор *ZCCT*, а *Vrn-D1* кодирует белок, схожий с ингибиторами Raf-киназ [9]. Изучение молекулярно-генетических механизмов функционирования *VRN* генов проводилось преимущественно на моделях сортов или замещенных линий пшеницы яровой, несущих один из генов *VRN* в доминантном или рецессивном состоянии [11, 12]. Однако для более глубокого понимания закономерностей проявления фенотипических эффектов важно изучение аллельных вариантов всех трех главных генов, совмещенных в одном генотипе (генофоне), как целостной системы генетического контроля развития пшеницы мягкой. Для этой цели наиболее адекватными моделями могут служить моногеннодоминантные почти изогенные линии, которые несут в определенном сочетании (доминантное/рецессивное) все три главных гена *VRN*.

Целью данной работы было проведение молекулярно-биологического анализа аллельных вариантов генов *VRN* у почти изогенных по этим генам линий двух сортов мягкой пшеницы и выявление их роли в детерминации темпов развития растений.

## Материалы и методы

В работе использованы почти изогенные (NILs) моногеннодоминантные линии ярового типа развития, созданные в генофонах озимых сортов Мироновская 808 (М 808) и Ольвия. Линии различаются по состоянию (доминантное/рецессивное) аллелей всех трех генов *VRN* [1, 3].

ДНК выделяли из 5-ти зерновок с использованием набора реактивов «Diatom Prep 100» (Изоген, Россия) по методике производителя (метод сорбции). Для изучения аллельного состояния генов использовали аллель специфические праймеры в соответствии с данными Grain Gene Mass Wheat (табл. 1). ПЦР проводили по стандартным условиям для данных праймеров (табл. 2). Распределение продуктов ПЦР осуше-

Таблица 1

## Праймеры для идентификации различных аллелей генов у гексаплоидной пшеницы (Grain Gene Mass Wheat)

Локус	Аллель	Праймер	Последовательность	Размер продукта (п.н.)
VRN- A1	Vrn-A1a	VRN AF VRN-INT1R	GAAAGGAAAAATTCTGCTCG GCAGGAAATCGAAATCGAAG	965 + 876
	Vrn-A1b			714
	Vrn-A1c			734
	vrn-A1			734
	Vrn-A1a	VRN AF VRN1R	GAA AGGAAAAATTCTGCTCG TGCACCTTCCCCGCCCAT	750 + 650
	Vrn-A1b			480
	vrn-A1			500
Vrn-A1c		500		
VRN- A1	Vrn-A1c	Intr1/A/F2 Intr1/A/R3	AGCCTCCACGGTTTGAAAGTAA AAGTAAGACAACACGAATGTGAGA	1170
VRN- A1	vrn-A1	Intr1/ C/F Intr1/ AB/R	GCACTCCTAACCCACTAACC TCATCCATCATCAAGGCAA	1068
VRN- B1	Vrn-B1	Intr1/B/F Intr /B/R3	CAAGTGGAACGGTTAGGACA CTCATGCCAAAAATTGAAGATGA	709
VRN- B1	vrn-B1	Intr1/B/F Intr /B/R4	CAAGTGGAACGGTTAGGACA CAAATGAAAAGGAATGAGAGCA	1149
VRN- D1	Vrn-D1	Intr1/D/F Intr1/D /R3	GTTGTCTGCCTCATCAAATCC GGTCACTGGTGGTCTGTGC	1671
VRN- D1	vrn-D1	Intr1/D/F Intr1/D/ R4	GTTGTCTGCCTCATCAAATCC AAATGAAAAGGAACGAGAGCG	997

Таблица 2

## Условия проведения ПЦР с аллель-специфичными праймерами

Праймеры	Условия ПЦР					
	начальная денатурация, t° (мин)	число циклов	денатурация, t° (с)	отжиг, t° (с)	элонгация, t° (с)	финальная элонгация, t° (мин)
VRN AF // VRN-INT1R	94 (10)	38	94 (45)	55 (45)	72 (60)	72 (5)
VRN AF // VRN1R	94 (7)	40	95 (30)	60 (30)	72 (60)	72 (10)
Intr1/C/F // Intr1/AB/R	94 (7)	38	94 (30)	57 (30)	72 (45)	72 (7)
Intr1/A/F2 // Intr1/A/R3	94 (7)	38	94 (30)	60 (30)	72 (45)	72 (7)
Intr1/B/F // Intr/B/R3 // Intr/B/R4	94 (10)	44 (Touch-down)	94 (45)	58-63 (45)	72 (69)	72 (10)
Intr1/D/F // Intr/D/R3// Intr/D/R4	94 (10)	44 (Touch-down)	94 (45)	63-65 (45)	72 (90)	72 (10)

ствляли путем электрофореза в течение 90–120 минут в 1 % и 2 % агарозном геле.

