



УДК 577.21+581.143.6:633.11

Алельний стан і ефекти генів VRN пшениці м'якої у системі *in vivo* та *in vitro*

О.О. Авксентьєва¹, В.В. Шулік²

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

²Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, Україна

Досліджено прояв ефектів головної генетичної системи контролю типу та темпів розвитку м'якої пшениці – VRN (vernalization) на рівні цілісної системи рослинного організму *in vivo* та популяції окремих калусних клітин *in vitro*. Досліджено алельний стан системи генів VRN, які детермінують потребу або нечутливість *Triticum aestivum* L. до яровизації та предетермінації цією системою процесу калусогенезу *in vitro*. У досліджах використовували сучасну модельну систему – майже ізогенні моногенно-домінантні лінії (NILs) ярого типу розвитку, що створені в генотипах озимих сортів пшениці Миронівська 808 і Ольвія. Молекулярно-генетичний аналіз алелів локусів генів VRN проводився на зернівках і пересадковій калусній культурі з використанням п'яти пар специфічних праймерів (Grain Gene Mass Wheat) методом ПЛР. Генетична система контролю темпів розвитку м'якої пшениці детермінує частоту калусогенезу, але не впливає на морфологічні особливості первинної та пересадкової калусної тканини. З'ясовано, що у зернівках *in vivo* та культурі *in vitro* ізогенних ліній алельний стан генів VRN майже ідентичний. Виявлено відмінності в алельному стані гена Vrn B1 у ізоляції Vrn 3 сорту Миронівська 808 у зернівках і калусній культурі, що може бути пов'язано з геномними перебудовами за умов індукції калусогенезу. Проведені дослідження свідчать про односпрямованість функціонування генів системи VRN у системі *in vivo* та *in vitro*.

Ключові слова: *Triticum aestivum*; NILs; генетична система VRN; темпи розвитку; культура *in vitro*; частота калусогенезу; ПЛР аналіз; алельні варіанти

Allelic state and effects of VRN genes on soft wheat in *in vivo* and *in vitro* systems

O.O. Aksentyeva¹, V.V. Shulik²

¹Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv, Ukraine

²V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

The article investigates the effects of the main manifestations of the genetic system controlling the type and rate of wheat development – VRN (vernalization) at the level of an integrated system of plant organism *in vivo* and callus certain population of cells *in vitro*. The paper studies the system of allelic VRN genes, which determine the need or insensitivity *Triticum aestivum* L. to vernalization and predetermination process of callusogenesis by the present system *in vitro*. In the experiments the modern model system of nearly isogenic lines (NILs) of spring type was used. The NILs were created in genotypes of the winter varieties Myronivska 808 and Olvia. Molecular genetic analysis of allelic loci of VRN genes was carried out by PCR analysis on grains and secondary callus culture using five pairs of specific primers (Grain Gene Mass Wheat). In the course of the experiments, it was found that the genetic system controlling the wheat rate determined the frequency of callusogenesis. However, the studied genetic system did not affect the morphological characteristics of primary and secondary callus tissue. In both hexaploid wheat cultivars the maximum frequency of callusogenesis appeared to be characterized in the Vrn 2 isogenic line and the original variety, slowly developing and intensely accumulating vegetative mass *in vivo*. The minimal frequency of callusogenesis was determined in the VRN 1 and VRN 3 isogenic lines, characterized by the rapid development of vegetation. The callus was derived from immature wheat embryos by morphological features analysis. Calluses with low water content, mainly, amorphous, compact, transparent, white or with yellowish tint were identified. Using PCR analysis, in grains *in vivo* and in the callus culture *in vitro* the

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, пр. Академіка Глушкова, 2, Київ, 03022, Україна
Taras Shevchenko Kyiv National University, Akademik Glushkov Ave., 2, Kyiv, 03022, Ukraine
Tel.: +38-066-281-98-25. E-mail: avksentyeva@rambler.ru

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, Харків, 61022, Україна
V.N. Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, 61022, Ukraine
Tel.: +38-066-807-89-33. E-mail: vikoza.vika@mail.ru

almost identical allelic status of VRN genes was revealed. In grains and callus of Vrn 1 isogenic lines of both wheat varieties the presence of a dominant gene VRN A1 and recessive VRN B1 and VRN D1 was detected, whereas in VRN 2 – a dominant gene VRN B1 and recessive VRN A1 and VRN D1. However, the dominant allele VRN D1 in the studied NILs was detected. Therefore, in varieties of grains and callus cultures all genes are represented only by recessive alleles VRN A1, VRN B1 and VRN D1. Differences were found in the callus culture of VRN 3 isogenic line of Myronivska 808 on the allelic state of the VRN B1 gene. The obtained results could be associated with genomic reconstructions during callusogenesis induction. Our studies indicate the unidirectional system of VRN genes functioning, which appears to be the main control system of type and rate of soft wheat development in the system *in vivo* and *in vitro*. This allows us to assume the role of the VRN genetic system in the determination of callusogenesis, and also the adequacy of the functioning of the system *in vitro* processes, determining the system of integration of plants. Thus, our study confirms that the callus tissues cells of higher plants are able to preserve the cells properties of the whole organism along with the acquisition of new specific properties. Moreover, the culture *in vitro* is an adequate system for the study of the plant organism properties as a system.

