

И.А. БАЛАШОВА<sup>1</sup>, В.И. ФАЙТ<sup>2</sup>,  
Е.К. ЗАВИША<sup>1</sup>, Ю.М. СИВОЛАП<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН и МОН  
Украины, Одесса, Овидиопольская дор. 3,  
e-mail: genom2005@.ukr.net

<sup>2</sup> Селекционно-генетический институт – Национальный центр  
семеноведения и сортоизучения УААН, Украина,  
Одесса, Овидиопольская дор. 3,  
e-mail: fayt@paco.net

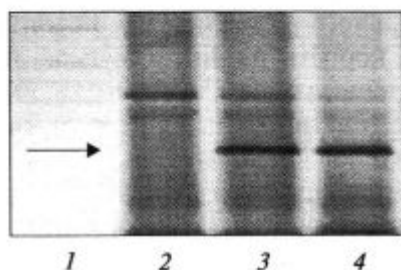
## МАРКИРОВАНИЕ ГЕНА *Vrd1* ОЗИМОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ



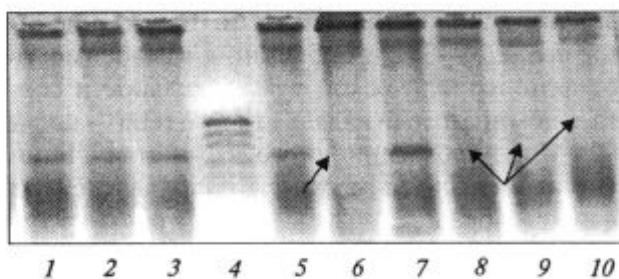
ПЦР с направленными праймерами использовали для получения ДНК-маркеров к генам *Vrd*, в частности *Vrd1*. ПЦР-анализ проводили на ДНК почти изогенных по *Vrd* генам линий сортов Мироновская 808 и Эритроспермум 604. Показано, что у генотипов, моногенно доминантных по *Vrd*, отсутствует продукт амплификации в области 280 п.н. в сравнении с ДНК генотипов, рецессивных по *vrd* и моногенно доминантных по *Vrd2*. Сцепление маркера с геном *Vrd1* установлено при проведении анализа ДНК растений популяции  $F_2$ , полученной от скрещивания сортов Эритроспермум 604 (рецессив по *vrd*)  $\times$  Triple Dirk C (*Vrd1vrd2*). Расстояние между маркером и геном составляет 4.6 сМ. Маркер обозначен как нуль-аллель 280(-). Использование данного ДНК-маркера позволяет с высокой степенью вероятности отбирать на ранних этапах селекционного процесса генотипы, моногенно доминантные по *Vrd*, а также идентифицировать сорта и линии озимой пшеницы с короткой яровизационной потребностью.

