

УДК 575.1/2; 581.4; 633/635:58

¹А.К.Амирова*, ¹К. Касымхан,
²К.К. Баймагамбетова, ¹Н.К. Бишимбаева

¹Институт биологии и биотехнологии растений,
Республика Казахстан, г. Алматы

²Казахский НИИ земледелия и растениеводства,
Республика Казахстан, пос. Алмалыбак, Алматинская обл.

*E-mail: aigul_amir@mail.ru

Использование аллель-специфичных маркеров генов Ppd и Vrn для анализа скороспелых соматоклональных линий пшеницы

Проведен молекулярно-биологический анализ исходных сортов и соматоклональных линий пшеницы, отличающихся ранними сроками созревания, на присутствие комбинации аллелей генов Ppd (Photoperiod) и Vrn (Vernalization), ответственных за реакцию растения на фотопериод и яровизацию, определяющих сроки колошения, контролирующих рост и фазы развития мягкой пшеницы. Установлено, что скороспелые линии R9 поколения с. Отан отличаются от исходного сорта наличием аллеля гена Vrn-A1a и отсутствием аллеля гена Vrn-B1. Показана идентичность между исходным сортом и линией Целинная 3С скороспелая неполегающая по доминантному аллелю гена Vrn-A1a и различия по доминантному аллелю гена Vrn-B1. Так, у линии Целинная 3С скороспелая неполегающая выявлен доминантный аллель гена Vrn-B1, отсутствующий у исходного сорта.

Ключевые слова: соматоклональные линии, пшеница, гены Ppd и Vrn, скороспелость.

A.K. Amirova, K. Kasymkhan, K.K. Baymagambetova, N.K. Bishimbayeva

Using allele-specific markers of genes Ppd and Vrn for the analysis of precocity wheat somaclonal lines

A molecular biological analysis of wheat precocity somaclonal lines and initial cultivars to the presence of a combination of gene alleles Ppd (Photoperiod) and Vrn (Vernalization), responsible for reaction of plants to photoperiod and vernalization, indicating the terms of earing that control growth and development phase of soft wheat. Differ the precocity lines cv. Otan of R9 generation from the initial cultivar by the presence of allele gene Vrn-A1a and absence of allele gene Vrn-B1 was established. Identity between the initial variety and Cselinnaya 3S not dumped precocity line by dominant allele gene Vrn-A1a and difference by the dominant allele gene Vrn-B1 were show. Thus, in Cselinnaya 3S not dumped precocity line the dominant allele gene Vrn-B1 was revealed, which is absent in the initial cultivar.

Key words: somaclonal lines, wheat, Ppd and Vrn genes, precocity.

А.К. Амирова, К. Касымхан, К.К. Баймагамбетова, Н.К. Бишимбаева

Ppd және Vrn гендеріне арналған аллелдік маркерлер пайдалану арқылы бидайдың тез пісетін соматоклонды линияларын талдау

Бидайдың бастапқы сорттардың және тез пісетін мерзімі бойышша ерекшеленген соматоклонды линиялардың өсімдіктің урту масақтануын мен өсу-даму қадамдарын белгілейтін фотопериодқа яровизацияға әсерін бағытатын Ppd (Photoperiod) және Vrn (Vernalization) гендер аллелінің комбинациясын анықтау үшін молекулалық-биологиялық талдау жүргізілді. Отан сортының R9 ұрпағының тез пісетінің линияларының бастапқы сорттан Vrn-A1a аллелді генінің болуымен және Vrn-B1 аллелді генінің жоқ болуымен ерекшеленеді. Целинная 3С сортының бастапқы және жығылмайтын тез пісетін линиялары арасында Vrn-A1a аллелді гені және доминантты Vrn-B1 гені бойынша сәйкестік анықталды. Целинная 3С сортының жығылмайтын тез пісетін линиясында бастапқы сортта жоқ доминантты Vrn-B1 гені анықталды.

Түйін сөздер: соматоклонды линиялар, бидай, Ppd және Vrn гендері, тез пісіп жетілу.