Keywords: *Triticum aestivum*; NILs; VRN genetic system; rate of development; culture *in vitro*; frequency of callusogenesis; PCR analysis; allelic variants

Вступ

Тип, темпи розвитку та тривалість онтогенезу у м'якої пшениці детермінуються декількома генетичними системами – генами VRN (vernalization response) і PPD (photoperiod response), що визначають реакцію пшениці на яровизацію та тривалість дня, а також генами VRD, які визначають тривалість яровизаційного періоду та комплекс генів EPS-earliness *per se* (скоростиглість як така) (Cockram, 2007; Kumar et al., 2012; Stelmakh, 1998). Ці гени, впливаючи на швидкість розвитку рослин (Potokina et al., 2012), визначають також низку інших цінних для господарства ознак: структуру врожаю, морозо- та зимостійкість, стійкість до захворювань (Khotyl'ov, 2002). Роль цих генетичних систем у контролі переходу рослин пшениці від вегетативного до генеративного розвитку неоднакова. Головна серед даних генетичних систем – система генів VRN (три – п'ять локусів), яка впливає на терміни переходу до колосіння і, відповідно, на загальну тривалість вегетаційного періоду (Emtceva, 2012; Distelfeld, 2009; Dubcovsky, 2006; Trevaskis, 2010). Реакція на яровизацію у пшениці контролюється щонайменше п'ятьма генами, з яких три основні гени Vrn-A1, Vrn-B1 і Vrn-D1 локалізовані відповідно у хромосомах 5A, 5B і 5D. Озимий тип розвитку рослин проявляється тільки в тому випадку, якщо ці три основні гени рецесивні. При цьому присутність тільки одного домінантного гена Vrn-A1 забезпечує повну нечутливість рослин до яровизації, домінантні гени Vrn-B1 і Vrn-D1 лише частково знижують потребу в ній (Golovina et al., 2010; Shherban' and Salina, 2013). Гени VRN активно досліджуються на молекулярно-генетичному рівні (Li et al., 2011; Oliver et al., 2013), вони клоновані (Yan, 2003) і в останні роки для пшениці описано декілька їх алельних варіантів (Bespalova, 2010; Muterko, 2015; Stepanenko, 2012). Гени Vrn-A1a і Vrn-B1a – транскрипційні фактори (Chu et al., 2011; Trevaskis, 2003). Ген Vrn-A1 кодує MADS-box транскрипційний фактор, локус Vrn-B1 містить два тандемно дупліковані гени, що пригнічують фактор цвітіння ZCCT, а Vrn-D1 кодує білок, подібний до інгібіторів Rafкіназ (Stepanenko, 2012).

На рівні цілісного рослинного організму досить детально досліджені вагомні аспекти функціонування системи генів VRN. Оскільки кожна рослинна клітина містить повну спадкову інформацію (повний «геном»), то логічно вважати, що за умов порушення цілісності рослинного організму, зокрема, у системі *in vitro*, зберігатимуться ті самі ефекти генів VRN, що у системі

in vivo. Однак це питання не досліджене, хоча його вирішення вагоме для поглиблення існуючих уявлень про функціонування рослинного організму як системи.

Калусоутворення – процес дедиференціації та активної проліферації та росту дедиференційованих клітин. Ці процеси у системі *in vitro* супроводжуються суттєвими перебудовами структурно-функціональних особливостей клітин, що показано у низці досліджень: гістологічних, біохімічних, цитохімічних, цитоморфологічних тощо (Kunah, 2005). Також у культурі *in vitro* спостерігається високий рівень геномної мінливості – однієї з характерних рис калусної культури (Kunah, 1998). Геномна нестабільність у популяції калусних дедиференційованих клітин виникає за дії різноманітних внутрішніх і зовнішніх факторів. Геномні порушення можуть спостерігатися на рівні хромосом (поліплоїдія, анеуплоїдія, різні аномалії мітозу тощо) та на рівні ДНК, що пов'язують зі змінами рівня метилування нуклеїнових кислот, як у первинному калусі (primary callus), так і у пересадковій калусній культурі (Stelpflug et al., 2014; Temel and Gozukirmizi, 2013).

Отже, в культурі *in vitro* відбуваються певні порушення у функціонуванні генетичного апарату рослинної клітини. Разом із тим, культура *in vitro* широко використовується як модель для вивчення різних аспектів морфогенетичних процесів у рослин. У зв'язку із цим постає питання адекватності цієї моделі тим процесам, які відбуваються у системі цілісної рослини, тобто *in vivo*. Це стосується, зокрема, функціонування системи генів VRN – головної для регуляції темпів розвитку (швидкості морфогенетичних процесів) пшениці м'якої *in vivo*.

Вивчення молекулярно-генетичних механізмів функціонування VRN генів проводили переважно на моделях сортів або заміщених ліній пшениці ярої, котрі несуть один із генів VRN у домінантному або рецесивному стані (Zhmurko, 2010; Lihenko, 2014). Однак для глибшого розуміння закономірностей прояву ефектів генів важливе вивчення їх усіх алельних варіантів, суміщених в одному генотипі (генофоні) як цілісній системі генетичного контролю розвитку пшениці м'якої. Для цієї мети адекватними моделями можуть слугувати моногенно домінантні майже ізогенні лінії (NILs), які несуть у певному поєднанні (домінантне або рецесивне) всі три головні гени VRN. Отже, мета цієї статті – з'ясувати ефекти генів VRN на калусогенез і виявлення можливих змін їх алельних варіантів у системі *in vitro* у майже ізогенних за цими генами ліній двох сортів пшениці м'якої.

Матеріал і методи досліджень

Рослинний матеріал. У дослідженні використано майже ізогенні моногеннодомінантні лінії (NILs) ярого типу розвитку, створені в генофонах озимих сортів Миронівська 808 і Ольвія. Лінії розрізняються за станом (домінантний або рецесивний) алелів усіх трьох генів VRN. Колекція ізогенних за генами VRN ліній створена науковцями Селекційно-генетичного інституту НААН України та підтримується на кафедрі фізіології та біохімії рослин і мікроорганізмів (ФБРІМ) Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна протягом 10 років. Під час проведення ПЛР аналізу алельного стану генів системи VRN як контрольні зразки використовували шість ізогенних ліній пшениці Paha NIL і вихідний сорт Paha із відомими алелями (генами), що мають індифікаційні номери у National Society of Genetic Counselors, NSGC (www.nsgc.org).

