



Анализ полиморфизма экзона-4 гена *VERNALIZATION-A1* у видов полиплоидной пшеницы

А.Ф. Мутерко , Е.А. Салина

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

Одними из ключевых генов в селекции пшеницы, влияющих на адаптивность и урожайность культуры, являются гены *VRN1*. В недавних исследованиях установлена ассоциация полиморфизма нуклеотидной последовательности четвертого экзона гена *VRN-A1* с вариативностью количественных показателей ряда агрономически ценных признаков озимой пшеницы, таких как чувствительность к продолжительности яровизации, морозостойкость, время выхода в трубку и время колошения. Однако эти исследования были выполнены на ограниченном количестве сортов *T. aestivum* и не охватывали другие виды полиплоидной пшеницы. В ранних исследованиях не предполагалось наличия более чем одной копии гена *VRN-A1* на геноме. Кроме того, только недавно было показано, что ген *VRN-D4* отличается от *VRN-A1* всего по нескольким однонуклеотидным мутациям. В настоящей работе проанализировано распределение гаплотипов экзона-4 гена *VRN-A1* в 158 образцах 6 видов тетраплоидной и 5 видов гексаплоидной пшеницы, несущих различные аллели этого гена. Для идентификации гаплотипов экзона-4 гена *VRN-A1* был разработан кодоминантный маркер, основанный на модуляции кривизны молекул ДНК. Полиморфизм экзона-4 выявлен исключительно в гексаплоидной пшенице и ассоциирован с наличием не менее чем двух копий гена *VRN-A1* в геноме. За исключением одного образца, мутантный тип экзона-4 встречался только в комбинации с диким типом. Разработаны аллель-специфические праймеры, благодаря которым, в отличие от существующих методов, можно исключить гаплотипы гена *VRN-D4* в ходе анализа гаплотипов *VRN-A1*. В результате расширения анализируемого участка идентифицированы дополнительные гаплотипы, ассоциированные с полиморфизмом адениновых трактов в интроне-4. При этом получено расщепление по гаплотипу среди образцов, характеризующихся только одним, диким, типом экзона-4 *VRN-A1*, а также доминантных аллелей этого гена. На основании установленных ассоциаций между гаплотипом и аллельным вариантом гена *VRN-A1* в тетраплоидной пшенице вида *Triticum dicoccum* идентифицирован новый, предположительно доминантный, аллель этого гена (обозначен *Vrn-A1k*), несущий 42 п. н. инсерцию в области промотора.

Ключевые слова: пшеница; ген *VRN-A1*; полиморфизм экзона 4; гаплотипы.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Мутерко А.Ф., Салина Е.А. Анализ полиморфизма экзона-4 гена *VERNALIZATION-A1* у видов полиплоидной пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(3):323-333. DOI 10.18699/VJ16.19-o

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Muterko A.F., Salina E.A. Analysis of the *VERNALIZATION-A1* exon-4 polymorphism in polyploid wheat. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(3):323-333. DOI 10.18699/VJ16.19-o

Analysis of the *VERNALIZATION-A1* exon-4 polymorphism in polyploid wheat

A.F. Muterko , E.A. Salina

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

One of the key genes that influence the adaptability of wheat to environments and yield are the *VRN1* genes. In recent studies, an association of missense mutations within *VERNALIZATION-A1* exon-4 with modulation of quantitative values of such agronomically valuable traits as frost tolerance, vernalization requirement duration and flowering time of wheat was shown. However, these investigations were carried out exclusively in *T. aestivum* varieties and have not covered other species of polyploid wheat and different *VRN-A1* alleles. The earlier studies did not consider more than one copy of *VRN-A1* per genome. Furthermore, only recently it was shown that only several SNPs distinguish the *VRN-D4* and *VRN-A1* genes. In the present study, *VRN-A1* exon-4 polymorphism was investigated in 158 accessions of 6 tetraploid and 5 hexaploid wheat species carrying the different *VRN-A1* alleles. To identify the *VRN-A1* exon-4 haplotypes, a co-dominant marker was designed, based on modulation of the curvature of the DNA molecule. Polymorphism of the *VRN-A1* exon-4 was revealed only in hexaploid wheat accessions and was associated with the presence of not less than two copies of *VRN-A1* per genome. With the exception of one accession, the mutant type of exon-4 was identified only in combination with the wild type. Furthermore, allele-specific primers were designed to identify the *VRN-D4* gene or in order to exclude its impact on the results during analysis of the *VRN-A1* haplotypes. By expanding the region being analyzed, additional haplotypes, which are associated with polymorphism of adenine tracts within intron-4, were identified. Haplotype segregation was attained among accessions carrying only intact exon-4 of *VRN-A1* and among dominant alleles of this gene. Finally, based on the associations revealed between the *VRN-A1* alleles and haplotypes, the new putative dominant *VRN-A1* allele (designated *Vrn-A1k*) carrying a 42-bp insertion within the promoter region was identified in tetraploid wheat of *Triticum dicoccum*.

Key words: wheat; *VRN-A1*; exon 4 polymorphism; haplotypes.

Необходимость воздействия условий низких температур и укороченного фотопериода для инициации перехода растения к репродуктивной стадии развития обуславливает его потребность в яровизации. У пшеницы потребность в яровизации детерминирована аллельным состоянием генов системы *VRN*: *VRN1* (транскрипционный фактор семейства MADS-box); *VRN2* (zinc-finger CCT домен содержащий ген – *ZCCT*); *VRN3* (гомолог гена *FLOWERING LOCUS T*); *VRN4* (дупликация гена *VRN-A1* в коротком плече хромосомы 5D) (Yan et al., 2003, 2004b, 2006; Kippes et al., 2015). Исследование генов *VRN* имеет ключевое значение в селекции пшеницы, поскольку их экспрессия влияет на ряд агрономически ценных признаков, определяющих адаптивность и урожайность культуры в условиях окружающей среды конкретного географического региона. Однако из-за особенностей распространения в пшенице аллелей различных генов *VRN*, а также их различного влияния на фенотип наиболее перспективно исследование генов *VRN1*.

Гены *VRN1* картированы в середине длинного плеча хромосом пятой гомеологической группы (Yan et al., 2003) и ассоциированы с регуляцией перехода от вегетативной к репродуктивной стадии развития (Danyluk et al., 2003). Доминантные аллели *VRN1* обуславливают яровой или факультативный тип развития (отсутствие потребности в яровизации или ее частичное сохранение соответственно), тогда как рецессивные аллели характеризуются необходимостью в яровизации и обуславливают озимый тип развития. В то время как альтернативные доминантные аллели генов *VRN1* оказывают различное влияние на количественные показатели ряда качественных признаков в яровых сортах, полиморфизм рецессивного аллеля *vrn1* ассоциирован с модуляцией чувствительности к продолжительности яровизации, морозостойкости, времени выхода в трубку и колошения озимой пшеницы (Chen et al., 2009; Dhillon et al., 2010; Eagles et al., 2011; Díaz et al., 2012; Li et al., 2013; Yan et al., 2015).

Структура генов *VRN1* представлена восьмью экзонами, шесть из которых кодируют два функциональных домена (MADS- и К-боксы) (Yan et al., 2003), обеспечивающих белок-белковые взаимодействия и связывание с регуляторными последовательностями аффлекторных генов. Первый экзон кодирует домен суперсемейства MADS – SRF-TF (Treisman, 1992). Аминокислотная последовательность домена SRF (Serum Response Factor) семейства TF (Transcription Factor) включает в себя несколько функционально активных сайтов, таких как сайт фосфорилирования, димеризации, а также сайт, обеспечивающий связывание MADS-бокса содержащего белка с ДНК (Santelli, Richmond, 2000). Частично 2-й, а также экзоны 3–6 кодируют аминокислотную последовательность К-домена, которая, как правило, детектируется во всех транскрипционных факторах SRF-типа. К-букс вовлечен в белок-белковые взаимодействия с другими MADS-боксами содержащими белками (Yang et al., 2004) посредством образования суперспиральных структур (Lupas et al., 1991).