Введение

Одними из ключевых генов, определяющих сроки колошения у сортов мягкой пшеницы являются аллели генов Ppd (Photoperiod response) и Vrn (Vernalization response), отвечающие за реакцию растений на длину дня и яровизацию. Известно, что комбинация аллелей генов Ppd и Vrn определяет скорость развития растений (сроки колошения и созревания), структуру урожая, морозо- и зимостойкость, потребность в яровизации, засухоустойчивость, потребность в яровизации, «уход» от высоких летних температур, устойчивость к болезням [1, 2, 3].

Среди двух генов Ppd-D1 и Ppd-B1 в качестве ключевого локуса рассматривается ген Ppd-D1, локализованный в хромосоме 2D, и влияющий на фотопериодическую чувствительность гексаплоидных пшениц [4]. Ген относится к семейству генов PRR (Pseudo Response Regulator) – регуляторов суточных ритмов [5], доминантный аллель которого обеспечивает нейтральную реакцию на фотопериод и отличается от рецессивного аллеля делецией размером 2089 п.н. [4].

Сроки колошения пшеницы зависят не только от присутствия аллелей гена Ppd-D1, но и от аллелей генов Vrn, определяющих потребность в яровизации. Реакция на яровизацию у пшеницы контролируется по меньшей мере пятью генами Vrn [6, 7, 8], из которых три основных, Vrn-A1, Vrn-B1 и Vrn-D1, локализованы в хромосомах 5A, 5B и 5D, соответственно. Озимый тип развития растений проявляется в том случае, если три основных гена представлены рецессивными аллелями гена Vrn, а яровые культуры содержат доминантные аллели одного или более из этих генов. Так, присутствие же только одного доминантного аллеля гена Vrn-A1 обеспечивает полную нечувствительность растения к яровизации, а наличие доминантных аллелей генов Vrn-B1 и Vrn-D1 лишь частично снижают потребность в ней [9, 10]. В этой связи, представляло интерес охарактеризовать исходные сорта и полученные нами соматоклональные линии на присутствие аллелей генов Ppd и Vrn при помощи известных аллель-специфичных праймеров к этим генам и выявить возможное генетическое разнообразие, детерминирующие появление раннезрелых линий.

Материалы и методы

Объектами исследования служили ранее полученные в лаборатории клеточной биологии

ИББР соматоклональные линии сортов Целинная 3С и Отан характеризующиеся ранними сроками созревания и комплексом ценных признаков.

Молекулярное тестирование соматоклональных линий и их исходных сортов на наличие аллелей генов Ppd (Photoperiod response) и Vrn (Vernalization response), детерминирующих основные хозяйственно-ценные признаки – такие как реакция растений на длину дня и яровизацию, проводили с использованием аллель-специфичных праймеров к этим генам, опубликованных в литературе [2, 11].

Для выявления аллелей генов Ppd использовали праймеры Ppd1_F ACGCCTCCCACTA-CACTG и Ppd1_R GTTGGTTCAAACAGAGAGC.

Для выявления аллелей генов Vrn использовали праймеры:

доминантного аллеля гена Vrn-A1 – VRN1AF GAAAGGAAAAATT-CTGCTCG и VRN1-IN-T1R GCAGGAAATCGAAATCGAAG.

доминантного аллеля гена Vrn-B1 Intr1/B/F CAAGTGGAAACGGTTAG-GACA и Intr1/B/R3 CTCATGCCAAAAATTGAAGATGA.

доминантного гена Vrn-D1 – Intr1/D/F GTT-GTCTGCCTCATCAAATCC и Intr1/D/R3 GGT-CACTGGTGGTCTGTGC.

Рецессивный аллель гена:

vrn-B1 – Intr1/B/F CAAGTGGAAACGGTTAG-GACA и Intr1/B/R4 CAAATGA-AAAGGAAT-GAGAGCA.

vrn-D1 – Intr1/D/F GTTGTCTGC-CTCAT-CAAATCC и Intr1/D/R4 AAATGAAAAGGAAC-GAGAGCG.