Отримання калусної культури. Первинні калусні (primery callus) культури ізогенних ліній отримували, використовуючи як експлант зрілі зародки. Насіння урожаю 2010–2012 років, отримане в умовах вирощування на експериментальній ділянці кафедри ФБРІМ ХНУ імені В.Н. Каразіна, стерилізували за розробленим протоколом (Avksent'eva and Petrenko, 2009), витримували у термостаті протягом доби. В умовах стерильності відокремлювали зрілі зародки від ендосперму та культивували ізольовані зародки в термостаті за температури 26 °C протягом 3–4 тижнів на живильному середовищі Мурасіге та Скуга (МС) із повним набором макро- та мікросолей та додаванням стимулятора росту 2,4-Д у концентрації 2 мг/л для індукції первинного калусогенезу. Частоту калусогенезу розраховували як відношення кіль-

кості первинних калусів до загальної кількості експлантів у відсотках. Проводили морфологічну оцінку утворених первинних калусів. Пересадкову культуру одержували шляхом пасивування первинних калусів на середовище того самого складу (МС + 2 мг/л 2,4-Д), культивували у термостаті у темряві за 26 °C і використовували для ПЛР-аналізу алельного стану генів VRN.

ПЛР-аналіз алельного стану локусів генів VRN. Молекулярно-біологічні дослідження проводили на зернівках і калусній культурі тругого–третього пасажу. ДНК виділяли з п'яти зернівок із використанням набору реактивів Diatom Prep 100 (Ізоген, Росія) за методикою виробника (метод сорбції). ДНК із калусної тканини виділяли з використанням СТАВ-буферу за стандартною методикою (DNA Extraction, 2003). Для вивчення алельного стану генів використовували алельспецифічні праймери відповідно до даних Grain Gene Mass Wheat (<http://maswheat.ucdavis.edu>) (табл. 1). ПЛР проводили у багатоканальному ампліфікаторі «Терцикл» (ДНК-технології, Росія) за стандартними умовами для ампліфікації специфічних праймерів (табл. 2). Розподіл продуктів ПЛР здійснювали шляхом електрофорезу протягом 90–120 хвилин у 1,5% агарозному гелі з додаванням бромистого етидію (10 мг/мл). Спектри фрагментів ДНК реєстрували в ультрафіолеті (312 нм) за допомогою фотокамери Nikon.

Статистична обробка результатів. Проведено три біологічні серії дослідів з аналізу ефективності процесу калусогенезу за культивування по три чашки Петрі на кожну ізолію з 5–10 експлантами у чашці. Результати оброблено методом однофакторного дисперсійного аналізу (Atramentova and Utevs'ka, 2007). Результати ПЛР аналізу обробляли із застосуванням програми TotalLab (TL120.v2009).

Таблиця 1

Праймери для ідентифікації різних алелів генів у гексаплоїдній пшениці (Grain Gene Mass Wheat)

Локус	Алель	Праймер	Послідовність	Розмір продукту, пар нуклеотидів
VRN- A1	Vm-A1a	VRN AF VRN-INT1R	GAAAGGAAAAATTCTGCTCG GCAGGAAATCGAAATCGAAG	965 + 876
	Vm-A1b			714
	Vm-A1c			734
	vm-A1			734
	Vm-A1a	VRN AF VRN1R	GAA AGGAAAAATTCTGCTCG TGCACCTCCCCCGCCCCAT	750 + 650
	Vm-A1b			480
	vm-A1			500
	Vm-A1c			500
VRN- A1	Vm-A1c	Intr1/A/F2 Intr1/A/R3	AGCCTCCACGGTTTGGAAAGTAA AAGTAAGACAACACGAATGTGAGA	1170
VRN- A1	vm-A1	Intr1/ C/F Intr1/AB/R	GCACTCCTAACCCACTAACC TCATCCATCATCAAGGCAA	1068
VRN- B1	Vm-B1	Intr1/B/F Intr /B/R3	CAAGTGGAAACGGTTAGGACA CTCATGCCAAAAATTGAAGATGA	709
VRN- B1	vm-B1	Intr1/B/F Intr /B/R4	CAAGTGGAAACGGTTAGGACA CAAATGAAAAGGAATGAGAGCA	1149
VRN- D1	Vm-D1	Intr1/D/F Intr1/D /R3	GTTGTCTGCCTCATCAAATCC GGTCACTGGTGGTCTGTGC	1671
VRN- D1	vm-D1	Intr1/D/F Intr1/D/ R4	GTTGTCTGCCTCATCAAATCC AAATGAAAAGGAACGAGAGCG	997

Результати та їх обговорення

Калусогенез NILs. Досліджено вплив генотипу на ефективність процесу калусоутворення та морфологічну характеристику ізогенних за генами контролю типу роз-

витку ліній пшениці (6 ізоліній та вихідні сорти Миронівська 808, Ольвія – носії рецесивних генів генетичної системи VRN). Результати досліджень показали, що всі генотипи формували первинний калус, але цей процес відбувався з різною частотою – 61–93% (табл. 3). Також досліджувані ізолінії розрізняли за

швидкістю формування первинного калусу. Калусогенез почався на 7–10-ту добу у всіх ізоляцій Vrn 1, Vrn 2, Vrn 3 обох сортів, в експлантів із зародків сортів цей процес проходив повільніше – на 14–17-ту добу культивування. Незважаючи на те, що зрілі зародки майже не

використовують як експлант за культивування м'якої пшениці *in vitro* (Bavol, 2008), у наших попередніх (Avksent'eva and Petrenko, 2009) та одержаних у цій роботі даних зрілі зародки виявилися ефективними експлантами для отримання первинного калусу.

