

ВЛИЯНИЕ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА *VIVIPAROUS-1* НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ПРОРАСТАНИЮ НА КОРНЮ У ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ*

Н.К. МАЙЕР, М.Г. ДИВАШУК, П.Ю. КРУПИН, А.А. СОЛОВЬЁВ

(Кафедра генетики, центр молекулярной биотехнологии)

В работе представлены результаты анализа аллельного состояния гена *Viviparous-1* двух серий сестринских линий яровой тритикале, полученных путем отбора устойчивых и неустойчивых растений в F_3 . Показано, что у линий — потомков неустойчивых форм большая часть растений (83,3%) имеют аллель *Vp-1Ba*. Среди линий — потомков устойчивых растений 35% линий характеризуются наличием аллеля *Vp-1Bc*, 45% — наличием аллеля *Vp-1Ba*, 25% — являлись гетерозиготами по этому гену, что, вероятно, обусловлено доминантной природой устойчивости и отбором в F_3 наряду с гомозиготами гетерозигот по данному гену. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования STS-маркера *Vp-1B* в селекции на устойчивость к прорастанию на корню у тритикале.

Ключевые слова: тритикале, прорастание на корню, замещения хромосом, STS-маркер, селекция с использованием молекулярных маркеров (MAS).

Тритикале — культура, обладающая большим потенциалом продуктивности и способная обеспечить стабильность рынка зерна. Однако одним из факторов, сдерживающих её широкое распространение, является склонность к доуборочному прорастанию зерна в колосе. Эта проблема особенно актуальна для районов Нечерноземья, где прохладная влажная погода во время уборки часто вызывает прорастание на корню. Предуборочное прорастание наносит значительный вред: снижается урожай, ухудшается конечное качество зерна, снижается посевная ценность семенного материала [9]. Один из путей решения данной проблемы — создание устойчивых форм тритикале.

Устойчивость к прорастанию на корню является комплексным признаком, детерминируемым множеством генетических факторов, проявление которых в значительной степени под-

вержено влиянию абиотических условий.

На пшенице выявлено несколько QTL (локусов количественных признаков) и генов, влияющих на данный признак. При этом стоит отметить, что различные авторы локализируют эти QTL на разных хромосомах. Так, у пшеницы к настоящему времени они локализованы на всех хромосомах кроме 1 D [3, 5, 8]. У ржи QTL устойчивости к прорастанию на корню также локализованы на всех 7 хромосомах, при этом степень их проявления варьировала по годам исследований [12, 14].

Однако использование QTL устойчивости к прорастанию на корню в селекции и генетических исследованиях весьма затруднено из-за привязки QTL к конкретной комбинации RIL, в которой он был картирован.

Ген *Viviparous-1* (*Vp-1*) является одним из важных регуляторов поздне-

* Работа выполнена в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» ГК № 02.740.11.0286.

го эмбриогенеза у кукурузы и пшеницы [6]. Фенотипы мутантов кукурузы по гену *Vp-1* свидетельствуют, что ген выполняет две различных функции: первая — обеспечение созревания зародыша, вторая — обеспечение перехода семени в покой и репрессия прорастания. Ген *Vp-1* клонирован и секвенирован у нескольких видов растений. Три гомолога гена *Vp-1* клонированы у пшеницы [15]. Они локализованы в длинных плечах хромосом третьей гомеологичной группы — 3A, 3B и 3D [10]. Анализ структуры и экспрессии этих трех генов показал, что каждый из них потенциально кодирует полноразмерную цепь аминокислот. Однако некорректный сплайсинг проматричной РНК приводит к aberrантным продуктам трансляции. Изучение структуры транскриптов у исходных и родственных видов свидетельствует, что изменения транскрипции произошли при введении пшеницы в культуру [7]. Исследование уровня экспрессии гена *Vp-1* в созревающих зародышах устойчивых и неустойчивых сортов выявило положительную корреляцию между покоем семян и чувствительностью к АБК [10]. Встраивание гена *Vp-1* из *Avena fatua* в мягкую пшеницу приводило к повышению устойчивости к прорастанию на корню [7].

Исследование последовательностей генов *Vp-1* геномов А и D не выявило полиморфизма. По гену *Vp-1* из генома В обнаружен полиморфизм по его структуре. Аллель *Vp-IBb*, 845 п.н., содержал инсерцию 193 п.н. в третьем интроне гена. Аллель *Vp-IBc*, 569 п.н., имел делецию 83 п.н. в той же области. Эти аллели содержались в 90% сортов, устойчивых к прорастанию на корню. У 90% сортов, неустойчивых к прорастанию на корню, в этом гене делеции и инсерции отсутствовали, они имели аллель *Vp-IBa*, 652 п.н. [15]. Анализ европейских сортов мягкой пшеницы показал, что наряду с этими аллелями встречается новый ал-

лель этого гена *Vp-IBd*, 627 п.н., с делецией 25 п.н. в том же регионе [13].