Условия ПЦР анализа с использованием праймеров для генов Ppd и Vrn:

для гена Ppd-D1: 94°C – 5 мин, 93°C – 30 сек, 54°C – 30 сек, 72°C – 2 мин, 72°C – 10 мин (35 циклов);

для аллеля гена Vrn A1: 94°C – 4 мин, 94°C – 1 мин, 56°C – 1 мин, 72°C – 1,2 мин, 72°C – 7 мин (40 циклов);

для аллеля гена Vrn B1: 94°C – 5 мин, 94°C – 30 сек, 58°C – 30 сек, 72°C – 2 мин, 72°C – 10 мин (35 циклов);

для аллеля гена Vrn D1: 94°C – 5 мин, 94°C – 30 сек, 54°C – 30 сек, 72°C – 2 мин, 72°C – 10 мин (35 циклов);

Для молекулярно-генетического анализа геномную ДНК выделяли из 3-х дневных этиолированных проростков соматоклональных вариантов пшеницы согласно СТАБ-методу. Качество выделенной геномной ДНК определяли спект-

рофотометрически по отношению экстинкций D260/D280 и методом электрофореза [12]. Электрофорез на качество геномной ДНК и выявления продуктов ПЦР проводили в 1,0% и 1,5% агарозном геле с добавлением этидиум бромид, соответственно. ПЦР-анализ проводили на амплификаторе «Eppendorf personal». Электрофоретические гели анализировали при помощи гель-документирующей системы «BioRad».

Результаты и их обсуждение

Молекулярное тестирование соматоклональных линий R9 поколения и исходных форм с использованием аллель-специфичных праймеров

к аллелям генов Ppd не выявило различий между соматоклональными линиями и соответствующими исходными сортами (Целинная ЗС и Отан) и показало наличие у всех исследуемых генотипов ПЦР продукта размером 414 п.н., соответствующее аллелю гена Ppd-D1b (рисунок 1). Фрагмент ампликона размером 288 п.н. при этой комбинации праймеров отсутствовал у всех изученных генотипов, что свидетельствовало об отсутствии аллеля гена Ppd-D1a.

Так как сроки колошения пшениц зависят от присутствия комбинации аллелей генов Ppd и Vrn, нами проведен ПЦР анализ исходных сортов и соматоклональных линий на наличие трех основных генов Vrn-A1, Vrn-B1 и Vrn-D1, определяющих потребность растений в яровизации.

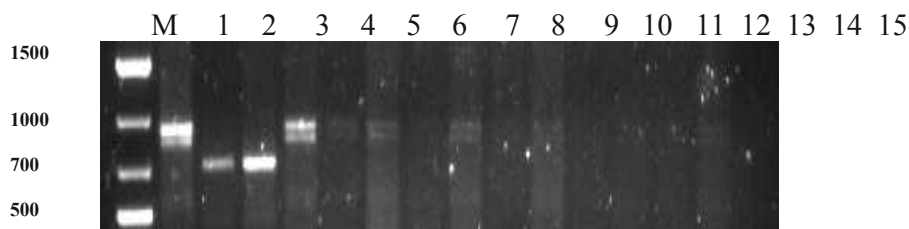


Обозначения: М – маркер молекулярной массы (GeneRuler 1kb DNA Ladder); 1, 2, 3 – сорт Отан; 4, 5 – красносезерная линия Отан; 6, 7 – выровненная линия Отан; 8, 9, 10 – сорт Целинная ЗС; 11, 12 – раннеспелая линия Целинная ЗС; 13, 14 – скороспелая неполегающая линия Целинная ЗС; 15 – контроль (H₂O).

Рисунок 1 – Амплифицированные фрагменты ДНК с использованием аллель-специфичных праймеров к гену Ppd-D1b (414 п.н.) у исходных сортов (1-3, 8-10) и соматоклональных линий пшеницы (4-7, 11-14).