Таблиця 2

Умови проведення ПЛР з алейспецифічними праймерами

Праймери	Умови ПЛР					
	Початкова денатурація, t° (хв)	Кількість циклів	Денатурація, t° (с)	Віджиг, t° (с)	Елонгація, t° (с)	Фінальна елонгація, t° (хв)
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 // Intr1/B/R3 // Intr1/B/R4	94 (10)	44 (Touch-down)	94 (45)	58–63 (45)	72 (69)	72 (10)
Intr1/D/F // Intr1/D/R3 // Intr1/D/R4	94 (10)	44 (Touch-down)	94 (45)	63–65 (45)	72 (90)	72 (10)

Таблиця 3

Частота індукції первинного калусогенезу (%) ізогенних за генами VRN ліній м'якої пшениці

Сорт	Ізоляція	Частота калусогенезу, %	Морфологічна характеристика
Миронівська 808	Vrn 1	74,3 ± 3,0	Компактний, гетерогенний, малооводнений, прозорий, аморфний, жовтого відтінку, з елементами диференціювання
	Vrn 2	93,2 ± 4,2	
	Vrn 3	66,6 ± 2,1	
	сорт	84,4 ± 3,7	
НІР _{0,05}		3,8	
Ольвія	Vrn 1	70,5 ± 3,1	
	Vrn 2	90,0 ± 4,0	
	Vrn 3	61,5 ± 1,9	
	сорт	80,5 ± 2,7	
НІР _{0,05}		4,2	

Різниця між показниками ефективності калусогенезу в ізоляцій сортів Ольвія та Миронівська 808 була несуттєвою, але в цілому ізоляції сорту Ольвія характе-

ризувалися дещо нижчими показниками частоти калусогенезу порівняно з лініями сорту Миронівська 808. Також не спостерігали відмінності за морфологічною характеристикою калусних тканин (табл. 3). Максимальною частотою калусогенезу в обох сортів гексаплоїдної пшениці характеризувалися ізоляції Vrn 2 і вихідний сорт, а мінімальною – ізоляції Vrn 1 і Vrn 3. Порівнюючи ізоляції, у цілому, можна констатувати, що вони мають великий потенціал калусоутворення та ранжуються за його інтенсивністю, незалежно від генотипу сорту: Vrn 2 > сорт > Vrn 1 > Vrn 3. За морфологічними ознаками отримані калуси (рис. 1а, б; табл. 3) зі зрілих зародків, в основному, були малооводнені, аморфні, компактні, прозорі, мали жовтуватий відтінок. У калусах усіх досліджуваних ізоляцій часто виявляли зони меристематичної активності та іноді спостерігали спонтанний ризогенез. Відмінностей за морфологією калусних тканин між ізогенними лініями двох сортів Ольвія та Миронівської 808 не спостерігали.

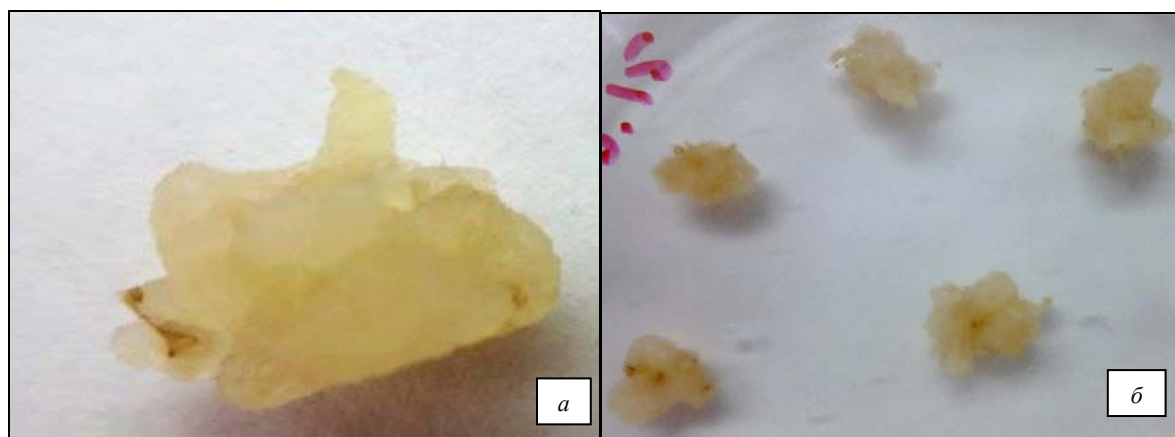


Рис. 1. Калусогенез ізогенної Vrn 1 лінії м'якої пшениці *Triticum aestivum* L. сорт Миронівська 808: а – щільний, аморфний, прозорий первинний калус (primery callus); б – загальний вигляд первинних калусів у чашці Петрі

Одержані нами раніше дані (Zhmurko et al., 2013) показують, що рослини ізогенних ліній із домінуючим геном Vrn 2 відрізняються від рослин ліній Vrn 1 та Vrn 3 тривалішою вегетативною фазою та, у результаті цього, формуванням більшої вегетативної маси (інтенсивнішими ростовими процесами), але повільнішими темпами розвитку. У культурі *in vitro* лінія Vrn 2 характеризується

більшою інтенсивністю калусогенезу, ніж лінії Vrn 1 та Vrn 3. Щодо стосовується рослин обох сортів – Миронівська 808 та Ольвія, у яких усі гени vrn рецесивні, то для них без яровизації характерний тільки вегетативний морфогенез, тобто тільки ріст без переходу до генеративної фази онтогенезу (Achrem et al., 2012; Kim and Sung, 2014). У культурі *in vitro* у сортів спостерігали калусогенез

високої інтенсивності, як і у лінії Vrn 2, яка повільно розвивається *in vivo*. Одержані результати свідчать про односпрямованість функціонування генів VRN у культурі *in vitro* та у системі цілісної рослини. Це дає підставу припустити участь генетичної системи VRN у детермінації калусогенезу, а також адекватність її функціонування у системі *in vitro* процесам, які вона детермінує у системі цілісної рослини.