Полиморфизм по гену *Vp-1B* позволил разработать STS-маркер, ассоциирующийся с устойчивостью к прорастанию. Данный маркер является эффективным кодоминантным маркером, позволяющим выявлять все аллели гена *Vp-1B*, и рекомендуется для использования в MAS-селекции с применением молекулярных маркеров [13, 15].

На кафедре генетики РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева ведется работа по созданию линий яровых тритикале, устойчивых к прорастанию на корню. При объединении в одном геноме генетических систем пшеницы и ржи возникает проблема их взаимодействия между собой и определения роли каждой системы в устойчивости к прорастанию. Изучение проявления генов пшеницы в геноме тритикале является важным этапом в улучшении самой тритикале.

Материалы и методы

Материалом служили две группы сестринских линий яровой тритикале, созданные на кафедре генетики РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева. Первая группа (R) является потомством F₅ (L) отобранных в F₈ растений, устойчивых к прорастанию на корню, вторая — неустойчивых (S). Эти линии получены от скрещивания сорта АБасо (геномная формула AABBRR) с линией гескаплоидной тритикале 131/7.

ДНК выделяли из молодых листьев и корешков по методу [2] с некоторыми модификациями.

В работе использовали STS-маркер на ген *Viviparous-1*, локализованный на хромосоме 3B [15], а также SSR-маркер Xgwm 482, локализованный на хромосоме 2D.

Все праймеры синтезированы в ЗАО «Синтол» (Москва).

Продукты ПЦР разделяли в 1,5%-м агарозном геле с буфером TBE при на-

пряженности поля 6 V/см. В качестве маркера размеров использовали «100 bp leader» (Fermentas).

После окрашивания бромистым этидием продукты ПЦР визуализировали с помощью трансиллюминатора и документировали цифровой камерой «Samsung».

Результаты и их обсуждение

В ходе наших исследований с помощью молекулярных маркеров были проанализированы две группы сестринских линий яровой тритикале. Первая группа представляет собой потомство отобранных в F₃ растений, устойчивых к прорастанию на корню (R), вторая — неустойчивых (S).

Анализ аллельного состояния гена *Vp-1* у набора сестринских линий выявил расщепление между линиями как среди форм, отобранных из устойчивых растений, так и неустойчивых (таблица). Среди линий — потомков устойчивых растений — 35% характеризуются наличием аллеля *Vp-lBc*, 45% — наличием аллеля *Vp-lBa*, 25% являлись гетерозиготами по этому гену. Среди линий — потомков неустойчивых форм — лишь 16,7% характеризуются аллельным состоянием *Vp-lBc*, в то время как остальные 83,3% — аллельным состоянием *Vp-lBa*.

Эти результаты свидетельствуют о преобладании в поздних поколениях аллеля *Vp-lBa* у потомков, отобранных из популяции F₃ неустойчивых (S) растений. Среди потомков устойчивых растений из популяции F₃ наблюдается расщепление и наряду с обеими гомозиготами встречаются гетерозиготы по данному гену (рисунок).

Подобное распределение аллелей гена *Vp-1* может быть вызвано доминантной природой устойчивости к прорастанию на корню, что привело к отбору в F₃ как гомозигот *Vp-lBc/Vp-lBc*, так и гетерозигот *Vp-lBc/Vp-lBa*, которые могли обладать сходным фенотипическим прояв-

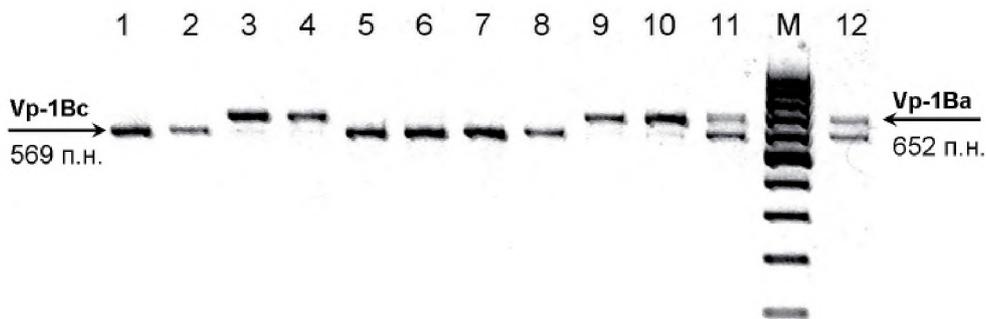
Аллельное состояние гена *Vp-1*
у серии сестринских линий
яровой тритикале