ПЦР анализ на наличие доминантного аллеля гена Vrn-A1 показал, что у исходного сорта Отан выявлена неоднородность по аллелям гена Vrn-

A1, что указывает на существование двух биотипов: содержащие только аллель Vrn-A1и включающие только аллель Vrn-A1b (рисунок 2).



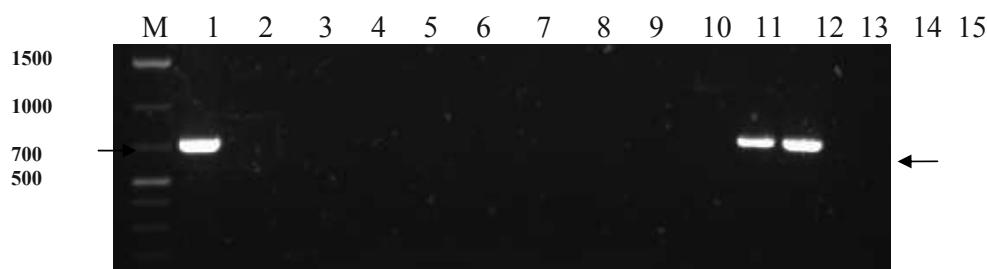
Обозначения: М – маркер молекулярной массы (GeneRuler 1kb DNA Ladder); 1, 2, 3 – сорт Отан; 4, 5 – красносезерная линия Отан; 6, 7 – выровненная линия Отан; 8, 9, 10 – сорт Целинная ЗС; 11, 12 – раннеспелая линия Целинная ЗС; 13, 14 – скороспелая неполегающая линия Целинная ЗС; 15 – контроль (H₂O).

Рисунок 2 – Амплифицированные фрагменты ДНК с использованием аллель-специфичных праймеров к доминантным генам Vrn-A1a и Vrn-A1b (965+876; 714 п.н.) и рецессивному гену vrn-A1 (734 п.н.) у исходных сортов (1-3, 8-10) и соматоклональных линий пшеницы (4-7, 11-14).

Соматоклональные линии сорта Отан содежали только доминантный аллель гена Vrn-A1a. Сорт Целинная 3С и скороспелая неполегающая линия сорта Целинная 3С содержали аллель Vrn-A1a.

В результате амплификации ДНК соматоклональных линий и исходных сортов на наличие

доминантного аллеля гена Vrn-B1 выявлено, что искомый ампликон размером 709 п.н. содержится у первой линии – Целинная 3С скороспелая неполегающая и отсутствует у исходного сорта Целинная 3С и второй линии Целинная 3С раннеспелая (рисунок 3).



Обозначения: М – маркер молекулярной массы (GeneRuler 1kb DNA Ladder); 1, 2, 3 – сорт Отан; 4, 5 – красnozерная линия Отан; 6, 7 – выровненная линия Отан; 8, 9, 10 – сорт Целинная 3С; 11, 12 – раннеспелая линия Целинная 3С; 13, 14 – скороспелая неполегающая линия Целинная 3С; 15 – контроль (H₂O).

Рисунок 3 – Амплифицированные фрагменты ДНК с использованием аллель-специфичных праймеров к доминантному гену Vrn-B1 (709 п.н.) у исходных сортов (1-3, 8-10) и соматоклональных линий пшеницы (4-7, 11-14).

У сорта Отан выявлено два биотипа: содержащие и не содержащие доминантный аллель гена Vrn-B1, в то время как у двух соматоклональных линий Отан искомый ампликон не обнаружен (рисунок 3).

Так, выявлена генетическая изменчивость по аллелю гена Vrn-B1 между исходным сортом Целинная 3С и линией неполегающая скороспелая Целинная 3С, а также неоднородность исходного сорта Отан. Рецессивный аллель гена vrn-B1 размером ампликон 1149 п.н. у исходных сортов и соматоклональных линий не выявлен (данные не представлены).

Обнаружено, что у всех анализируемых сортов и их соматоклональных линий отсутствует доминантный аллель гена Vrn-D1 (данные не представлены), присутствует рецессивный аллель гена vrn-D1 (рисунок 4).