ПЛР-аналіз насіння та пересадкової калусної культури. Молекулярний аналіз генів Vrn-A1, Vrn-B1, Vrn-D1 проводили *in vivo* у зернівках 8 генотипів – майже ізогенних ліній NILs і вихідних сортів Миронівська 808 та Ольвія. Аелелі локусу VRN-A1 вивчали з використанням VRNAF//VRN-INT1R праймерів. Очікуваний

розмір ампліфікованих фрагментів із використанням цих праймерів для найпоширенішого доміантного аеля Vrn-A1a становить 965 і 876 пар нуклеотидів, для рецесивного аеля vrn-A1 – 734 пари нуклеотидів (рис. 2а). Серед проаналізованих генотипів рецесивний аель vrn-A1 виявлений у сортів Миронівська 808 і Ольвія та ізоліній Vrn 2 (рис. 2а). Решта ізоліній (Vrn 1 і Vrn 3) обох сортів несуть тільки доміантний аель Vrn-A1a.

За літературними відомостями, найпоширеніший доміантний аель VRN-A1 характеризується вставками повторюваних послідовностей у ділянці промотора (Fu, 2005), у результаті чого продукт ПЛР представлено двома фрагментами 965 та 876 пар нуклеотидів. У наших дослідженнях виявлено тільки продукт 965 пар нуклеотидів (рис. 2а).

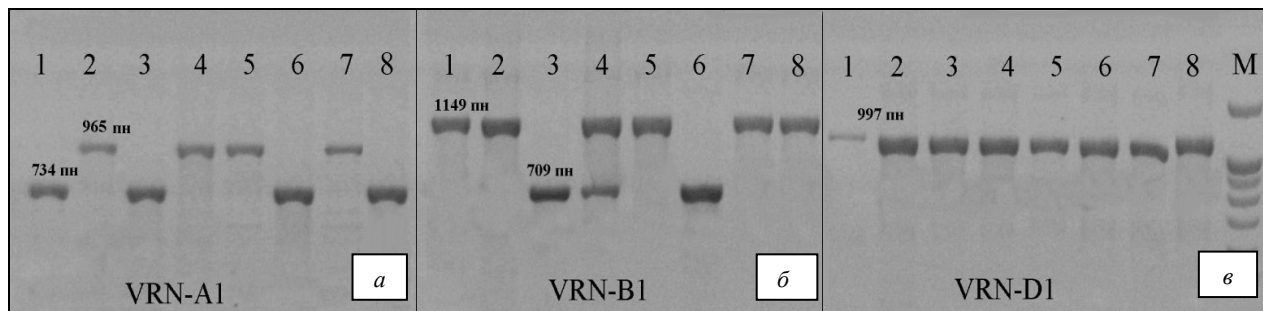


Рис. 2. Виявлення аелів генів VRN *in vivo* з використанням комбінацій праймерів:

а – для гена Vrn-A1 – VRN AF//VRN-INT1R, б – для гена Vrn-B1 – Intr1/B/F//Intr1/B/R3//Intr1/B/R4, в – для гена Vrn-D1 – Intr1/D/F//Intr1/D/R3//Intr1/D/R4; сорт Миронівська 808 (1–4): 1 – вихідний сорт, 2 – Vrn-1, 3 – Vrn-2, 4 – Vrn-3; сорт Ольвія (5–8): 5 – Vrn-1, 6 – Vrn-2, 7 – Vrn-3, 8 – вихідний сорт

Аналіз локусу VRN-B1 (рис. 2б) показав наявність доміантних аелів Vrn-B1 (709 пар нуклеотидів) у ізоліній Vrn 2 сортів Миронівська 808 і Ольвія, виявлених під час використання двох пар праймерів (Touchdown PCR, дуплекс) Intr1/B/F Intr/B/R3 і Intr1/B/F Intr/B/R4. У решті досліджених генотипів виявлено рецесивний аель vrn-B1 із використанням праймерів Intr1/B/F і Intr/B/R4 та довжиною ампліфікованого фрагмента 1149 пар нуклеотидів відповідно (рис. 2б).

Аелельний аналіз локусу Vrn-D1 показав присутність тільки рецесивного аеля vrn-D1 (997 пар нуклеотидів) під час використання праймерів Intr1/D/F і Intr /D/R4 в усіх досліджуваних генотипів обох сортів (рис. 2в). У працях багатьох дослідників показано, що у ярих сортів пшениці, які зростають у Європі, практично відсутній аель Vrn-D1 (Bespalova, 2010; Lihenko, 2014; Potokina,

2012). Досліджені ізогенні лінії створені в генотипі озимих сортів, але являють собою форми з ярим типом розвитку. Наші дослідження також підтверджують виявлену закономірність – відсутність доміантного аеля Vrn-D1 в ізоліній м'якої пшениці з ярим типом розвитку.

Оскільки ген Vrn-A1 – основний у детермінації потреби або нечутливості до яровизації (Loukoianov, 2005; Trevaskis, 2010), то для дослідження його аельного стану використовують значну кількість праймерів (табл. 1). Крім того, використання агарозного гелю не дозволяє розрізняти фрагменти 734 Vrn-A1c і 734 vrn-A1. У подальших дослідженнях ми використовували праймери Intr1/A/F2 і Intr1/A/R3, а також Intr1/C/F і Intr1/AB/R (рис. 3). У ході проведених аналізів виявили рецесивний аель vrn-A1 у генотипах сортів Миронівська 808 і Ольвія та ізоліній Vrn 2 обох сортів (рис. 3б).