Из трех гомеологических генов, *VRN-A1*, *VRN-B1* и *VRN-D1*, полиморфизм нуклеотидной последовательности кодирующей части, ассоциированный с влиянием на ряд признаков, имеющих большое значение в селек-

ции озимой пшеницы, выявлен только для гена *VRN-A1*. В зависимости от типа нуклеотида в позиции 20 п.н. четвертого экзона гена *VRN-A1* различают С- и Т-типы экзона-4, обозначенные здесь как Ex4C и Ex4T гаплотипы. Мисенс-мутация С→Т в экзоне-4 гена *VRN-A1*, приводящая к замещению консервативного лейцина на фенилаланин в аминокислотной последовательности К-домена (Leu¹¹⁷→Phe¹¹⁷), впервые идентифицирована в озимых сортах мягкой пшеницы *Triticum aestivum* из США (Chen et al., 2009). Выявленный полиморфизм в четвертом экзоне ассоциировали с различием во времени выхода в трубку и временем колошения. В частности, озимые сорта, характеризующиеся экзонами-4 дикого типа (гаплотип Ex4C), выколашивались раньше, чем сорта с мутантным типом (гаплотип Ex4T) (Chen et al., 2009). Позже аналогичные наблюдения подтвердили и на австралийских сортах и дополнили их новыми данными, указывающими на ассоциацию гаплотипа Ex4T с повышением морозостойкости озимых сортов *T. aestivum* и потребностью в продолжительной яровизации (Eagles et al., 2011). Кроме того, предполагается, что поскольку К-домен вовлечен во взаимодействие с другими MADS-боксами содержащими белками, С/Т полиморфизм в четвертом экзоне гипотетически может влиять на ряд других признаков, выраженность которых ассоциирована с экспрессией гена *VRN-A1* (Eagles et al., 2011).

Ген *VRN-A1* в гексаплоидной пшенице может быть представлен двумя и более копиями на геноме (Díaz et al., 2012; Würschum et al., 2015). Есть предположение, что число копий *VRN-A1* позитивно коррелирует с потребностью в продолжительной яровизации (продолжительность яровизации до полного насыщения, когда дальнейшее увеличение периода яровизации уже не приводит к сокращению времени до колошения) и сроками колошения пшеницы (Díaz et al., 2012). Тем не менее данное предположение остается дискуссионным, поскольку среди копий *VRN-A1* также наблюдается полиморфизм экзона-4.

Следует отметить, что все существующие исследования полиморфизма экзона-4 гена *VRN-A1* проводились исключительно на сортах *T. aestivum* и в настоящее время отсутствуют данные об аналогичных исследованиях для других видов полиплоидной пшеницы. В большинстве случаев анализ выполнялся без учета копийности гена *VRN-A1*, что особенно важно для гексаплоидной пшеницы, в которой, к примеру, у *T. aestivum*, более 90 % сортов несут две-три копии этого гена (Würschum et al., 2015) с различными комбинациями гаплотипов экзона-4 (Díaz et al., 2012). Кроме того, недавнее позиционное клонирование гена *VRN-D4* выявило, что только четыре однонуклеотидных полиморфизма (ОНП) отличают его от *VRN-A1* (Kippes et al., 2015). Следовательно, результаты предыдущих исследований должны быть пересмотрены также с учетом и этого обстоятельства, поскольку при использовании существующих методов анализа не представляется возможным различить экзоны-4 генов *VRN-A1* и *VRN-D4*. Наконец, существующие методы идентификации типа экзона-4 *VRN-A1* имеют ряд недостатков, которые ограничивают их широкое применение в исследовании влияния соотношения числа копий гена *VRN-A1* с различным типом экзона-4 на фенотип.

В настоящей работе полиморфизм экзона-4 исследуется в доминантных и рецессивных аллелях гена *VRN-A1* у представителей 11 видов гексаплоидной и тетраплоидной пшеницы. Для проведения качественного и количественного анализа оптимизирована аллель-специфическая ПЦР и разработаны особого типа кодоминантные ДНК-маркеры к гаплотипам экзона-4 гена *VRN-A1*. Анализ выполнен с учетом влияния гена *VRN-D4* на результаты исследования.

Материалы и методы

Генетический материал. Исследовали геномную ДНК 158 образцов пяти видов гексаплоидной пшеницы (геномный состав BBA^aA^aDD): *T. aestivum* L., *T. spelta* L., *T. macha* Dekap, *T. compactum* Host, *T. sphaerococcum* Percival и шести тетраплоидных видов (геном BBA^aA^a): *T. durum* Desf., *T. turgidum* L., *T. polonicum* L., *T. carthlicum* Nevski, *T. dicoccum* Schrank и *T. dicoccoides* Körn.

Анализировали местные сорта озимой мягкой пшеницы вида *T. aestivum*, а также образцы, полученные из Национальной системы зародышевой плазмы растений (National Plant Germplasm System (NPGS), <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs>), IPK Gatersleben (https://gbis.ipk-gatersleben.de/GBIS_I/home.jsf) и Национального центра генетических ресурсов растений Украины (yuriev1908@gmail.com).

Экстракция ДНК, амплификация и гель-электрофорез. Тотальная ДНК экстрагирована из четырех дневных проростков с применением ЦТАБ (по Doyle et al., 1987, с модификацией). ДНК выделена из двух-пяти индивидуальных растений каждого образца.

Реакционная смесь для полимеразной цепной реакции (ПЦР) включала: ДНК (~60 нг), 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM KCl, 0.1 % Triton X-100, 250 мкМ dNTPs, 1.5 % ДМСО, 3 нг/мкл каждого праймера, 0.05 Е/мкл Taq полимеразы. Нуклеотидные последовательности праймеров и температура отжига приведены в табл. 1. ПЦР выполнена по следующей программе: денатурация 94 °C (2 мин); 36 циклов амплификации: 94 °C (10 с), отжиг (10 с), 74 °C (40 с); финальная элонгация 72 °C (5 мин).

Электрофорез продуктов амплификации проведен в неденатурирующих полиакриламидных гелях (ПААГ) в оптимизированных ранее условиях (Muterko et al., 2016), усиливающих anomalно медленную миграцию искривленных молекул ДНК. Агарозный гель-электрофорез выполнен с использованием 1.5 % агарозных гелей в 1× ТБЭ буфере. ПААГ и агарозные гели были визуализированы путем окрашивания бромидом этидия (0.5 мкг/мл) и документированы при помощи системы «Gel Doc XR» (Bio-Rad Laboratories).

Секвенирование фрагментов ПЦР. Продукты ПЦР переосаждали этанолом в присутствии линейного акриламида (15 мкг) в качестве носителя. В случае наличия в амплификате нескольких целевых фрагментов нужные ампликоны были вырезаны из агарозных и полиакриламидных гелей и очищены на спин-колонках с silica-мембраной. Секвенирование проведено с помощью «BigDye Terminator v3.1 sequencing kit» и последующим анализом продуктов на «ABI 3130xl Genetic Analyzer» (ЦКП «Ге-

номика» СО РАН). Нуклеотидные последовательности анализируемых участков гена *VRN-A1* депонированы в GenBank под номерами доступа: KU844092 (Ex4C), KU844091 (Ex4T), KT983448 (Ex4C), KT983449 (Ex4C.f), KU844093 (Ex4C), KX874600 (Ex4C.sph), KX874601 (Ex4T), KX874602 (Ex4C.m), KX874603 (Ex4C.s), KX874604 (Ex4C.s), KX874605 (Ex4C.f), KX874606 (Ex4C.f), KX874607 (Ex4T), KX874608 (*Vrn-A1k*).

Анализ данных. Для исследования распределения кривизны и выявления локальных изгибов предполагаемую форму молекул ДНК рассчитали из нуклеотидных последовательностей, основываясь на конформационных параметрах двойной спирали, извлеченных по ранее описанному способу (Muterko et al., 2015). Трехмерные модели спирали молекул ДНК визуализированы с использованием PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.2 (Schrödinger, LLC).

Распределение кривизны молекулы ДНК анализировали в скользящем окне размером 40 п. н. и шагом 1 п. н. В качестве кривизны молекулы в позиции $i+1$ ($1 < i < n$) было принято значение, обратное радиусу описанной окружности треугольника, вершины которого лежат на оси спирали с координатами $i-20$; i ; $i+20$ п. н. Кривизну оценивали в единицах кривизны молекулы ДНК, где в качестве единицы принята средняя кривизна ДНК в кристаллизованном нуклеосомном коре ($1/42.8 \text{ \AA}$).