© И.А. БАЛАШОВА, В.И. ФАЙТ, Е.К. ЗАВИША,  
Ю.М. СИВОЛАП, 2006

**Введение.** Продуктивность возделываемых сортов во многом зависит от особенностей индивидуального развития озимой мягкой пшеницы. Скорость развития мягкой пшеницы обусловлена уровнем экспрессии генов нескольких генетических систем, в частности, системы генов *Vrd* (*Vernalization requirement duration*), контролирующей различия по продолжительности яровизации [1, 2]. У озимой пшеницы выявлены значительные сортовые количественные различия (от 20 до 60 сут) по продолжительности воздействия низкими положительными температурами, необходимыми для последующего перехода к генеративному развитию [3, 4]. Выявлены два гена, определяющих различия по продолжительности яровизации *Vrd1* и *Vrd2* [5]. Доминантный аллель гена *Vrd1* обуславливает колошение растений озимой пшеницы после 20–35 сут яровизации в зависимости от фотопериодической чувствительности сорта, а доминантный аллель второго гена — после 40–45 сут яровизационного воздействия. Генотипам — носителям рецессивных аллелей *vrd* для перехода к генеративной фазе роста требуется не менее 50–60 сут яровизации [6]. Гены *Vrd1* и *Vrd2* обуславливают сокращение периода до колошения, особенно в годы с ранним возобновлением вегетации, снижение зимо- и морозостойкости, а вследствие этого влияют и на количественные характеристики урожая и его компонентов [7], что свидетельствует о существенной селекционной и адаптивной ценности указанных генов пшеницы для конкретных условий выращивания. В связи с этим возникает необходимость привлечения методов молекулярного маркирования для идентификации и отбора хозяйственно ценных рекомбинантов, несущих определенные аллели генов *Vrd* или их сочетания. Эффективность подобного подхода к решению экспериментальных задач была показана ранее на примере получения молекулярных маркеров к индивидуальным генам, в том числе к генам, отвечающим за скорость развития мягкой пшеницы [8–10]. Важным условием получения ДНК-маркеров является наличие специально созданного генетического материала, каковым могут служить почти изогенные линии. Поскольку изогенная линия отличается от сорта рекуррентного родителя фактически только по аллельному состоянию одного гена, полиморфный участок ДНК можно рассмат-



**Рис. 1.** Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК сортов — доноров генов *Vrd1* и *Vrd2* и рекуррентного родителя с праймерами к локусу ORS2: 1 — маркер молекулярной массы *Msp/pUC*; 2 — Norin 1 (*Vrd1vrd2*); нуль-аллель 280(-); 3 — Эритроспермум 604 (рецессив по *vrd1vrd2*); аллель 280(+); 4 — Чайка (*vrd1Vrd2*); аллель 280 (+)



**Рис. 2.** Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК сортов озимой мягкой пшеницы с праймерами к локусу ORS2: 1 — Одесская 16; 2 — Одесская 132; 3 — Обрий; 4 — маркер молекулярной массы *pUC18/Msp 1%*; 5 — Одом; 6 — Безостая 1; 7 — Знахидка; 8 — Ольвия; 9 — Скороспелка 36; 10 — Куяльник. Стрелками указано отсутствие продукта амплификации — нуль-аллель (280-)

ривать в качестве потенциального маркера. В настоящей работе рассматривается возможность получения ДНК-маркера, тесно сцепленного с геном *Vrd1*, и использование данного маркера для идентификации *Vrd* генотипов озимой пшеницы.

**Материал и методы.** В качестве исходного материала использовали почти изогенные по локусам *Vrd1* и *Vrd2* линии сортов Мироновская 808 и Эритроспермум 604, в частности: Мироновская 808/*Vrd1* (Norin 1), Мироновская 808/*Vrd1* (Бригантина), Эритроспермум 604/*Vrd1* (Norin 1), Мироновская 808/*Vrd2* (Чайка); сорта-доноры маркируемых генов: *Vrd1* — Norin 1 и Бригантина, *Vrd2* — Чайка [11]; 104 растения  $F_2$  популяции Эритроспермум 604 (*vrd1vrd2*)/Triple Dirk C (*Vrd1vrd2*); 14 сортов озимой пшеницы с различной продолжительностью яровизации, полный перечень

которых представлен в табл. 2. Семена родительских форм и  $F_2$  популяции Эритроспермум 604 (*vrd1vrd2*)/Triple Dirk C (*Vrd1vrd2*) проращивали в песке при комнатной температуре. Пятидневные проростки подвергали яровизации в камере КНТ-1 при +2 °С и круглосуточном освещении в течение 25 сут. После яровизации проростки высаживали в пятилитровые сосуды по 10 растений и выращивали в оржерее фитотрона при 18-часовом дне и температуре 20–25 °С днем и 15–17 °С — ночью. Гибридологический анализ проводили согласно [11].