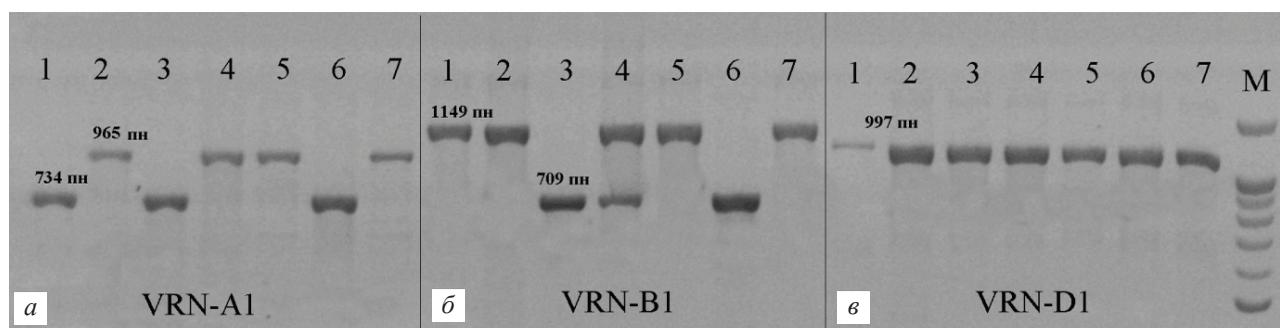
Определение продолжительности периода всходы – колошение (ПВК) исследовали в полевых условиях на экспериментальном участке кафедры физиологии и биохимии растений и микроорганизмов ХНУ имени В.Н. Каразина и в условиях вегетационного опыта в течении 2013–2014 годов.

## Результаты и обсуждение

Результаты определения ПВК в полевом и вегетационном опыте показали существенные различия по этому признаку между линиями обоих сортов, которые различаются по комбинации доминантных и рецессивных локусов генов *VRN* (табл. 3). Между собой изолинии по темпам развития можно разделить на контрастные группы – быстроразвивающиеся и переходящие к ко-

Продолжительность периода всходы – колошение (ПВК) у изогенных по генам *VRN* линий пшеницы при выращивании в условиях вегетационного и полевого экспериментов (2013–2014 гг.)

Сорт	Изолиния	ПВК, сутки в опыте	
		вегетационном	полевым
М 808	Vrn 1	89 ± 2	57 ± 1
	Vrn 2	99 ± 3	75 ± 2
	Vrn 3	72 ± 2	51 ± 1
Ольвия	Vrn 1	68 ± 1	47 ± 1
	Vrn 2	89 ± 3	61 ± 2
	Vrn 3	76 ± 2	50 ± 1



**Рис. 1.** Выявление доминантных *Vrn-A1a*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1* и рецессивных *vrn-A1*, *vrn-B1*, *vrn-D1* аллелей у изогенных линий пшеницы сортов Мироновская 808 и Ольвия (1 – сорт М 808, 2 – изолиния Vrn 1, 3 – изолиния Vrn 2, 4 – изолиния Vrn 3; изолинии сорта Ольвия 5 – Vrn 1, 6 – Vrn 2, 7 – Vrn 3)

лошению через 47–57 суток (линии Vrn1 и Vrn 3) и медленно развивающиеся, которые колосятся через 61–73 суток от появления всходов (Vrn2). Эти данные позволяют предположить, что темпы развития пшеницы мягкой детерминируются не доминантным состоянием отдельного гена, а взаимодействием рецессивных и доминантных аллелей генов *VRN*.