Результаты

Разработка кодоминантных ДНК-маркеров для анализа полиморфизма экзона-4 гена *VRN-A1*. Анализ нуклеотидной последовательности альтернативных гаплотипов экзона-4 выявил, что С/Т полиморфизм ассоциирован с нарушением аденинового тракта (А-тракт, AnTm, $n+m > 4$), протяженностью 5 п. н. (A(T)₄) (рис. 1). А-тракты индуцируют локальные изгибы молекулы ДНК и определяют ее глобальную кривизну (Koo et al., 1986). Изогнутые молекулы ДНК мигрируют anomalно медленно в ПАА гелях по сравнению с неизогнутыми молекулами той же длины (Marini et al., 1982), при этом решающее значение имеют длина и локализация А-трактов (Koo et al., 1986; Diekmann, 1992). В связи с этим исследована возможность использования разницы в скорости миграции ПЦР-фрагментов с различной кривизной ДНК, обусловленной полиморфизмом А-тракта, для идентификации альтернативных гаплотипов экзона-4 гена *VRN-A1*. ПЦР была оптимизирована с парой праймеров, Ex4F2m3 и Ex4R, охватывающих участок от интрона-2 (частично) до середины интрона-4 гена *VRN-A1*. Нуклеотидная последовательность сайта отжига праймера Ex4F2m3 различается в гомеологичных геномах только двумя ОНП, локализованными во второй и седьмой позициях относительно 3'-конца, поэтому для повышения специфичности связывания праймера с последовательностью ДНК из генома А было искусственно создано нарушение комплементарности в третьей позиции от 3'-конца. В результате разделения продуктов амплификации в ПАА гелях в условиях, усиливающих anomalно медленную миграцию изогнутых молекул ДНК, наблюдается хорошо заметная разница в скорости миграции фрагментов ПЦР, соответствующих С- и Т-типу экзона-4 гена *VRN-A1*. Ампликоны,

Table 1. Primers for PCR

Primer	Sequence (5'–3')	Designed by	Annealing temperature, °C	Amplicon	Allele/haplotype	Amplicon size, bp
VRN1AF	gaaaggaaaaattctgctcg	Yan et al., 2004a	58	VRN-A1 promoter	<i>vrn-A1</i>	713
VRN1-INT1R	gcaggaaatcgaaatcgaa				<i>Vrn-A1a.1</i>	944
					<i>Vrn-A1a.2</i>	924, 944
					<i>Vrn-A1a.3</i>	765
					<i>Vrn-A1b</i>	691
					<i>Vrn-A1d</i>	685
					<i>Vrn-A1e</i>	659
					<i>Vrn-A1f</i>	658
					<i>Vrn-A1i</i>	713
					<i>Vrn-A1k</i>	755
					<i>vrn-A^m1</i>	705
					<i>Vrn-A^m1g</i>	681
					<i>Vrn-A^m1a</i>	671
					<i>vrn-A^m1b</i>	656
Vrn-A1-intr_F	ccgtcgaaaggatcgctactg	Muterko et al., 2016	60	VRN-A1 intron-1	<i>vrn-A1</i>	541
Vrn-A1-intr_R1	cttgccccgtgagctacttac					
Ex1/C/F	gttctccaccgagtcatggt	Fu et al., 2005	56	VRN-A1 intron-1	<i>Vrn-A1c</i> (Langdon)	522
Intr1/A/R3	aagtaagacaacacgaatgtgaga				<i>Vrn-A1c</i> (IL369)	2188
Ex4F2m3	ttgttccttctgtccaacc	Eagles et al., 2011 (with modifications)	60	VRN-A1/VRN-D4 exons-3-4	Ex4(C/T)	389
Ex4R	cttgctgaacttctctgc				Ex4C.f	387
Ex4FA	ttcacctctagcctacccaac		58	VRN-A1/VRN-D4 exons-3-4	Ex4(C/T)	523
Ex4R	cttgctgaacttctctgc				Ex4C.f	521
Ex4F2m3	ttgttccttctgtccaacc		59	VRN-D4 exons-3-4	VRN-D4	265
V4/R2m3	ccagttgctgcaactccagg					
Ex4outV4F2m3	cctgtcccacccaagtacta		57	VRN-A1 exons-3-4	Ex4(C/T)	380
Ex4R	cttgctgaacttctctgc				Ex4C.f	378
Ex4F2m3	ttgttccttctgtccaacc		58	VRN-A1/VRN-D4 exons-3-5	Ex4C.sph	592
Ex4AR245m3	gaccagttcgaataccgaagaa				Ex4C.f	588
					Ex4C.m/ Ex4T	591
					Ex4C.s	590
Ex4outV4F2m3	cctgtcccacccaagtacta		57	VRN-A1 exons-3-5	Ex4C.sph	583
Ex4AR245m3	gaccagttcgaataccgaagaa				Ex4C.f	579
					Ex4C.m/ Ex4T	582
					Ex4C.s	581

идентифицирующие гаплотип Ex4T, содержат А-тракт длиной 5 п. н., локализованный вблизи центра фрагмента, и мигрируют аномально медленно в результате более сильного изгиба молекулы ДНК (см. рис. 1), в то время как у фрагментов Ex4C А-тракт нарушен вследствие мутации центрального нуклеотида, что нивелирует кривизну на данном участке. Разница между фрагментами ПЦР гаплотипов Ex4C (GenBank: KU844092, KT983448) и Ex4T (GenBank: KU844091), измеренная относительно маркера молекулярного веса, составляла до 50 п. н. в условиях электрофореза, усиливающих аномально медленную ми-

грацию искривленных молекул ДНК, при этом различие в скорости миграции этих фрагментов не наблюдалось в агарозных гелях и при проведении электрофореза в ПААГ в стандартных условиях. Таким образом, ПЦР-фрагменты альтернативных гаплотипов экзона-4 можно было достоверно обозначить, подтверждая эффективность применения разработанного метода для идентификации дикого (Ex4C) и мутантного (Ex4T) типа четвертого экзона гена *VRN-A1*.
В нескольких образцах ампликоны, детектирующие гаплотип Ex4C, обладали более высокой скоростью ми-

грации (см. рис. 1), данный вариант гаплотипа обозначен как Ex4C.f (GenBank: KT983449). В результате сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов Ex4C и Ex4C.f установлено, что гаплотип Ex4C.f характеризуется 2 п. н. делецией и ОНП (C→G) в области интрона-4. Кроме того, данная делеция локализована в структуре А-тракта и приводит к сокращению его длины от 7 до 5 п. н., что сопровождается уменьшением угла изгиба и распрямлением молекулы ДНК (см. рис. 1). Гаплотип Ex4Cf был ассоциирован с доминантным аллелем *Vrn-A1a* (*Vrn-A1a.1/2*), а также аллелями *Vrn-A1e* и *Vrn-A1i*. Кроме того, два образца тетраплоидной пшеницы вида *T. dicoccoides* (PI 352322, UA0300256), образец гексаплоидной пшеницы вида *T. spelta* (UA0300246) и *T. aestivum* (TRI 3088), несущие рецессивный аллель *vrn-A1*, также характеризовались гаплотипом Ex4Cf.

Данные анализа наиболее распространенных в полиплоидной пшенице доминантных аллелей гена *VRN-A1* (*Vrn-A1a/b/c/e/i*), идентифицированных в исследуемом генетическом материале, были дополнены результатами анализа находящихся в открытом доступе нуклеотидных последовательностей большинства известных аллелей гена *VRN-A1*, в том числе аллелей, идентифицированных в диплоидной пшенице *T. monosocum* (*Vrn-A^m1a/b/f/g/h*). Установлено, что все доминантные аллели гена *VRN-A1* характеризуются интактным экзон-4 с гаплотипом Ex4C или Ex4C.f.

Мутантный гаплотип Ex4T идентифицирован только в образцах гексаплоидной пшеницы, несущих рецессивный аллель *vrn-A1*. За исключением образца TRI 290 (GenBank: KX874601), гаплотип Ex4T детектирован только в комбинации с Ex4C. В связи с этим предполагается, что мутантный тип экзона-4 (Ex4T) ассоциирован с наличием не менее чем двух копий гена *VRN-A1* с альтернативным гаплотипом экзона-4 на геном. Все тетраплоидные образцы вне зависимости от вида характеризовались исключительно диким типом экзона-4 (Ex4C и Ex4C.f). В гексаплоидной пшенице с рецессивным аллелем *vrn-A1* образцы с единичным гаплотипом Ex4C встречались крайне