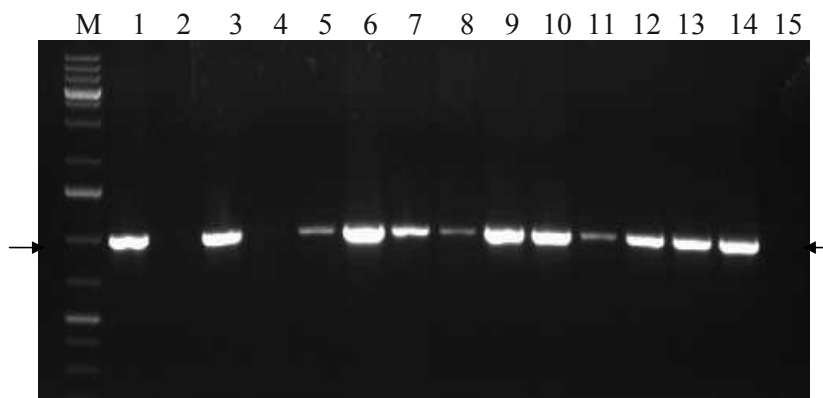
Таким образом, идентифицировано существование двух биотипов сорта Отан: биотип, содержащий два доминантных аллеля генов Vrn-A1a и Vrn-B1, и биотип, содержащий один

доминантный аллель гена Vrn-A1b. Соматоклональные линии сорта Отан отличаются от исходного сорта наличием аллеля гена Vrn-A1a и отсутствием аллеля гена Vrn-B1.

Выявлена идентичность между исходным сортом Целинная 3С и скороспелой неполегающей линией сорта Целинная 3С по доминантному аллелю гена Vrn-A1a и различия по доминантному аллелю гена Vrn-B1.

Так, у линии скороспелая неполегающая Целинная 3С выявлен доминантный аллель гена Vrn-B1, отсутствующий у исходного сорта Целинная 3С. Данная линия отличается от исходного сорта Целинная 3С ранними сроками колошения и созревания.

В целом, молекулярно-генетические исследования показывают, что некоторые изменения, отмеченные у растений-регенерантов по сравнению с исходными сортами носят генетический характер. Изменения растений-регенерантов, вызванные культивированием тканей *in vitro*, основаны на мутационных изменениях в генах.



Обозначения: М – маркер молекулярной массы (GeneRuler 1kb DNA Ladder); 1, 2, 3 – сорт Отан; 4, 5 – красносозерная линия Отан; 6, 7 – выровненная линия Отан; 8, 9, 10 – сорт Целинная ЗС; 11, 12 – раннеспелая линия Целинная ЗС; 13, 14 – скороспелая неполегающая линия Целинная ЗС; 15 – контроль (H₂O).

Рисунок 4 – Амплифицированные фрагменты ДНК с использованием аллель-специфичных праймеров к рецессивному гену *vrn-D1* (997п.н.) у исходных сортов (1-3, 8-10) и соматональных линий пшеницы (4-7, 11-14).