Высокомолекулярную ДНК выделяли из пятидневных этиолированных проростков и листьев растений по методике, разработанной Сиволапом и соавт. [12]. Реакцию амплификации проводили методом SSR-ПЦР на приборе Термоциклер СМ2 при следующих режимах: денатурация ДНК при 93 °С 1 мин, элонгация при 72 °С 40 с (конечная элонгация в течение 3 мин), температура отжига — 60 °С. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала буфер, в состав которого входили 50 мМ KCl, 20 мМ трис-HCl pH 8,4, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,01 % твин 20, 0,2 мкМ каждого dNTP (Pharmacia), 0,2 мкМ праймера, 20 нг ДНК, 1 ед. Taq-полимеразы. Продукты реакции амплификации фракционировали электрофорезом в 2%-ном агарозном и 8%-ном ПААГ гелях. В работе использовали 25 пар праймеров к SSR локусам пшеницы и других культур. ПЦР-анализ  $F_2$  популяции проводили на ДНК из листьев, собранных с растений, которые находились на ранних этапах онтогенеза, до фенотипического проявления признака колошение : кушение.

#### Результаты исследований и их обсуждение.

**Анализ полиморфизма.** Применение ПЦР позволило обнаружить полиморфизм ДНК родительских форм — носителей различных аллелей гена *Vrd1*. В подавляющем большинстве случаев спектры продуктов амплификации ДНК почти изогенных линий совпадали с профилем амплификации сортов-рекуррентов, что не позволяло рассматривать выявленные полиморфные локусы в качестве потенциальных ДНК-маркеров. Исключение составил вариант амплификации с праймерами L: TTCAC GCAGTTCACCTCTGG и R: TATTTGATCAA AAGCATCGGC, разработанными к одному из

микросателлитных локусов — ORS2 [13]. ПЦР-анализ по указанному локусу демонстрирует идентичность профилей продуктов амплификации сортов Norin 1, Бригантина и почти изогенных по *Vrd1* гену линий, которые полиморфны по отношению к сортам-рекуррентам и линиям, изогенным по *Vrd2* (рис. 1). Характер полиморфизма заключается в отсутствии одного из продуктов реакции в области 280 п.н. у генотипов, моногенно доминантных по *Vrd1*, и наличии этого фрагмента ДНК у остальных анализируемых генотипов. Отсутствие продукта амплификации обозначено как нуль-аллель 280(-).

**Определение сцепления маркера с геном.** Для определения сцепления предполагаемого маркера с геном проводили анализ расщепляющейся  $F_2$  популяции Эритроспермум 604 (*vrd1vrd2*)/Triple Dirk C (*Vrd1vrd2*) как по фенотипу колошение : кушение, так и по аллельному состоянию SSR-локуса 280(-)/280(+). Родительские формы и индивидуальные растения популяции  $F_2$  подвергали яровизации в течение 25 сут. Яровизация такой продолжительности достаточна для выколашивания только генотипов носителей доминантного аллеля гена *Vrd1* в гомо- или гетерозиготном состоянии. Для колошения растений — носителей только рецессивных аллелей *vrd1vrd2* явно недостаточно продолжительности яровизации 25 сут, и до конца эксперимента (132 сут выращивания без учета предварительной яровизации) они оставались в фазе кушения. Из 104 растений популяции  $F_2$  выколосились 77 растений. Остальные 27 находились в фазе кушения. Указанное соотношение (3:1) достоверно соответствует по критерию  $\chi^2$  [14] теоретически ожидаемому при различиях между родительскими формами по одному гену (табл. 1).