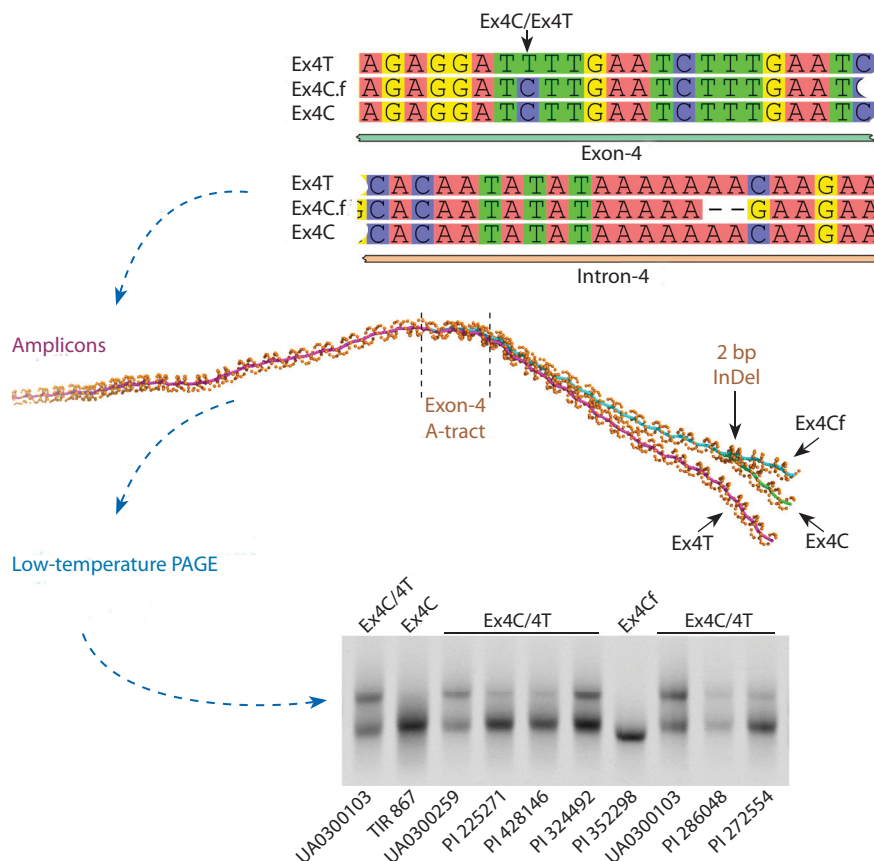


Fig. 1. Design of codominant markers for the *VRN-A1* exon-4 haplotypes based on changes in DNA molecule curvature.

редко и преобладали у вида *T. sphaerococcum*, а также в сортах *T. aestivum* из стран Западной Европы (Доп. материалы¹).

Новый аллель *Vrn-A1k* идентифицирован в тетраплоидной пшенице *T. dicoccum*. Согласно данным ДНК-маркерного анализа, образцы *T. dicoccum* (PI 191091 и PI 276015) несут доминантный аллель *Vrn-A1a.3* (Muterko et al., 2016), который содержит инсерцию мобильного генетического элемента в области промотора. Однако в настоящем исследовании установлено, что гаплотип Ex4C, идентифицированный в образцах PI 191091 и PI 276015 (GenBank: KU844093), не присущ аллелю *Vrn-A1a*, который характеризуется гаплотипом Ex4C.f. В связи с этим проведен анализ первичной структуры участка, охватывающего промотор, экзон-1 и частично интрон-1 гена *VRN-A1*, в данных образцах вида *T. dicoccum* (GenBank: KX874608). В результате анализа нуклеотидной последовательности ПЦР-фрагментов длиной около 760 п. н., полученных в ходе амплификации с парой праймеров VRN1AF и VRN1-INT1R, идентифицирована инсерция протяженностью 42 п. н. в области промотора гена *VRN-A1* (рис. 2).

Инсерция локализована в позиции –122 п. н. относительно предполагаемого для генов *VRN1* стартового кодона и не имеет аналогов среди известных аллелей гена *VRN-A1*. В структуре инсерции выделяется поли-А-тракт протяженностью 21 п. н., который фланкирован прямым повтором из 15 п. н. (CCCAACCACCTGATA), при этом повтор, локализованный со стороны 5'-конца, также фланкирован прямым повтором длиной 6 п. н. (TCCTCA) (см. рис. 2, в). Интересно, что прочтение последовательности, следующей сразу после поли-А-тракта, становится невозможным при чтении как с прямой, так и с обратной цепи вследствие наложения пиков флуоресценции на хромато-

¹ Дополнительные материалы см. в Приложении 1 по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2017-21/appx5.pdf>

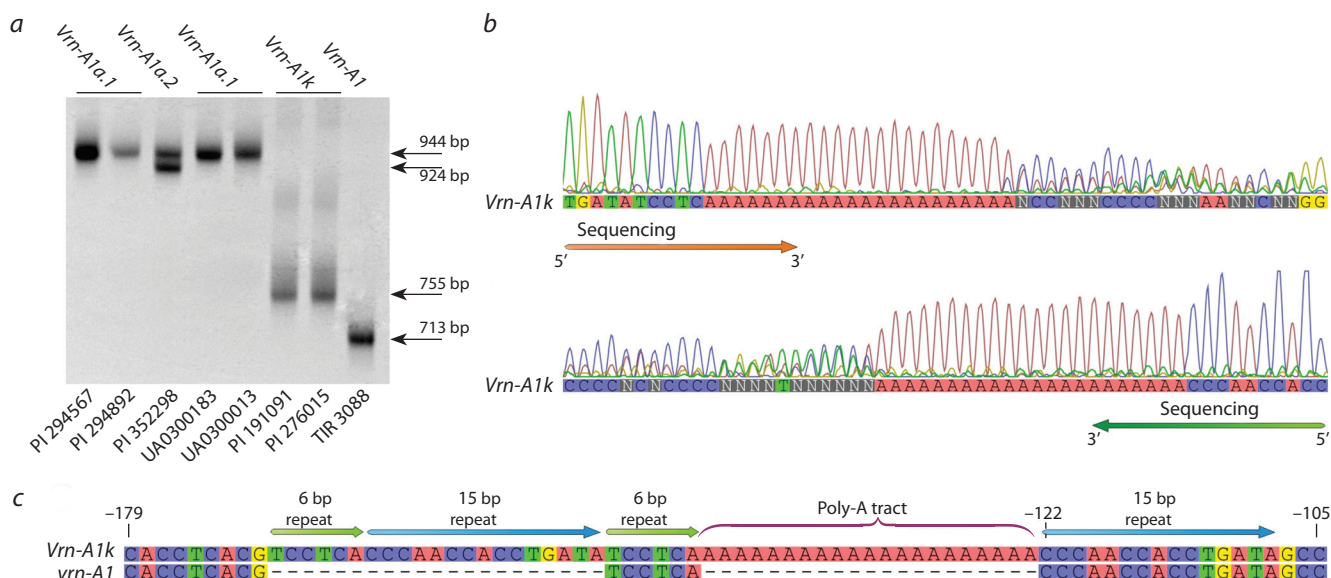


Fig. 2. Identification of the *Vrn-A1k* allele.

(a) PAGE of PCR fragments, obtained with primer pair VRN1AF/VRN1-INT1R in accessions carrying *Vrn-A1a*, *Vrn-A1k*, and *vrn-A1*. (b) DNA sequencing chromatograms of *Vrn-A1k*. (c) Insertion within the *Vrn-A1k* promoter region.

грамме (см. рис. 2, б). Это наблюдение свидетельствует о полиморфизме длины поли-А-тракта среди ампликонов. Действительно, при электрофорезе продуктов амплификации в ПАА гелях в месте локализации целевого фрагмента наблюдается шлейф, представленный фрагментами большей длины и их гетеродуплексами. Интересно, что минимальная длина поли-А-тракта в 21 п. н. соответствует двум виткам спирали ДНК, после чего следует дивергенция ампликонов.

По существующей номенклатуре, новый аллель обозначен как *Vrn-A1k*. Согласно паспортным данным, образцы PI 191091 и PI 276015 характеризуются яровым типом развития. Кроме того, ДНК-маркерный анализ не выявил в данных образцах доминантных аллелей генов *VRN-B1* и *VRN-B3* (Muterko et al., 2016). В связи с этим предполагается, что инсерция размером 42 п. н. в промоторе *Vrn-A1k* может быть ассоциирована со снижением потребности в яровизации и яровым типом развития пшеницы. Наконец, один из образцов *T. dicoccum* (PI 191091), несущий аллель *Vrn-A1k*, был выращен в тепличных условиях, в отсутствие яровизации, на удлинённом фотопериоде (24 ч) и генотипирован по генам *VRN-A1*, *VRN-B1* и *VRN-B3* с использованием ДНК-маркеров. В результате генотипирования не выявлено доминантных аллелей генов *VRN-B1* и *VRN-B3*. Время до колошения этого образца составило 92 дня, что хорошо согласуется со временем цветения, указанным в его паспорте (99 дней).