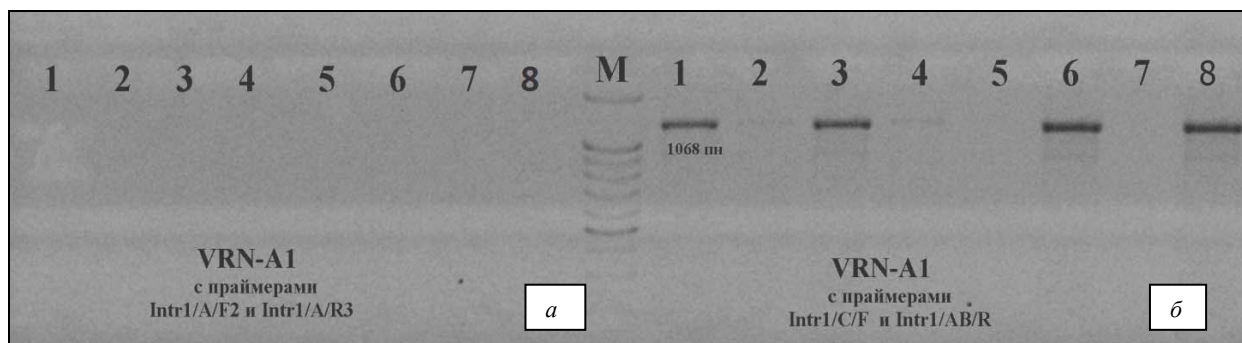


Рис. 3. Виявлення аелів гена Vrn-A1c (а) і vrn-A1 (б) *in vivo* за допомогою специфічних праймерів Intr1/C/F і Intr1/AB/R та Intr1/A/F2 і Intr1/A/R3 відповідно: Миронівська 808: 1 – вихідний озимий сорт, 2 – Vrn-1, 3 – Vrn-2, 4 – Vrn-3; Ольвія: 5 – Vrn-1, 6 – Vrn-2, 7 – Vrn-3, 8 – вихідний сорт

Дослідження аельного стану генів системи Vrn в умовах *in vitro* проводили на пересадковій калусній культурі. У генотипі ізоляцій Vrn 1 і Vrn 3, які швидко розвиваються, виявлено наявність доміантних алелів гена Vrn-A1a за допомогою праймерів VRNAF//VRN-INTIR із продуктом ампліфікації 965 пар нуклеотидів (рис. 4a). Також показано присутність рецесивних алелів vrn-B1 і vrn-D1 під час використання праймерів

Intr/B/F//Intr/B/R4 (1149 пар нуклеотидів) і Intr1/D/F//Intr1/D/R4 (997 пар нуклеотидів) (рис. 4б, в). В ізоляції, які розвиваються повільними темпами (Vrn 2), у генотипі присутній доміантний алель Vrn-B1 (рис. 4б), виявлений парою праймерів Intr1/B/F і Intr/B/R3 (1 170 пар нуклеотидів) і рецесивний алель vrn-A1, ідентифікований парою праймерів Intr1/CF і Intr1/ABR (1 068 пар нуклеотидів) (рис. 4а).

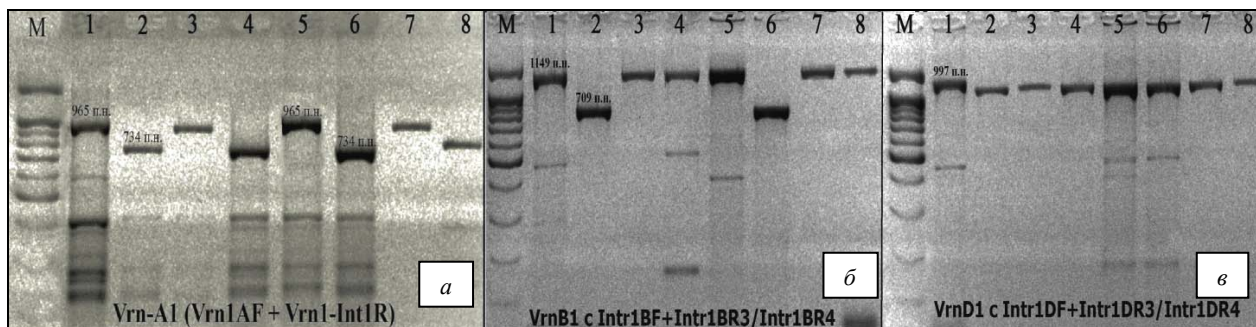


Рис. 4. Виявлення алелів генів Vrn-A1 (а), Vrn-B1 (б) і Vrn-D1 (в) у пересадковій калусній культурі ізогенних ліній пшениці за допомогою специфічних праймерів:
Миронівська 808 1 – Vrn 1, 2 – Vrn 2, 3 – Vrn 3, 4 – вихідний сорт;
Ольвія: 1 – Vrn 1, 2 – Vrn 2, 3 – Vrn 3, 4 – вихідний сорт

Зіставлення результатів, отриманих у дослідженнях у культурі *in vitro* і *in vivo*, показало, що аельний стан генів VRN насіння та калусної культури майже ідентичний (табл. 4). Зміни спостерігалися тільки в калусній культурі ізоляції Vrn 3 сорту Миронівська 808, а саме аельного стану Vrn-B1. Ймовірно, під час отримання

культури клітин, а також індукції калусоутворення у даному випадку відбувались геномні зміни (перебудови). Можливо, що шляхом добору гетерозиготний стан локусу Vrn-B1 в умовах *in vivo* у популяції проліферувальних калусних клітин змінився на стабільніший гомозиготний стан.

Таблиця 4

Аельні варіанти генів VRN в умовах *in vivo* та *in vitro*

Сорт / ізоляція	Генотип	
	Насіння	Калусна культура
Миронівська 808	vrn-A1 vrn-B1 vrn-D1	vrn-A1 vrn-B1 vrn-D1
М 808 Vrn1	VRN-A1a vrn-B1 vrn-D1	VRN-A1a vrn-B1 vrn-D1
М 808 Vrn2	vrn-A1 VRN-B1 vrn-D1	vrn-A1 VRN-B1 vrn-D1
М 808 Vrn3	VRN-A1a VRN-B1/vrn-B1 vrn-D1	VRN-A1a vrn-B1 vrn-D1
Ольвія	vrn-A1 vrn-B1 vrn-D1	vrn-A1 vrn-B1 vrn-D1
Ольвія Vrn1	VRN-A1a vrn-B1 vrn-D1	VRN-A1a vrn-B1 vrn-D1
Ольвія Vrn2	vrn-A1 VRN-B1 vrn-D1	vrn-A1 VRN-B1 vrn-D1
Ольвія Vrn3	VRN-A1a vrn-B1 vrn-D1	VRN-A1a vrn-B1 vrn-D1

Оскільки для пересадкової калусної культури характерне явище спонтанної соматоклональної мінливості (Kunah, 1998) для певних робіт із фітобіотехнології необхідне підтвердження збереження вихідного генотипу рослини-донора у ході культивування *in vitro*. У ході проведених досліджень, головним чином, було підтверджено збереження генотипу вихідних ізоляцій під час культивування в умовах *in vitro*. У пересадкових калусних культурах досліджуваних ізоляцій не відбувалося спонтанної соматоклональної мінливості, за винятком ізоляції Vrn 3 сорту Миронівська 808.