Линии от устойчивых форм		Линии от неустойчивых форм	
линия	аллель гена <i>Vp1B3</i> *	линия	аллель гена <i>Vp1B3</i>
R-1	<i>Vp-1 Bc</i>	S-21	<i>Vp-1 Bc</i>
R-2	∅	S-22	<i>Vp-1 Ba</i>
R-3	∅	S-23	<i>Vp-1 Bc</i>
R-4	<i>Vp-1 Bc</i>	S-24	<i>Vp-1 Bc</i>
R-5	<i>Vp-1 Ba</i>	S-25	<i>Vp-1 Ba</i>
R-6	<i>Vp-1 Ba</i>	S-26	<i>Vp-1 Ba</i>
R-7	<i>Vp-1 Ba</i>	S-27	<i>Vp-1 Ba</i>
R-8	<i>Vp-1 Bc</i>	S-28	<i>Vp-1 Ba</i>
R-9	<i>Vp-1 Ba</i>	S-29	<i>Vp-1 Ba</i>
R-10	<i>Vp-1 Bc</i>	S-30	<i>Vp-1 Ba</i>
R-11	Г	S-31	<i>Vp-1 Ba</i>
R-12	<i>Vp-1 Ba</i>	S-32	<i>Vp-1 Ba</i>
R-13	<i>Vp-1 Ba</i>	S-33	<i>Vp-1 Ba</i>
R-14	Г	S-34	<i>Vp-1 Ba</i>
R-15	<i>Vp-1 Bc</i>	S-35	<i>Vp-1 Ba</i>
R-16	<i>Vp-1 Ba</i>	S-36	<i>Vp-1 Ba</i>
R-17	<i>Vp-1 Bc</i>	S-37	<i>Vp-1 Ba</i>
R-18	<i>Vp-1 Bc</i>	S-38	<i>Vp-1 Ba</i>
R-19	<i>Vp-1 Ba</i>		
R-20	Г		

Примечание: * Г — гетерозиготы по гену *Vp1B3*.

нием. При этом доминантный аллель «маскировал» эффект рецессивного аллеля, гомозиготы по которому могли выщепиться в более поздних поколениях. В группе S-линий исходные неустойчивые растения оказались преимущественно гомозиготами *Vp-lBa/Vp-lBa*, что и могло стать причиной однородности пятого поколения. Это согласуется с ранее опубликованными материалами по генетическому анализу устойчивости к прорастанию зерна на корню в данной комбинации [1].

В то же время закономерности проявления гена *Vp-1* в геноме пшеницы нельзя напрямую применять к экспрессии данного гена в геноме тритикале. Ген *Vp-1*, являясь одним из основных регуляторов поздних этапов развития зародыша, у тритикале экспрессируется наряду с экспрессией множества генов генома ржи, в т.ч.



Электрофореграмма ПЦР-продуктов *Vp-1*-гена у анализируемых растений

и ортолога *Vp-1*, предположительно локализованного в длинном плече хромосомы 3R. Однако полученные нами на тритикале данные в целом свидетельствуют, что аллели гена *Vp-1* имеют сходное проявление как у пшеницы, так и у тритикале.

Заключение

Исследование полиморфизма по гену *Viviparous-1* двух серий F_5 (1_3) сестрин-

ских линий яровой тритикале показало, что линии — потомки неустойчивых форм — в основном несут аллель *Vp-1Ba* (83,3%). Среди линий — потомков устойчивых растений — 35% характеризуются наличием аллеля *Vp-1Bc*, 45% — наличием аллеля *Vp-1Ba*, 25% являлись гетерозиготами. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования STS-маркера *Vp-1B* в селекции на устойчивость к прорастанию на корню у тритикале.