Идентификация гена *VRN-D4*. Ген *VRN-D4* представляет собой дубликацию гена *VRN-A1* в коротком плече хромосомы 5D, следовательно, он не характерен для тетраплоидных видов пшеницы, у которых D геном отсутствует. Доминантный и рецессивный аллели гена *VRN-D4* различаются по его присутствию или отсутствию соответственно.

Идентификацию гена *VRN-D4* осуществляли в ходе аллель-специфической ПЦР (АС-ПЦР) с прямым праймером Ex4F2m3 (используемым также в определении гаплотипа экзона-4) и аллель-специфическим обратным праймером V4/R2m3, разработанным к ОНП (C/A) в четвертом экзоне, по которому, согласно литературным данным, ген *VRN-D4* отличается от гена *VRN-A1* (Kippes et al., 2015). Целевой ПЦР-фрагмент 264 п. н., детектирующий *VRN-D4*, выявлен только у образцов вида *T. sphaerococcum* (за исключением образца C1tr 17737). Следовательно, идентифицированные в данных образцах гаплотипы экзона-4 включают в себя как гаплотипы гена *VRN-A1*, так и гаплотип гена *VRN-D4*, который отличается от гаплотипа Ex4C гена *VRN-A1* только одной трансверсией в экзоне-4 и не отличим от последнего при данных условиях анализа.

Дифференциация образцов с гаплотипом Ex4C по полиморфизму интрона-4 гена *VRN-A1*. Анализ интрона-4 выявил более 10 А-трактов, общая протяженность которых составляет около 30 % от его длины. Высокая плотность локализации А-трактов на данном участке повышает вероятность возникновения мутаций их первичной структуры. Изменение кривизны (формы) молекул ДНК, ассоциированное с полиморфизмом А-трактов, может быть впоследствии детектировано при электрофорезе в ПААГ. В связи с этим с целью повышения информативности ПЦР-анализа данного района гена *VRN-A1* и получения дополнительных гаплотипов участок амплификации был расширен в сторону 3'-конца на 200 п. н. Для этого был разработан специфичный к гену *VRN-A1* обратный праймер Ex4AR245m3 и проведена ПЦР в комбинации с праймером Ex4F2m3.

Электрофорез продуктов амплификации в ПАА геле идентифицировал пять целевых фрагментов ПЦР (рис. 3), соответствующих пяти различным гаплотипам

гена *VRN-A1* (GenBank: KX874600-KX874607). Выявлено расщепление гаплотипа Ex4C на четыре варианта (Ex4C.f, Ex4C.m, Ex4C.s, Ex4C.sph), которые могут быть четко различимы по изменению скорости миграции фрагментов ПЦР в ходе электрофореза в ПААГ. Анализ первичной структуры данных гаплотипов обнаружил полиморфизм А-тракта, локализованного в интроне-4. Минимальная длина А-тракта, равная 7 п. н., установлена для гаплотипов Ex4C.s и Ex4C.f. Гаплотипы Ex4C.m и Ex4C.sph характеризуются увеличением длины А-тракта до 8 и 9 п. н. соответственно. Длина А-тракта в гаплотипе Ex4T соответствует его продолжительности в гаплотипе Ex4C.m (8 п. н.).

Ускорение миграции ампликонов через ПАА гель, ассоциированное с увеличением длины А-тракта от 7 до 9 п. н., свидетельствовало об уменьшении кривизны соответствующих молекул ДНК (см. рис. 3). Кроме того, фрагменты, детектирующие гаплотип Ex4C.f, мигрировали на том же уровне, что и фрагменты Ex4C.sph. Оба полиморфных А-тракта в данных фрагментах (Ex4C.f и Ex4C.sph) локализованы приблизительно на одинаковом расстоянии от центра, а, следовательно, в случае равенства порождаемых ими углов изгиба будут оказывать одинаковое влияние на подвижность молекул ДНК. Таким образом, наблюдаемое изменение скорости миграции ПЦР-фрагментов альтернативных гаплотипов предполагает, что кривизна ДНК молекулы при длине А-тракта, равной 5 п. н., соответствует кривизне молекулы с длиной А-тракта, равной 9 п. н. Следовательно, можно утверждать, что максимальная кривизна А-тракта достигается, когда его длина равна 7 п. н., и пропорционально убывает при дальнейшем увеличении или уменьшении числа А-Т пар нуклеотидов (при одинаковом нуклеотидном окружении и идентичных условиях).

Дополнительно выявленные гаплотипы Ex4C.m и Ex4C.sph идентифицированы исключительно в гексаплоидной пшенице наряду с гаплотипами Ex4C.s, Ex4C.f и Ex4T, при этом гаплотип Ex4C.sph (GenBank: KX874600) обнаружен только в образцах *T. shaeerococcum* и только в комбинации с гаплотипом Ex4T (табл. 2).

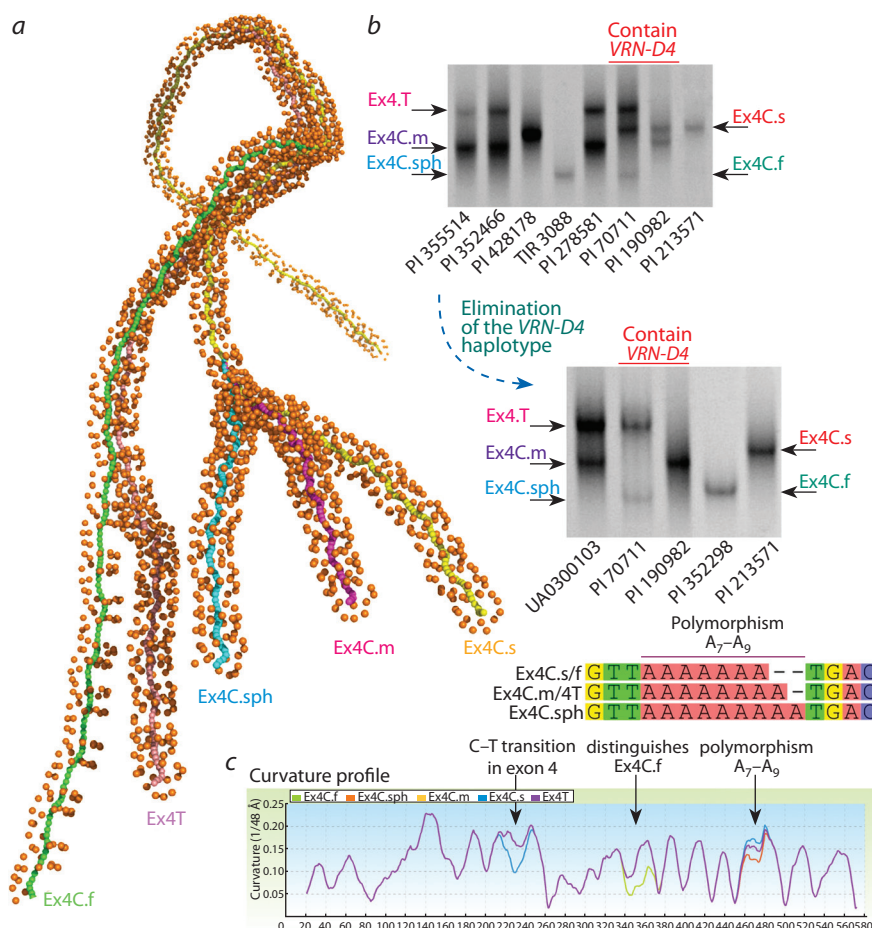


Fig. 3. The *VRN-A1* haplotypes identified by PCR with primer pair Ex4F2m3/Ex4AR245m3.

(a) Superposition of predicted paths of DNA molecules for *VRN-A1* exon-4 haplotypes. (b) Electrophoresis of PCR fragments of five *VRN-A1* and *VRN-D4* haplotypes. (c) Curvature profiles in the DNA molecules of alternative haplotypes.

Таким образом, гексаплоидная пшеница включает в себя полный набор анализируемых гаплотипов *VRN-A1*, при этом гаплотипы Ex4C.m и Ex4C.sph являются демаркационными по отношению к тетраплоидным видам пшеницы, а гаплотип Ex4C.sph выделяет вид *T. shaeerococcum* из гексаплоидных пшениц. В образцах, содержащих не менее двух копий гена *VRN-A1* с различным типом экзона-4 (Ex4C, Ex4T), гаплотип Ex4T был ассоциирован с гаплотипом Ex4C.m, но не наоборот, поскольку выявлены образцы гексаплоидной пшеницы вида *T. aestivum* (TRI 834, TRI 1948, TRI 3111) и *T. shaeerococcum* (PI 190982, PI 278650), несущие только гаплотип Ex4C.m гена *VRN-A1*. В связи с этим предполагается, что гаплотип Ex4T дивергировал из гаплотипа Ex4C.m.