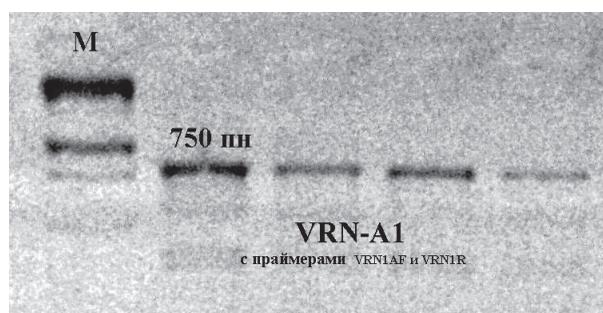
Аллели локуса *VRN-A1* изучали с использованием VRN AF и VRN-INT1R праймеров. Ожидаемый размер амплификационного фрагмента с использованием этих праймеров для самого распространенного доминантного аллеля *Vrn-A1a* – 965 и 876 п.н., для рецессивного аллеля *vrn-A1* составляет 734 п.н. Среди проанализированных генотипов рецессивный аллель *vrn-A1* обнаружен у сорта Мироновская 808 и изолиний Vrn 2 сортов М 808 и Ольвия (рис. 1 а). Остальные изолинии (Vrn 1 и Vrn 3) обоих сортов несут доминантный аллель *Vrn-A1a*.

Анализ локуса *VRN-B1* показал наличие доминантных аллелей *Vrn-B1* (709 п.н.) у изолиний Vrn 2 сортов М 808 и Ольвия, выявленных при использовании праймеров Intr1/BF и Intr/B/R3. У остальных исследованных генотипов обнаружен рецессивный аллель *vrn-B1* с использо-

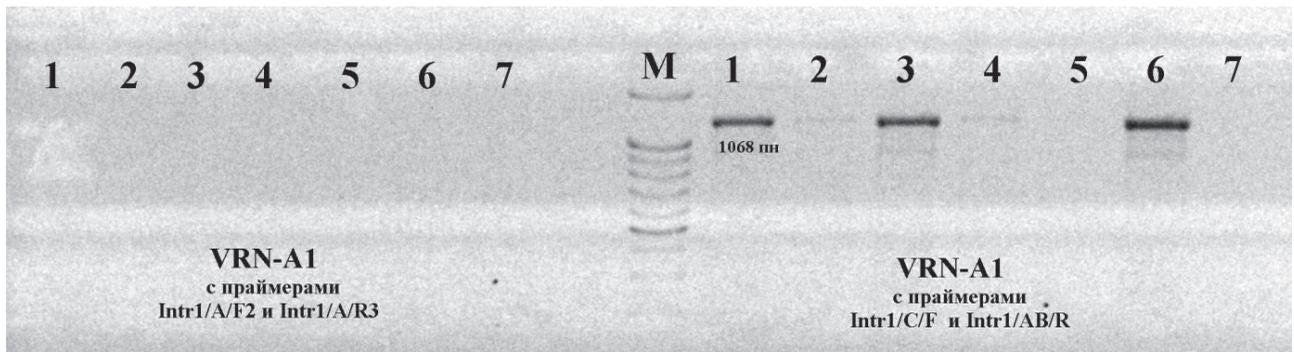
ванием праймеров Intr1/B/F и Intr/B/R4 и длиной амплификационного фрагмента 1149 п.н. соответственно (рис. 1 б).

Аллельный анализ локуса *Vrn-D1* показал присутствие только рецессивного аллеля *vrn-D1* (997 п.н.) при использовании праймеров Intr1/D/F и Intr1/D/R4 у всех исследуемых генотипов обоих сортов (рис. 1 в).

В работах многих исследователей показано, что у яровых сортов пшеницы, произрастающих в Европе, практически отсутствует аллель



**Рис. 2.** Выявление доминантных *Vrn-A1a* аллелей у изогенных линий пшеницы сорта Мироновская 808 (1 – изолиния Vrn 1, 2 – изолиния Vrn 3) и сорта Ольвия (3 – изолиния Vrn 1, 4 – изолиния Vrn 3)



**Рис. 3.** Выявление аллелей *Vrn-A1c* и *vrn-A1* у изогенных линий пшеницы сортов Мироновская 808 и Ольвия (1 – сорт М 808, 2 – изолиния Vrn 1, 3 – изолиния Vrn 2, 4 – изолиния Vrn 3; изолинии сорта Ольвия 5 – Vrn 1, 6 – Vrn 2, 7 – Vrn 3)

*Vrn-D1* [4, 10, 12]. Исследованные изогенные линии созданы в генотипе озимых сортов, но представляют собой формы с яровым типом развития. Наши исследования также подтверждают выявленную закономерность – отсутствие доминантного аллеля *Vrn-D1* у изолиний мягкой пшеницы с яровым типом развития.