Результаты ПЦР-анализа по аллельному состоянию ДНК-локуса 280(-)/280(+) позволяют разделить популяцию на два класса в соотношении 1 : 3. У 21 растения с ранними сроками колошения и у одного растения, не перешедшего к генеративной фазе развития (кушение), выявлен ДНК-локус 280(-). ДНК-локус 280(+) выявлен у 56 выколосившихся растений (гетерозиготы *Vrd1/vrd1*) и у 26 растений, оставшихся в стадии кушения (рецессивные гомозиготы *vrd1/vrd1*). При изучении

Таблица 1

Соотношение растений  $F_2$  популяции Эритроспермум 604 (*vrd1vrd2*)/Triple Dirk C (*Vrd1vrd2*) по признаку колошение : кушение и по аллелям ДНК-локуса 280(-) : 280(+)

Оцениваемый признак	Фактически наблюдаемое	Теоретически ожидаемое	$\chi^2$
Колошение : кушение	77 : 27	78 : 26	0,05*
Аллельное состояние SSR-локуса 280(-) / 280(+)	22 : 82	26 : 78	0,82**

\*  $\chi^2$  23:1 < 3,84 при df = 1. \*\*  $\chi^2$  23:1 < 3,84 при df = 1.

Таблица 2

*Vrd*-генотипы сортов озимой пшеницы различных эколого-географических зон по результатам ПЦР-анализа

Сорта	Продолжительность яровизации, сут по [5, 14, 15]	<i>Vrd</i> -генотип согласно SSR-PCR	<i>Vrd</i> -генотип по [7]
Мироновская 808	50	280(+)	<i>vrd1vrd2</i>
Бригантина	30	—	<i>Vrd1vrd2</i>
Никония	30	—	<i>Vrd1vrd2</i>
Cappelle Desprez	40	280(+)	?
Одесская 132	30	280(+)	<i>vrd1vrd2</i>
Безостая 1	30	280(-) <i>Vrd1</i>	<i>Vrd1vrd2</i>
Ольвия	30	280(-) <i>Vrd1</i>	<i>Vrd1vrd2</i>
Скороспелка 36	30	280(-) <i>Vrd1</i>	<i>Vrd1vrd2</i>
Norin 1	20	280(-) <i>Vrd1</i>	<i>Vrd1vrd2</i>
Triple Dirk C	20	280(-) <i>Vrd1</i>	<i>Vrd1vrd2</i>
Обрий	—	280(+)	?
Знахидка	40	280(+)	<i>vrd1vrd2</i>
Кавказ	—	280(-) <i>Vrd1</i>	?
Одом	50	280(+)	?

популяции  $F_2$  на независимое комбинирование у растений признаков колошение : кушение и SSR-аллелей 280(-) : 280(+) выявлено сцепление между маркируемым геном и SSR-локусом, величина которого составила 4,6 сМ (оценка выполнена с использованием программы MAPMAKER). Данное обстоятельство позволяет использовать указанный маркер для идентификации генотипов, доминантно гомозиготных по гену *Vrd1*.

**Идентификация сортов с *Vrd1* генотипом.** Одной из проблем генетики и селекции озимой пшеницы является отсутствие сведений о *Vrd*-генотипах широкого набора сортов. Методами

генетического анализа идентифицированы *Vrd*-генотипы лишь ряда сортов озимой пшеницы [7]. Апробация использования PCR-маркера к гену *Vrd1* проведена на ДНК 14 сортов озимой пшеницы как с известными, так и неидентифицированными *Vrd*-генотипами. Маркер к гену *Vrd1* — нуль-алель 280(–) выявлен у 11 из 14 используемых для анализа сортов озимой пшеницы (рис. 2, табл. 2). Среди анализируемых генотипов методом классического гибридологического анализа у 8 сортов установлен моногенно доминантный *Vrd1* контроль продолжительности яровизации. SSR-анализ продемонстрировал наличие доминантного аллеля *Vrd1* только у семи из восьми анализируемых сортов озимой пшеницы, что свидетельствует о достаточно высоком уровне достоверности результатов маркирования. С помощью указанного маркера невозможно определить присутствие доминантного *Vrd1* у сортов, которые являются дигенно доминантными по генам *Vrd1Vrd2*.