Для определения гаплотипов гена *VRN-A1* в образцах *T. shaeerococcum* (PI 277142, PI 70711, PI 324492, PI 190982 и PI 278650), несущих ген *VRN-D4* и детектирующих два и более ампликона с различной скоростью миграции в ПАА гелях (гаплотипы Ex4C.sph, Ex4Cs и Ex4T в образцах PI 277142, PI 70711, PI 324492, и гаплотипы Ex4C.m и Ex4Cs в образцах PI 190982, PI 278650), был разработан аллель-специфический праймер Ex4FoutV4, исключающий амплификацию последовательности гена *VRN-D4* вследствие частичной потери комплементарности 3'-конца праймера с ДНК-матрицей, что обусловлено наличием ОНП и искусственно введенного некомплементарного нуклеотида (мисмэтча). Несмотря на то, что последовательность праймера, идентичная участку гена *VRN1* из А генома (за исключением искусственного мисмэтча),

Table 2. Occurrence of exon 4 haplotypes in polyploid wheat accessions carrying different *VRN-A1* alleles

Allele	<i>VRN-A1</i> exon 4 haplotype	Tetraploid wheat	Hexaploid wheat
<i>vrn-A1</i>	Ex4C.f	2	2
	Ex4C.m	0	5
	Ex4C.s	10	8
	Ex4C.sph/4T	0	3
	Ex4C.m/4T	0	46
	Ex4T	0	1
<i>Vrn-A1a</i>	Ex4C.f	2	6
<i>Vrn-A1b.1-6</i>	Ex4C.s	35	11
<i>Vrn-A1e</i>	Ex4C.f	3	0
<i>Vrn-A1i</i>	Ex4C.f	5	0
<i>Vrn-A1k</i>	Ex4C.s	2	0
<i>Vrn-A1c</i> (Langdon)	Ex4C.s	17	0

отличается от аналогичных участков этого гена из В и D геномов пшеницы только двумя ОНП, локализованными вблизи центра праймера, продукты амплификации гена *VRN1* из В и D геномов при использовании общего для трех геномов обратного праймера не наблюдались даже при температуре отжига ниже 56 °С. Тем не менее Ex4FoutV4 был применен в комбинации с обратным праймером Ex4AR, который специфичен к гену *VRN-A1*. Анализ продуктов амплификации в ПААГ не выявил фрагментов, детектирующих гаплотип Ex4C.s (см. рис. 3). Следовательно, ген *VRN-A1* в образцах *T. shaerococcum* PI 277142, PI 70711 и PI 324492 представлен вариантами с гаплотипами Ex4C.sph и Ex4T, тогда как образцы PI 190982 и PI 278650 несут гаплотип Ex4C.m гена *VRN-A1*, а гаплотип Ex4Cs в данных образцах принадлежит гену *VRN-D4*. Кроме того, локализация прямого праймера Ex4FoutV4 приводит к смещению локального изгиба молекулы ДНК, индуцируемого полиморфным А-трактом (A₇–A₉), ближе к центру фрагмента, что сопровождается более симметричным распределением глобальной кривизны молекулы. Предполагается, что симметричная кривизна сглаживает зависимость силы сопротивления гелевой матрицы от ориентации молекулы. Поэтому скорость миграции молекул ДНК для фрагментов, детектирующих гаплотип Ex4C.f, у которых изгиб в области данного А-тракта больше, чем у ампликонов Ex4C.sph, снижается.

Обсуждение

В нашем предыдущем исследовании участка промотора гена *VRN-A1* были оптимизированы условия для наблюдения конформационного полиморфизма ДНК, что позволило дискриминировать аллельные варианты, различающиеся между собой по ОНП в пределах аденинового тракта (Muterko et al., 2016). В настоящем исследовании модуляция кривизны молекул ДНК, обусловленная полиморфизмом А-трактов, взята за основу для разработки особого типа кодоминантных ДНК-маркеров, позволяющих в ходе одной реакции качественно различить альтернативные аллели, представленные в различных копиях данного гена.

Известно, что относительная подвижность изогнутых молекул ДНК через ПАА гель линейно зависит от квадрата их кривизны (Koo et al., 1988). Следовательно, для фрагментов ДНК одинаковой длины можно получить существенную разницу в скорости миграции, достаточную для их достоверного разграничения в ходе анализа, если их кривизна будет модулирована с максимальной амплитудой. Пару праймеров для проведения ПЦР подбирали таким образом, чтобы полиморфный А-тракт располагался вблизи центра целевых фрагментов, что обеспечивает оптимальную амплитуду модуляции глобальной кривизны и скорости миграции соответствующих молекул ДНК через ПАА гель. Смещение локального изгиба, индуцированного А-трактом, к центру молекулы ДНК приводит к ее более симметричному глобальному изгибу и сглаживанию зависимости силы сопротивления гелевой матрицы от ориентации молекулы. Кроме того, поскольку замедление молекул ДНК в геле находится в экспоненциальной зависимости от их длины, то вероятно, что для фрагментов большей длины изменение кривизны их молекул оказывает более сильное влияние на изменение скорости миграции через ПАА гель. Увеличение размера анализируемого участка значительно повысило информативность анализа и привело к насыщению выборки дополнительными гаплотипами гена *VRN-A1*. В результате было получено расщепление по гаплотипу среди образцов, характеризующихся только одним, диким, типом экзона-4 гена *VRN-A1*. Кроме того, увеличилась разница в скорости миграции альтернативных гаплотипов, что позволило более точно идентифицировать фрагменты ПЦР, детектирующие гаплотип Ex4C.f. Благодаря дополнительно выявленному гаплотипу Ex4C.m, удалось установить филогенетическую линию, в которой дивергировал гаплотип Ex4T и произошло двухэтапное событие мультипликации гена *VRN-A1* в две, а затем три копии последовательно.

В настоящее время предложено несколько ДНК-маркеров, идентифицирующих гаплотипы экзона-4 и 7 гена *VRN-A1*, большинство из них основаны на методе рестрикционного анализа фрагментов ПЦР (Chen et al., 2009; Eagles et al., 2011; Li et al., 2013; Yan et al., 2015). В неко-

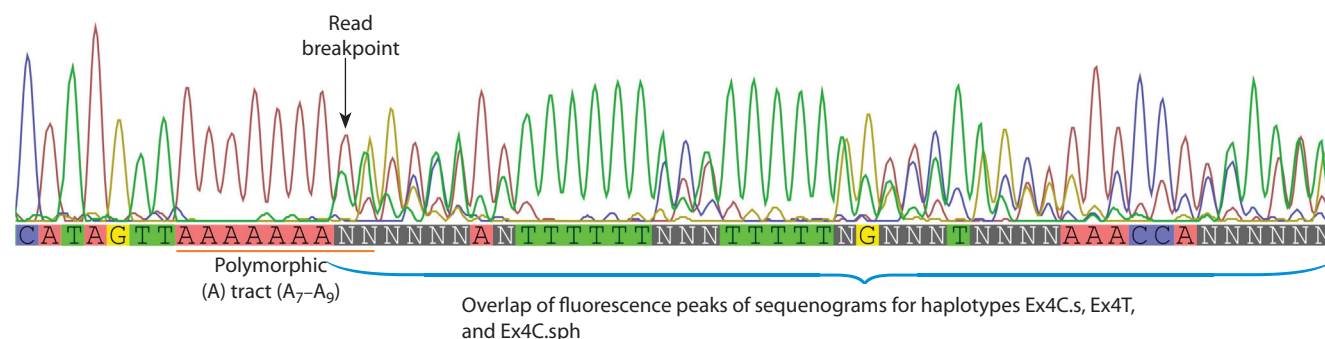


Fig. 4. Part of DNA sequencing chromatogram of PCR products obtained with primer pair Ex4F2m3/Ex4AR245m3 for *T. sphaerococcum* accession PI 70711.

The position of breakpoint of reading of the DNA sequence arising from the overlap of fluorescence peaks of three different *VRN-A1* and *VRN-D4* haplotypes is indicated.

торых исследованиях гаплотип экзона-4 выявляли в ходе анализа хроматограмм секвенирования соответствующих ампликонов (Zhang et al., 2015) или субклонов (Chen et al., 2013), а также с использованием KASP-генотипирования (Díaz et al., 2012). В отличие от предложенных в настоящем исследовании способов, они более трудоемкие, экономически затратные и требуют больше времени для получения результата, поскольку содержат большее число этапов анализа. В большинстве случаев маркеры являются доминантными. Кроме того, они не позволяют определить предполагаемое соотношение копий с альтернативным гаплотипом экзона-4. С их помощью не представляется возможным выполнить все вышеизложенное с поправкой на присутствие гена *VRN-D4* или доминантного аллеля *VRN-A1* в гетерозиготных образцах.