Висновки

У культурі *in vitro* між усіма ізоляціями обох сортів різниця за морфологічними показниками калусів не проявлялась. Максимальна частота калусогенезу виявлена у

лінії Vrn 2 та вихідних сортів, а мінімальна – у ліній Vrn 1 та Vrn 3. Це дає підставу вважати, що система генів Vrn контролює морфогенез не тільки у рослин м'якої пшениці *in vivo*, а і, у випадку порушення цілісної рослини, за калусогенезу в системі *in vitro*.

У зернівках *in vivo* та культурі *in vitro* ізогенних ліній аельний стан генів VRN майже ідентичний. Тільки в калусній культурі ізоляції Vrn 3 сорту Миронівська 808 виявлено зміну аельного стану генів Vrn B1, що може бути пов'язано з геномними перебудовами під час індукції калусогенезу.

Таким чином, наші дослідження підтверджують, що клітини калусних тканин вищих рослин, поряд із набуттям нових специфічних властивостей, здатні зберігати властивості клітин цілісного організму, а культура *in vitro* – адекватна система для дослідження властивостей рослинного організму.

Подяки

Автори вдячні д-ру біол. наук В.І. Файту – завідувачу відділу генетики, та академіку НАНУ д-ру біол. наук А.М. Стельмаху – головному науковому співробітнику відділу генетики Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннєзнавства та сортівивчення НААН України за надані для дослідження ізогенні за генами VRN лінії пшениці.

Автори також висловлюють подяку ТОВ «Агроген» (м. Харків) за допомогу у проведенні молекулярно-генетичних досліджень.

Робота виконана в рамках держбюджетної теми «Дослідження фізіолого-біохімічних і молекулярно-біологічних механізмів генетичного контролю розвитку та продукційного процесу сільськогосподарських культур» (№ 0112U000101).