Литература

- 1 Стельмах А.Ф., Авсенин В.И., Кучеров В.А., Воронин А.И. Изучение роли генетических систем Vrn и Ppd у мягкой пшеницы // Вопросы генетики и селекции зерновых культур. КОЦ СЭВ. Одесса (СССР). НИИР Прага-Рузыне (ЧССР). – 1987. – Вып. 3. – С. 125-132.
- 2 Потокина Е.К., Кошкин В.А., Алексеева Е.А., И.И. 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. – Т.16. – №1. – С. 77-86.
- 3 Мережко А.Ф., Кошкин В.А., Матвиенко И.И. Исходный материал для создания серии почти изогенных линий мягкой пшеницы с различной фотопериодической чувствительностью // Генетика. – 1997. –Т. 33. –№4. – С. 384-393.
- 4 Beales J., Turner A., Griffiths S. et al. Apseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive Ppd-D1a mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. – 2007. – Vol. 115. – № 5. –P. 721-733.
- 5 Turner A., Beales J., Faure S. et al. The pseudo response regulator Ppd-H1 provides adaptation to photoperiod in barley // Sci. 2005. – Vol. 310. – P. 1031-1033.
- 6 Goncharov N.P. Genetics of growth habit (spring vs winter) in common wheat: confirmation of the existence of dominant gene Vrn4 // Theor. Appl. Genet. – 2003. –Vol. 107. –P. 768-772.
- 7 Yan L., Fu D., Li C. et al. The wheat and barley vernalization gene VRN3 is an orthologue of FT // Proc. Natl Acad. Sci.USA. – 2006. – Vol. 103. – P. 19581-19586.
- 8 Yoshida T., Nishida H., Zhu J. et al. Vrn-D4 is a vernalization gene located on the centromeric region of chromosome 5D in hexaploid wheat // Theor. Appl. Genet. – 2010. – Vol. 120. – P. 543-552.
- 9 Pugsley A.T. A genetic analysis of the spring-winter habit of growth in wheat // Aust. J. Agr. Res. – 1971. – Vol. 22. – P. 21-23.
- 10 Pugsley A.T. Additional genes inhibiting winter habit in wheat // Euphytica. – 1972. – Vol. 21. – P. 547-552.
- 11 Herndl M., White J.W., Hunt L.A., Graeff S., Claupein W. Field-based evaluation of vernalization requirement, photoperiod response and earliness per se in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // Field Crops Research. – 2008. – Vol. 105. – №3. – P. 193-201.
- 12 Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярная биология. – Москва: «Мир», 1984. – 479 с.

References

- 1 Стельмах А.Ф., Авсенин В.И., Кучеров В.А., Воронин А.И. Изучение роли генетических систем Vrn и Ppd у мягкой пшеницы // Вопросы генетики и селекции зерновых культур. КОЦ СЭВ. Одесса (СССР). НИИР Прага-Рузыне (ЧССР). – 1987. – Вып. 3. – С. 125-132.
- 2 Потокина Е.К., Кошкин В.А., Алексеева Е.А., И.И. 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. – Т.16. – №1. – С. 77-86.
- 3 Мережко А.Ф., Кошкин В.А., Матвиенко И.И. Исходный материал для создания серии почти изогенных линий мягкой пшеницы с различной фотопериодической чувствительностью // Генетика. – 1997. –Т. 33. –№4. – С. 384-393.
- 4 Beales J., Turner A., Griffiths S. et al. Apseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive Ppd-D1a

- mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. – 2007. – Vol. 115. – № 5. – P. 721-733.
- 5 Turner A., Beales J., Faure S. et al. The pseudo response regulator Ppd-H1 provides adaptation to photoperiod in barley // Sci. 2005. – Vol. 310. – P. 1031-1033.
 - 6 Goncharov N.P. Genetics of growth habit (spring vs winter) in common wheat: confirmation of the existence of dominant gene Vrn4 // Theor. Appl. Genet. – 2003. – Vol. 107. – P. 768-772.
 - 7 Yan L., Fu D., Li C. et al. The wheat and barley vernalization gene VRN3 is an orthologue of FT // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol. 103. – P. 19581-19586.
 - 8 Yoshida T., Nishida H., Zhu J. et al. Vrn-D4 is a vernalization gene located on the centromeric region of chromosome 5D in hexaploid wheat // Theor. Appl. Genet. – 2010. – Vol. 120. – P. 543-552.
 - 9 Pugsley A.T. A genetic analysis of the spring-winter habit of growth in wheat // Aust. J. Agr. Res. – 1971. – Vol. 22. – P. 21-23.
 - 10 Pugsley A.T. Additional genes inhibiting winter habit in wheat // Euphytica. – 1972. – Vol. 21. – P. 547-552.
 - 11 Herndl M., White J.W., Hunt L.A., Graeff S., Claupein W. Field-based evaluation of vernalization requirement, photoperiod response and earliness per se in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // Field Crops Research. – 2008. – Vol. 105. – №3. – P. 193-201.
 - 12 Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярная биология. – Москва: «Мир», 1984. – 479 с.