Библиографический список

1. Данилкин Н.М., Соловьёв А.А. Устойчивость к прорастанию на корню линий и гибридов яровой тритикале // Известия ТСХА, 2008. Вып. 1. С. 81—85.
2. Bernatzky R., Tanksley S.D. Toward a saturated linkage map in tomato based on isozyme and random cDNA sequences. *Genetics*, 1986, 112: 887-898.
3. Groos C., Gay G., Perretant M.R., Gervais L., Bernald M., Dedryver F., Charmet G. Study of the relationship between pre-harvest sprouting and grain color by quantitative trait loci analysis in a white 4 red grain bread-wheat cross. *Theor. Appl. Genet*, 2002. 104: 39-47.
4. Korzun V., Malyshev S., Voylokov A.V., Bdrner A. A genetic map of rye (*Secale cereale* L.) combining RFLP, isozyme, protein, microsatellite and gene loci. *Theoret. Appl. Genet*, 2001.102: 709-717.
5. Kuwal P.L., Singh R., Balyan H.S., Gupta P.K. Genetic basis of pre-harvest sprouting tolerance using single-locus and two-locus QTL analyses in bread wheat. *Functional and Integrative Genomics*, 2004. 4: 94-101.
6. McCarty D.R., Carson C.B., Stinard P.S., Robertson D.S. Molecular analysis of viviparous-1: An abscisic acid-insensitive mutant of maize. *Plant Cell*, 1989. 1(5): 523-532.
7. McKibbin R.S., Wilkinson M.D., Bailey P.C., Flintham J.E., Andrew L.M., Lazzeri P.A., Gale M.D., Lenton J.R., Holdsworth M.J. Transcripts of *Vp-1* homeologues are misspliced in modern wheat and ancestral species. *PNAS*, 2002. 99. 15: 10203-10208.
8. Mori M., Uchino N., Chono M., Kato K., Miura H. Mapping QTLs for grain dormancy on wheat chromosome 3A and the group 4 chromosomes, and their combined effect. *Theoret. Appl. Genet*, 2005.110: 1315-1323.

9. Mos M., Wytowicz T. The effect of seed sprouting damage on field emergence and yield of spring triticale. J. Cent. Eur. Agric, 2004. 5. 4: 251-258.
10. Nakamura S., Toyama T. Isolation of a *Vpl* homologue from wheat and analysis of its expression in embryos of dormant and non-dormant cultivars. J. Exp. Botany, 2001. 52. 357: 875-876.
11. Osa M., Kato K., Mori M., Shindo C., Torada A., Miura H. Mapping QTLs for seed dormancy and the *Vpl* homologue on chromosome 3A in wheat. Theoret. Appl. Genet, 2003. 106: 1491-1496.
12. Rybka K. An approach to identification of rye chromosomes affecting the pre-harvest sprouting in triticale. J. Appl. Genet, 2003. 44. 4: 491-496.
13. Xia L.Q., Yang Y., Ma Y.Z., Chen X.M., He Z.H., Wilkinson M., Jones H.D., Shewry P.R. What Can Viviparous-1 Gene Tell Us About Wheat Pre-Harvest Sprouting? 11th International Symposium on Pre-harvest Sprouting in Cereals, 2007.
14. Xiao-bo R., Xiu-jin L., Deng-cai L., Jia-li W., You-liang Z. Mapping QTLs for pre-harvest sprouting tolerance on chromosome 2D in a synthetic hexaploid wheat × common wheat cross. J. Appl. Genet, 2008. 49, 4: 333-341.
15. Yang Y, Ma Y.Z., Xu Z.S., Chen X.M., He Z.H., Yu Z., Wilkinson M., Jones H.D., Shewry P.R., Xia L.Q. Isolation and characterization of Viviparous-1 genes in wheat cultivars with distinct ABA sensitivity and pre-harvest sprouting tolerance. J. Exp. Bot., 2007. 58. 11: 2863-2871.

Рецензент — к. б. н. Г.И. Карлов

SUMMARY

Results of *Viviparous-1* gene allele condition analysis of two series of spring triticale sister lines, obtained by selecting both stable and unstable plants in F₃, are provided in the article. It has been discovered that in lines — progeny of unstable forms — most plants — 83/3% have *Vp-IBa* allele. Among lines — progeny of stable plants 35% lines are characterized by *Vp-IBc* allele presence, 45% — *Vp-IBa* allele presence, 25% are heterozygotes according to this gene, which is probably due to dominant resistance nature and selection in F₃ along with homozygotes of heterozygotes in accordance with this gene. The results obtained are evidence of STS-marker *Vp-IB* likely use in selection of resistance to on root germination in triticale.

Key words: triticale, germination on root, substitutions of chromosomes, STS-marker, selection with molecular markers (MAS) use.

Майер Николай Константинович — асп. кафедры генетики РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел. 976-08-94. Эл. почта: [n.k.maier\(ci\)gmail.com](mailto:n.k.maier(ci)gmail.com)

Дивашук Михаил Георгиевич — к. б. н., РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел. 977-70-01.

Крупин Павел Юрьевич — асп. центра молекулярной биотехнологии РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел. 977-70-01.

Соловьев Александр Александрович — д. б. н., РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел. 976-08-94.