Бібліографічні посилання

- Achrem, M., Skuza, L., Kalinka, A., Szucko, I., Filip, E., Słominska-Walkowiak, R., Rogalska, S., 2012. Role of epigenetic mechanisms in plant response to low temperature. *Acta Biol. Cracov. Bot.* 54(1), 7–15.
- Atramentova, L.O., Utevs'ka, O.M. (ed.), 2007. *Statystychni metody v biologii* [Statistical methods in biology]. HNU imeni V.N. Karazina, Harkiv (in Ukrainian).
- Avksent'eva, O.A., Petrenko, V.A., 2009. Rol' genotipa, sostava sredi i tipa jeksplanta v formirovanii pervichnogo kallusa izogennyh liniy pshenicy [Role of the genotype, composition of medium and type of explant in formation of the first callus of wheat isogenic lines]. *The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series Biology* 771(9), 157–166 (in Russian).
- Bavol, A.V., Dubrovnaja, O.V., Ljal'ko, I.I., 2008. Regeneracija rastenij iz razlichnyh tipov jeksplantov mjagkoj pshenicy [The regeneration of plants from different types of wheat explants]. *Physiology and Biochemistry of Cultivated Plants* 40(2), 150–156 (in Russian).
- Bespalova, L.A., Koshkin, V.A., Potokina, E.K., Filibok, V.A., Matvienko, I.I., Mitrofanova, O.P., Guenkova, E.A., 2011. Photoperiod sensitivity and molecular marking of genes Ppd and Vrn in connection with breeding alternative-habit wheat varieties. *Russian Agricultural Sciences* 36(6), 389–392.
- Chu, C.-G., Tan, C.T., Yu, G.-T., Zhong, S., Xu, S.S., Yan, L., 2011. A novel retrotransposon inserted in the dominant Vrn-B1 allele confers spring growth habit in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.). *G3. Genes, Genomes and Genetics* 1(7), 637–645.
- Cockram, J., Jones, H., Leigh, F., O'Sullivan, D., Powell, W., Laurie, D., Greenland, A., 2007. Control of flowering time in temperate cereals: Genes, domestication and sustainable productivity. *J. Exp. Bot.* 58(6), 1231–1244.
- Distelfeld, A., Tranquilli, G., Li, C., Yan, L., Dubcovsky, J., 2009. Genetic and molecular characterization of the VRN2 loci in tetraploid wheat. *Plant Physiol.* 149(1), 245–257.
- DNA extraction for PCR. Plant transformation facility, 2003. DNA Extraction from maize callus, maize leaf tissue, or soybean leaf tissue for PCR. Retrieved from www.agron.iastate.edu/ptf/service/Callus%20DNA%20extraction.pdf
- Dubcovsky, J., Loukoianov, A., Fu, D., Valarik, M., Sanchez, A., Yan, L., 2006. Effect of photoperiod on the regulation of wheat vernalization genes VRN1 and VRN2. *Plant Mol. Biol.* 60(4), 469–480.
- Emtseva, M.V., Efremova, T.T., Arbutova, V.S., 2012. Heading time of substitution and near-isogenic lines of common wheat with dominant alleles Vrn-B1a and Vrn-B1c. *Russian Journal of Genetics: Applied Research* 2(4), 304–310.
- Fu, D., Szucs, P., Yan, L., Helguera, M., Skinner, J., Zitzewitz, J., Hayes, P., Dubcovsky, J., 2005. Large deletions within the first intron in VRN-1 are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Mol. Genet. Genomics* 273(1), 54–65.
- Golovnina, K.A., Kondratenko, E.Y., Blinov, A.G., Goncharov, N.P., 2010. Molecular characterization of vernalization loci VRN1 in wild and cultivated wheats. *BMC Plant Biol.* 10(1), 168.
- Khotyljova, L., Kaminskaya, L., Koren, L., 2002. Influence of genetic systems of Vrn and Ppd genes on the ecological adaptation of wheat and Triticale. *Biologija* 4, 45–48.
- Kim, D.-H., Sung, S., 2014. Genetic and epigenetic mechanisms underlying vernalization. *The Arabidopsis Book* 12, e0171.
- Kumar, S., Sharma, V., Chaudhary, S., Tyagi, A., Mishra, P., Priyadarshini, A., Singh, A., 2012. Genetics of flowering time in bread wheat *Triticum aestivum*: complementary interaction between vernalization-insensitive and photoperiod-insensitive mutations imparts very early flowering habit to spring wheat. *J. Genet.* 91(1), 33–47.
- Kunakh, V.A., 1998. Genomnaja izmenchivost' somaticheskikh kletok rastenij. Izmenchivost' v processe dedifferencirovki i kallusobrazovanija *in vitro* [Genome variability in plant somatic cells. 4. Variability in the process of dedifferentiation and callus formation *in vitro*]. *Biopolym. Cell.* 14(4), 298–319 (in Russian).
- Kunakh, V.A., 2005. Biotehnologija likars'kyh roslyn. Genetychni ta fiziologo-biohimichni osnovy [Biotechnology of medicinal plants. Genetic and physiological and biochemical basis]. Logos, Kyiv (in Ukrainian).
- Li, C., Distelfeld, A., Comis, A., Dubcovsky, J., 2011. Wheat flowering repressor VRN2 and promoter CO₂ compete for interactions with NUCLEAR FACTOR-Y complexes. *Plant J.* 67(5), 763–773.
- Lihenko, I.E., Stasjuk, A.I., Shherban', A.B., Zyrjanova, A.F., Lihenko, N.I., Salina, E.A., 2014. Izuchenie allelnogo sostava genov Vrn-1 i Ppd-1 u rannespelyh i srednerannyh sortov jarovoj mjagkoj pshenicy Sibiri [Analysis of the allelic variation of the Vrn-1 and Ppd-1 genes in Siberian early and medium early varieties of spring wheat]. *Vavilovskij Zhurnal Genetiki i Selekcii* 18, 691–703 (in Russian).
- Loukoianov, A., Yan, L., Blechl, A., Sanchez, A., Dubcovsky, J., 2005. Regulation of VRN-1 vernalization genes in normal and transgenic polyploid wheat. *Plant Physiol.* 138(4), 2364–2373.
- Muterko, O.F., Balashova, I.A., Fayt, V.I., Syvolap, J.M., 2015. Molecular-genetic mechanisms of regulation of growth habit in wheat. *Cytology and Genetics* 49(1), 58–71.
- Oliver, S.N., Deng, W., Casao, M.C., Trevaskis, B., 2013. Low temperatures induce rapid changes in chromatin state and transcript levels of the cereal VERNALIZATION1 gene. *J. Exp. Bot.* 64(8), 2413–2422.
- Potokina, E.K., Koshkin, V.A., Alekseeva, E.A., Matvienko, I.I., Filobok, V.A., Bespalova, L.A., 2012. The combination of the Ppd and Vrn gene alleles determines the heading date in common wheat varieties. *Russian Journal of Genetics: Applied Research* 2(4), 311–318.
- Shherban', A.B., Salina, E.A., 2013. Jepigeneticheskaja reguljacija jekspressii genov jarovizacii [Epigenetic regulation of expression of vernalization genes]. *Tsitologija* 55(4), 234–237 (in Russian).
- Stelmakh, A., 1998. Genetic systems regulating flowering response in wheat. *Euphytica* 100(1), 359–369.
- Stelplflug, S.C., Eichten, S. R., Hermanson, P. J., Springer N.M., Kaeppler, S.M., 2014. Consistent and heritable alterations of DNA methylation are induced by tissue culture in maize. *Genetics* 198(1), 209–218.
- Stepanenko, I.L., Smirnova, O.G., Titov, I.I., 2012. A model of the gene network for flowering time regulation in winter wheat and barley. *Russian Journal of Genetics: Applied Research* 2(4), 319–324.
- Temel, A., Gozukirmizi, N., 2013. Analysis of retrotransposition and DNA methylation in barley callus culture. *Acta Biol. Hung.* 64(1), 86–95.

- Trevaskis, B., 2010. The central role of the VERNALIZATION 1 gene in the vernalization response of cereals. *Funct. Plant Biol.* 37, 479–487.
- Trevaskis, B., Bagnall, D., Ellis, M., Peacock, W., Dennis, E., 2003. MADS-box genes control vernalization-induced flowering in cereals. *PNAS* 100(22), 13099–13104.
- Yan, L., Loukoianov, A., Tranquilli, G., Helguera, M., Fahima, T., Dubcovsky, J., 2003. Positional cloning of the wheat vernalization gene VRN1. *PNAS* 100(10), 6263–6268.
- Zhmurko, V., Avksentyeva, O., Bing, H., 2013. Influence of photoperiodic conditions on the development and content of nitrogenous compounds in the VRN NILs wheat *Triticum aestivum* L. *Biologija* 59(2), 231–240.
- Zhmurko, V.V., 2010. Osobennosti projavlenija effektov genov PPD na tempy razvitija sortov i gibridov ozimoy pshenicy [Showing features of the PPD genes effects on the development pace of winter varieties and hybrids]. *Fakty i Jeksperimental'noj Jevoljucii Organizmov* 8, 38–42 (in Russian).

Надійшла до редколегії 19.03.2016