Исследование полиморфизма экзона-4 осложняется наличием нескольких копий гена *VRN-A1* с различными гаплотипами в разных соотношениях. В предыдущих исследованиях идентификация образцов, несущих одновременно дикий и мутантный типы четвертого экзона, проводилась по наличию двойного пика на хроматограмме секвенирования (Díaz et al., 2012; Zhang et al., 2015). Однако не всегда удается четко отличить такую область хроматограммы от шума, особенно в случаях, где число копий с различными гаплотипами экзона-4 неодинаково. Кроме того, как было показано в настоящем исследовании, наличие в одной из копий хотя бы 1 п. н. делеции/инсерции приводит к невозможности дальнейшего прочтения хроматограммы секвенирования вследствие наложения пиков флуоресценции фрагментов разной длины и требует разбиения последовательности на несколько частей, при этом участок локализации делеции/инсерции выпадает из анализа. На рис. 4 проиллюстрирована часть хроматограммы, которая охватывает участок локализации полиморфного А-тракта (A_7-A_9) в интроне-4 гена *VRN-A1* полученных в ходе секвенирования продуктов амплификации с парой праймеров Ex4F2m3 и Ex4AR245m3 образца *T. sphaerococcum* (PI 70711), несущего три альтернативных гаплотипа и ген *VRN-D4*. Из рис. 4 видно, что полиморфизм А-тракта (A_7-A_9) приводит к смешению пиков флуоресценции из разных копий и в результате к наложению и перекрыванию их спектров, это делает невозможным

прочтение первичной структуры после сайта локализации делеции. Наконец, секвенирование требует больше времени на пробоподготовку и проведение самой процедуры.

Анализируемый в настоящем исследовании участок гена *VRN-A1* является относительно консервативным между гомеологичными генами *VRN1*, что требовало разработку особого типа праймеров к однонуклеотидному полиморфизму и оптимизацию ПЦР для получения целевых фрагментов. Аллель-специфические праймеры Ex4F2m3, V4/R2m3, Ex4outV4F2m3 и Ex4AR245m3 были разработаны таким образом, что ОНП-мутация, различающая гомеологичные гены *VRN1*, а также ген *VRN-D4*, локализована во второй позиции относительно 3'-конца праймера. Кроме того, искусственное нарушение комплементарности было создано в позиции 3 (от 3'-конца) для дополнительной дестабилизации двойной спирали ДНК при условии отсутствия комплементарности в соседней позиции 2. Искусственно введенный, некомплементарный, нуклеотид подбирался исходя из окружающей его нуклеотидной последовательности и в соответствии с данными о влиянии типа некомплементарной пары нуклеотидов на стабильность двойной спирали (Liu et al., 2012). Предполагается, что присутствие неспаренного нуклеотида во второй позиции от 3'-конца праймера приводит к расплетению спирали ДНК, которое охватывает три нуклеотида (с 1-го по 3-й нуклеотид от 3'-конца праймера), исключая тем самым возможность элонгации цепи ДНК-полимеразой. Если же ДНК-матрица содержит нуклеотид, комплементарный нуклеотиду во второй позиции от 3'-конца праймера, то единственная некомплементарная пара в позиции 3 (от 3'-конца) не оказывает значительного влияния на эффективность отжига праймера и возможность последующей его элонгации в ходе ПЦР (Liu et al., 2012). В ходе ПЦР-анализа с участием любого из аллель-специфических праймеров не выявлено нецелевых продуктов реакции, обусловленных амплификацией альтернативных аллелей, различающихся по ОНП в сайте отжига праймера. В связи с этим предполагается, что локализация ОНП во второй позиции и введение искусственного некомплементарного нуклеотида в третью позицию относительно 3'-конца могут стать общим правилом при разработке аллель-специфических праймеров

для маркирования однонуклеотидного полиморфизма вне зависимости от объекта исследования.

В предыдущих исследованиях полиморфизм экзона-4 гена *VRN-A1* анализировали в небольшой выборке образцов одного вида гексаплоидной пшеницы (*T. aestivum*). В настоящей работе не только расширено количество видов гексаплоидной пшеницы, но также добавлены и широко распространенные тетраплоидные виды. В результате удалось охватить все наиболее часто привлекаемые в селекцию виды полиплоидной пшеницы, а также все встречающееся в них разнообразие аллелей гена *VRN-A1*. В ходе анализа 11 видов пшеницы идентифицирован лишь один образец, который несет мутантный экзон-4 (гаплотип Ex4T) в одиночном представлении. В связи с этим нельзя исключить вероятность того, что данный образец является мутантом, в котором одна из копий гена *VRN-A1* содержит изменения в первичной структуре анализируемого участка. Во всех остальных случаях гаплотип Ex4T выявлен только в комбинации с гаплотипом Ex4C.m и только в образцах гексаплоидной пшеницы с интактным промотором и интроном-1 гена *VRN-A1* (рецессивный аллель *vrn-A1*). Следовательно, можно утверждать, что полиморфизм А-тракта в четвертом экзоне *VRN-A1* наблюдается исключительно в образцах гексаплоидной пшеницы, содержащих не менее двух копий этого гена. Кроме того, скрининг доступных в GenBank последовательностей экзона-4 гена *VRN-A1* выявил гаплотип Ex4C.s в образцах диплоидной пшеницы видов *T. monococcum* и *T. urartu*, что также подтверждает его более раннее происхождение и характеризует как дикий тип, в то время как мутантный гаплотип Ex4T дивергировал после аллополиплоидизации из рецессивного аллеля *vrn-A1* с гаплотипом Ex4C.m в гексаплоидной пшенице. Таким образом, в образцах гексаплоидной пшеницы, детектирующих гаплотип Ex4T, присутствие гена *VRN-D4* или доминантного аллеля *VRN-A1* в гетерозиготе может быть установлено по наличию специфического для них гаплотипа Ex4C.s (или Ex4C.f для аллеля *Vrn-A1a*).

Ранее было показано, что *Vrn-A1a* и *Vrn-A1b* имеют гаплотип Ex4C (Eagles et al., 2011). Тем не менее в литературных источниках отсутствуют данные о полиморфизме экзона-4 в большинстве других аллелей гена *VRN-A1*. Тогда же было высказано предположение, что аллели *Vrn-A1a* и *Vrn-A1b* имеют общего ближайшего предка с интактным промотором гена *VRN-A1* (Eagles et al., 2011). В настоящем исследовании установлено, что все доминантные аллели гена *VRN-A1* имеют гаплотип дикого типа Ex4C.s или Ex4C.f. Кроме того, показано, что, несмотря на то, что аллели *Vrn-A1a* и *Vrn-A1b* характеризуются идентичными последовательностями экзона-4, происходят они из разных филологических линий, узлы которых представлены гаплотипами Ex4C.s и Ex4C.f соответственно.

Недавнее исследование более 1100 озимых сортов мягкой пшеницы показало, что только около 7 % несут одну копию *VRN-A1*, тогда как подавляющее большинство сортов содержат практически с равной вероятностью две или три копии этого гена, и только в трех сортах (0.3 %) детектировано четыре копии *VRN-A1* (Würschum et al., 2015). Однако оно проводилось без учета присутствия гена *VRN-D4*, следовательно, нельзя утверждать, что в сортах,

для которых выявлено четыре копии гена *VRN-A1*, одна из копий не является геном *VRN-D4*, поскольку участок ДНК, анализируемый для определения числа копий, идентичен для обоих генов. В настоящем исследовании среди образцов гексаплоидной пшеницы с рецессивным аллелем *vrn-A1* 75 % образцов несли одновременно оба, дикий и мутантный, типа экзона-4 (Ex4C/Ex4T), следовательно, обладали не менее чем двумя копиями гена *VRN-A1*. Образцы с предположительно одной копией рецессивного аллеля *vrn-A1* (гаплотипы Ex4C.f, Ex4C.s или Ex4C.m) идентифицированы главным образом в образцах вида *T. sphaerococcum*, а также в сортах *T. aestivum* из стран Западной Европы, что согласуется с результатами исследования (Würschum et al., 2015) по распространению сортов мягкой пшеницы *T. aestivum* с различной копийностью гена *VRN-A1*.