Поскольку ген *Vrn-A1* является основным в детерминации потребности или нечувствительности к яровизации [6, 8], то для исследования его аллельного состояния используют значительное количество праймеров (табл. 1). Анализ аллельного состояния гена *Vrn-A1* с использованием праймеров VRN AF и VRN1R у изогенных линий сорта Мироновская 808 показал присутствие доминантного аллеля *Vrn-A1a* (750 п.н.) у всех изучаемых генотипов (рис. 2). При этом аллели *Vrn-A1b*, *vrn-A1*, *Vrn-A1c* не были обнаружены (рис. 2).

Использование праймеров VRN AF и VRN-INT1R позволяет выявить различия аллеля *vrn-A1* от аллелей *Vrn-A1a* и *Vrn-A1b*, но не улавливает различий между *vrn-A1* и *Vrn-A1c* – образуется амплификационный фрагмент длиной 734 п.н., который может соответствовать *vrn-A1* и *Vrn-A1c* (табл. 1). В дальнейших исследованиях мы использовали праймеры Intr1/A/F2 и Intr1/A/R3, а также Intr1/C/F и Intr1/AB/R (рис. 3). В ходе проведенных анализов обнаружен рецессивный аллель *vrn-A1* у сорта М 808 и изолиний Vrn 2 обоих сортов (рис. 3).

### Выводы

Независимо от аллельных вариантов генов *VRN* все изолинии, созданные в генофоне сорта Мироновская 808, развивались медленнее, чем изолинии сорта Ольвия (табл. 3). Вероят-

но, это связано с рецессивным состоянием всех генов *PPD* у сорта Мироновская 808, что определяет его более высокую фотопериодическую чувствительность, чем сорта Ольвия, у которого доминантен ген *PPD-D1*. Вместе с тем, линии Vrn 1 и Vrn 3 обоих сортов переходили к колошению раньше, чем линия Vrn 2. Это свидетельствует о ведущей роли генов *VRN* в детерминации темпов развития пшеницы мягкой. Однако не исключено, что в ней гены *VRN* взаимодействуют с генами *PPD* генофона сорта, в котором созданы изолинии. У быстроразвивающихся изолиний показано наличие в генотипе доминантного аллеля *Vrn-A1a*, выявленного с помощью двух пар праймеров VRN AF VRN-INT1R и VRN AF VRN1R (продукт амплификации 965 п.н. и 750 п.н. соответственно), и рецессивных аллелей *vrn-B1* и *vrn-D1* при использовании праймеров Intr1/B/F Intr1/B/R4 (1149 п.н.) и Intr1/D/F Intr1/D/R4 (997 п.н.). У изолиний, развивающихся медленными темпами, в генотипе присутствует доминантный аллель *Vrn-B1* – праймеры Intr1/B/F и Intr1/B/R3 (709 п.н.).

Результаты позволяют предполагать, что детерминация темпов развития пшеницы мягкой генами *VRN* осуществляется путем взаимодействия их аллелей.

Авторы благодарны д.б.н. В.И. Файту заведующему отделом генетики Селекционно-генетического института – Национального центра семеноведения и сортоизучения НААН Украины за предоставленные для исследования изогенные по *VRN* линии пшеницы.

Авторы выражают благодарность ООО «АГРОГЕН» г. Харьков за помощь в проведении молекулярно-генетических исследований.

Работа выполнена в рамках госбюджетной темы «Исследование физиолого-биохимических

и молекулярно-биологических механизмов генетического контроля развития и продукционно-го процесса сельскохозяйственных культур» (номер государственной регистрации № 0112U000101) по приори-