**SUMMARY.** PCR analysis was used to create DNA markers to the *Vrd1* gene. DNA of almost isogenic lines with respect to *Vrd* genes of the cultivars Mironovskaya 808 and Erytrospermum 604 was used. It was shown that in the monogenic *Vrd1* dominant genotypes the product of amplification (280 b.p.) is absent in comparison with the DNA of the *vrđ* recessive and monogenic *Vrd2* dominant genotypes. The linkage of the marker with the *Vrd1* gene has been determined using DNA analysis of plant population obtained as a result of crossing of Erytrospermum 604 (*vrđ* recessive) and Triple Dirk C (*Vrd1Vrd2*). F<sub>2</sub> population segregated in two groups on the character of 280 b.p. amplification product «presence/absence». The segregation significantly coincided to the theoretical one (by  $\chi^2$  test) with 1:3 expectation. The revealed molecular marker identified homozygous dominant *Vrd1* plants only. The DNA-marker to *Vrd1* gene is nulle-allelic 280(–).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Feit V.I., Stelmakh A.F. Congenic and isogenic lines on *Vrd* genes in winter bread wheat // Genetic collections, isogenic and alloplasmic lines : Intern. Conf. — Novosibirsk, 2001. — P. 14–17.
2. Файт В.И. Генетическая система контроля различий по продолжительности яровизации у озимой пшеницы // Цитология и генетика. — 2003. — 37, № 5. — С. 69–76.
3. Долгушин Д.А. Мировая коллекция пшениц на фоне яровизации. — М.: Сельхозгиз, 1935. — 110 с.
4. Gotoh T. Gene analysis of the degree of vernalization requirement in winter wheat // Japan J. Breed. — 1980. — 30, № 1. — P. 1–10.
5. Стельмах А.Ф., Золотова Н.А. Генетические различия по продолжительности яровизационной потребности у озимой мягкой пшеницы // Цитология и генетика. — 1993. — 27, № 3. — С. 3–6.
6. Файт В.И., Попова Н.В. Продолжительность яровизации и фотопериодическая чувствительность почти изогенных по генам *Vrd* линий озимой мягкой пшеницы // Вісн. Харк. нац. аграр. ун-ту : Сер. біол. — 2003. — № 5. — С. 47–53.
7. Файт В.И. Идентификация *Vrd* генотипов и эффекты данных локусов на зимо-морозостойкость и урожай озимой мягкой пшеницы // Генетика в современном обществе. — Тез. докл. конф., посвященной 70-летию кафедры генетики и цитологии Харьк. нац. ун-та им. В.Н. Каразина. — Харьков, 2004. — С. 32–33.
8. Балашова И.А., Календарь Р.Н., Файт В.И., Сиволап Ю.М. Создание ДНК-маркеров к локусу *Vrn-D1* мягкой пшеницы // Биотехнология. — 2002. — № 2. — С. 30–36.
9. Балашова И.А., Файт В.И., Сиволап Ю.М. Использование ISSR- и SSR-полимеразной цепной реакции для создания ДНК-маркеров к генам *Ppd* // Біополімери і клітина. — 2003. — 19, № 3. — С. 257–261.
10. Хлесткина Е.К., Салина Е.А., Леонова И.Н., Лайкова Л.И., Коваль С.Ф. Использование RAPD- и STS-анализа для маркирования генов пятой гомеологической группы хромосом мягкой пшеницы // Генетика. — 1999. — 35, № 10. — С. 1349–1357.
11. Файт В.И. Создание почти изогенных и конгенных линий мягкой озимой пшеницы по генам контроля продолжительности яровизации — *Vrd* // 36. наук. пр. СГІ — НАЦ НАІС. — Одеса, 2002. — № 2. — С. 37–46.
12. Сиволап Ю.М., Календарь Р.Н., Чеботарь С.В. Генетический полиморфизм злаковых растений при помощи ПЦР с произвольными праймерами // Цитология и генетика. — 1994. — 28, № 6. — С. 54–61.
13. Tang S., Knapp S.J. Simple sequence repeat map of the sunflower genome //http://www.orst.edu
14. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. — М.: Колос, 1973. — 327 с.

Поступила 29.11.05