Поскольку в данной работе установлено, что дикий тип экзона-4 (гаплотип Ex4C) характерен для гена *VRN-D4*, гена *VRN-A1* в тетраплоидной и, вероятно, диплоидной пшенице, а также для известных доминантных аллелей *VRN-A1*, то необходимость в идентификации гаплотипов экзона-4 существует только для гексаплоидной пшеницы, несущей рецессивный аллель *vrn-A1*.

В нашем предыдущем исследовании генов *VRN1* в гексаплоидных и тетраплоидных видах пшеницы, согласно результатам ДНК-маркерного анализа, аллель *Vrn-A1a.3* был ошибочно идентифицирован в образцах *T. dicoccum* PI 191091 и PI 276015 (Muterko et al., 2016). Однако установленные в этой работе ассоциации между гаплотипами и аллелями гена *VRN-A1* поставили под сомнение ранее полученные результаты. Анализ первичной структуры фрагментов ПЦР данных образцов *T. dicoccum* выявил новый аллель, *Vrn-A1k*, характеризующийся инсерцией длиной 42 п. н. в области промотора гена *VRN-A1*. Инсерция локализована на участке, который не перекрывается мутациями, идентифицированными в известных аллелях гена *VRN-A1*, что повышает значимость аллеля *Vrn-A1k* в исследовании локализации регуляторных сайтов и анализе влияния полиморфизма различных участков промотора на транскрипционную активность генов *VRN1*. Согласно паспортным данным, образцы PI 191091 и PI 276015 относятся к яровым. Кроме того, в данных образцах не обнаружено доминантных аллелей генов *VRN-B1* и *VRN-B3* (Muterko et al., 2016). Это дает основание предположить, что аллель *Vrn-A1k* обуславливает яровой тип развития. Хотя генетический анализ будет необходим для подтверждения связи между присутствием аллеля *Vrn-A1k* и отсутствием потребности в яровизации, тем не менее наличие в данных образцах гипотетических генов, не аллельных *VRN*, но с сопоставимым влиянием на отзывчивость к яровизации кажется мало вероятным.

Acknowledgments

This work was supported by the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, integrated program II.2, project 0324-2015-0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Chen F., Gao M., Zhang J., Zuo A., Shang X., Cui D. Molecular characterization of vernalization and response genes in bread wheat from the Yellow and Huai Valley of China. *BMC Plant Biol.* 2013;13:199. DOI 10.1186/1471-2229-13-199.
- Chen Y., Carver B.F., Wang S., Zhang F., Yan L. Genetic loci associated with stem elongation and winter dormancy release in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2009;118(5):881-889. DOI 10.1007/s00122-008-0946-5.
- Danyluk J., Kane N.A., Breton G., Limin A.E., Fowler D.B., Sarhan F. TaVRT-1, a putative transcription factor associated with vegetative to reproductive transition in cereals. *Plant Physiol.* 2003;132(4):1849-1860. DOI 10.1104/pp.103.023523.
- Dhillon T., Pearce S.P., Stockinger E.J., Distelfeld A., Li C., Knox A.K., Vashegyi I., Vágújfalvi A., Galiba G., Dubcovsky J. Regulation of freezing tolerance and flowering in temperate cereals: the *VRN-1* connection. *Plant Physiol.* 2010;153(4):1846-1858. DOI 10.1104/pp.110.159079.
- Díaz A., Zikhali M., Turner A.S., Isaac P., Laurie D.A. Copy number variation affecting the *Photoperiod-B1* and *Vernalization-A1* genes is associated with altered flowering time in wheat (*Triticum aestivum*). *PLoS ONE.* 2012;7(3):e33234. DOI 10.1371/journal.pone.0033234.
- Diekmann S. Analyzing DNA curvature in polyacrylamide gels. *Methods Enzymol.* 1992;212:30-46. DOI 10.1016/0076-6879(92)12004-A.
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 1987;19:11-15.
- Eagles H.A., Cane K., Trevaskis B. Veery wheats carry an allele of *Vrn-A1* that has implications for freezing tolerance in winter wheats. *Plant Breeding.* 2011;130:413-418. DOI 10.1111/j.1439-0523.2011.01856.x.
- Fu D., Szucs P., Yan L., Helguera M., Skinner J., Hayes P., Dubcovsky J. Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Mol. Gen. Genomics.* 2005;273(4):54-65. DOI 10.1007/s00438-004-1095-4.
- Kippes N., Debernardi J.M., Vasquez-Gross H.A., Akpinar B.A., Budak H., Kato K., Chao S., Akhunov E., Dubcovsky J. Identification of the *VERNALIZATION 4* gene reveals the origin of spring growth habit in ancient wheats from South Asia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015;112(39):E5401-E5410. DOI 10.1073/pnas.1514883112.
- Koo H.S., Crothers D.M. Calibration of DNA curvature and a unified description of sequence-directed bending. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988;85:1763-1767.
- Koo H.S., Wu H.M., Crothers D.M. DNA bending at adenine-thymine tracts. *Nature.* 1986;320(6062):501-506. DOI 10.1038/320501a0.
- Li G., Yu M., Fang T., Cao S., Carver B.F., Yan L. Vernalization requirement duration in winter wheat is controlled by TaVRN-A1 at the protein level. *Plant J.* 2013;76(5):742-753. DOI 10.1111/tpj.12326.
- Liu J., Huang S., Sun M., Liu S., Liu Y., Wang W., Zhang X., Wang H., Hua W. An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application. *Plant Methods.* 2012;8(1):34. DOI 10.1186/1746-4811-8-34.
- Lupas A., Van Dyke M., Stock J. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science.* 1991;252(5009):1162-1164. DOI 10.1126/science.252.5009.1162.
- Marini J.C., Levene S.D., Crothers D.M., Englund P.T. Bent helical structure in kinetoplast DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982;79(24):7664-7668.
- Muterko A., Kalendar R., Cockram J., Balashova I. Discovery, evaluation and distribution of haplotypes and new alleles of the *Photoperiod-A1* gene in wheat. *Plant Mol. Biol.* 2015;88(1-2):149-164. DOI 10.1007/s11103-015-0313-2.
- Muterko A., Kalendar R., Salina E. Novel alleles of the *VERNALIZATION1* genes in wheat are associated with modulation of DNA curvature and flexibility in the promoter region. *BMC Plant Biol.* 2016;16(1):9. DOI 10.1186/s12870-015-0691-2.
- Santelli E., Richmond T.J. Crystal structure of MEF2A core bound to DNA at 1.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 2000;297(2):437-449. DOI 10.1006/jmbi.2000.3568.
- Treisman R. The serum response element. *Trends Biochem. Sci.* 1992;17(10):423-426. DOI 10.1016/0968-0004(92)90013-Y.
- Würschum T., Boeven P.H., Langer S.M., Longin C.F., Leiser W.L. Multiply to conquer: Copy number variations at *Ppd-B1* and *Vrn-A1* facilitate global adaptation in wheat. *BMC Genet.* 2015;29:16-96. DOI 10.1186/s12863-015-0258-0.
- Yan L., Fu D., Li C., Blechl A., Tranquilli G., Bonafede M. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006;103(51):19581-19586. DOI 10.1073/pnas.0607142103.
- Yan L., Helguera M., Kato K., Fukuyama S., Sherman J., Dubcovsky J. Allelic variation at the VRN1 promoter region in polyploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2004a;109(8):1677-1686. DOI 10.1007/s00122-004-1796-4.
- Yan L., Li G., Yu M., Fang T., Cao S., Carver B.F. Genetic mechanisms of vernalization requirement duration in winter wheat cultivars. *Advances in Wheat Genetics: From Genome to Field.* Eds. Y. Ogihara, S. Takumi, H. Handa. 2015;13:117-125. DOI 10.1007/978-4-431-55675-6_13.
- Yan L., Loukoianov A., Blechl A., Tranquilli G., Ramakrishna W., SanMiguel P., Bennetzen J., Echenique V., Dubcovsky J. The wheat *VRN2* gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science.* 2004b;303(5664):1640-1644. DOI 10.1126/science.1094305.
- Yan L., Loukoianov A., Tranquilli G., Helguera M., Fahima T., Dubcovsky J. Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003;100(10):6263-6268. DOI 10.1073/pnas.0937399100.
- Yang Y., Jack T. Defining subdomains of the K domain important for protein-protein interactions of plant MADS proteins. *Plant Mol. Biol.* 2004;55:45-59. DOI 10.1007/s11103-004-0416-7.
- Zhang X., Gao M., Wang S., Chen F., Cui D. Allelic variation at the vernalization and photoperiod sensitivity loci in Chinese winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). *Front. Plant Sci.* 2015;6:470. DOI 10.3389/fpls.2015.00470.