тетному тематическому направлению «Фундаментальные проблемы наук о жизни и развитие биотехнологий» согласно постановлению КМУ № 942 от 7.09.2011.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Stelmakh A.F. Genetic Systems regulating flowering response in wheat // *Euphytica*. – 1998. – 100. – P. 359–369.
2. Cockram J., Jones H., Leigh F., O'Sullivan D., Powell W., Laurie D., Greenland A. Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication and sustainable productivity // *J. Exp. Botany*. – 2007. – 58, N 6. – P. 1231–1244.
3. Файт В.И. Идентифікація і ефекти алелів генів темпів розвитку пшениці: Автореф. дис. ... докт. біол. наук. – Одеса, 2009. – 39 с.
4. Потокина Е.К., Кошкин В.А., Матвиенко И.И., Филобок В.А., Беспалова Л.А. Комбинация аллелей генов *ppd* и *vrn* определяет сроки колошения у сортов мягкой пшеницы // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2012. – 16, № 1. – С. 77–86.
5. Khotyl'jov L., Kaminskaya L., Koren L. Influence of genetic systems of *Vrn*- and *Ppd* genes on the ecological adaptation of wheat and triticale // *Pradzia. LEIDINIAL. Biologija*. – 2002. – N 4. – P. 45–48.
6. Distelfeld A., Tranquilli G., Li C., Yan L., Dubcovsky J. FOCUS ISSUE ON THE GRASSES: Genetic and Molecular Characterization of the *VRN2* Loci in Tetraploid Wheat // *Plant Physiol*. – 2009. – 149. – P. 245–257.
7. Dubcovsky J., Loukoianov A., Fu D., Valarik M., Sanchez A., Yan L. Effect of photoperiod on the regulation of wheat vernalization genes *VRN1* and *VRN2* // *Plant. Mol. Biol.* – 2006. – 60. – P. 469–480.
8. Trevaskis B. The central role of the *VERNALIZATION1* gene in the vernalization response of cereals // *Funct. Plant Biol.* – 2010. – 37. – P. 479–487.
9. Степаненко И.Л., Смирнова О.Г., Титов И.И. Модель генной регуляции времени цветения у озимой пшеницы и ячменя // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2012. – 16, № 1. – С. 99–106.
10. Беспалова Л.А., Кошкин В.А., Потокина Е.К. Фотопериодическая чувствительность и молекулярное маркирование генов *Ppd* и *Vrn* в связи с селекцией сортов пшеницы альтернативного образа жизни // *Докл. РАСХН*. – 2010. – № 6. – С. 3–6.
11. Жмурко В.В. Особенности проявления эффектов генов PPD на темпы развития сортов и гибридов озимой пшеницы // *Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. пр. / Під ред. В.А. Кунаха [та ін.]*. – К.: Логос, 2010. – 8. – С. 38–42.
12. Лихенко И.Е., Стасюк А.И., Щербань А.Б., Зырянова А.Ф., Лихенко Н.И., Салина Е.А. Изучение аллельного состава генов *Vrn-1* и *Ppd-1* у раннеспелых и среднеспелых сортов яровой мягкой пшеницы Сибири // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2014. – 18, № 4/1. – С. 691–703.

AVKSENTYEVA O.A., SHULIK V.V., ZHMURKO V.V.

*V.N. Karazin Kharkiv National University,*

*Ukraine, 61022, Kharkiv, Svobody sq., 4, e-mail: avksentyeva@rambler.ru*

#### GENES *VRN* ALLELIC VARIANTS AND PACES OF DEVELOPMENT IN SOFT WHEAT ISOGENIC LINES

**Aims.** The molecular biological analysis of *VRN* genes allelic variants of soft wheat near-isogenic lines and its role in the determination of plant paces development were investigated. **Methods.** In cultivars Myronovskaya 808 and Olvia isogenic by genes *VRN* of the paces development control the speed of the transition to earing was determined in the field and pot experiment. The allelic variants of *VRN* genes were identified by PCR using allele specific primers (Grain Gene Mass Wheat). **Results.** Both varieties VRN1 and VRN3 isogenic lines passed to earing on 11–25 days earlier than the VRN2 isogenic line. In fast-growing isogenic lines the genotype of two dominant alleles of genes *Vrn-A1a* (965 bp and 750 bp) and recessive alleles *vrn-B1* (1149 bp) and *vrn-D1* (997 bp) were identified. Dominant allele *Vrn-B1* (709 bp) and recessive allele *vrn-A1* (1068 bp) were detected in slow-growing isogenic lines genotype. However, dominant allele *Vrn-D1* wasn't identified. **Conclusion.** The studied lines differ in speed of transition to earing depending on the allelic variants of *VRN* genes. Apparently, the soft wheat paces of development are determined in the interaction of *VRN* genes which is determined by the allelic state.

**Keywords:** *Triticum aestivum* L., genes *VRN*, NILs, PCR markers, allelic state, paces of development.