Использование ПЦР-анализа для маркирования генов семейства *Cbf*, контролирующих низкотемпературную акклиматизацию у ячменя и мягкой пшеницы

И. А. Балашова, М. С. Бальвинская, В. И. Файт[1], М. В. Галаева, Ю. М. Сиволап

Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН
Овидиопольская дор., 3, Одесса, 65036, Украина

[1]Селекционно-генетический институт УААН
Овидиопольская дор., 3, Одесса, 65036, Украина

genom2005@ukr.net

Методом ПЦР проанализирован молекулярно-генетический полиморфизм ДНК для выявления ДНК-маркеров гена Cbf2 у близких по происхождению видов Hordeum vulgare L. и Triticum aestivum L. Показан полиморфизм ДНК сортов ячменя и мягкой пшеницы, контрастных по низкотемпературной толерантности. Детектируемый в данном эксперименте полиморфизм между яровыми и озимыми генотипами не обусловлен различиями по типу развития. Высказано предположение о том, что наличие выявляемых полиморфных локусов ДНК коррелирует с присутствием различнх аллелей гена Cbf2 у генотипов с высокой и низкой устойчивостью к холодовому стрессу. Рассмотрена возможность использования ПЦР для детекции слабоморозостойких генотипов мягкой пшеницы.

Ключевые слова: ячмень, пшеница, морозостойкость, Cbf-гены, ПЦР.

Введение. Низкая температура является одним из наиболее важных абиотических факторов, негативно влияющих на распространение и урожай растений. Тропические и субтропические виды не приспособлены к существованию при температурах ниже 10 °С, в то время как растения умеренного климата, в частности злаки, выживают в условиях ее существенного понижения [1, 2]. Способность переносить значительное снижение температуры обусловлена двумя защитными механизмами – яровизацией и низкотемпературной акклиматизацией. Последняя проходит при низких положительных температурах и является этапом, необходимым для перестройки метаболизма и подготовки растения к длительному воздействию отрицательных температур. Так, например, пшеница, растущая в нормальных температурных условиях, при резком охлаждении до –5 °С погибает, тогда как при предварительной акклиматизации может выдерживать температуру до –20 °С и ниже [3]. Изменение температурного режима приводит к уменьшению или прекращению роста растения, резкому возрастанию концентрации ионов Ca^{2+}, изменению проницаемости мембран и их липидного состава, увеличению уровня содержания антиоксидантов и абсцизовой кислоты, уменьшению содержания воды в тканях, изменению состава сахаров и многим другим процессам [4–6] .

И. А. БАЛАШОВА, М. С. БАЛЬВИНСКАЯ, В. И.ФАЙТ, М. В. ГАЛАЕВА, Ю. М. СИВОЛАП, 2008

Ответная реакция организма на неблагоприятные факторы обусловлена изменением генной экспрессии. Известно, что низкотемпературная толерантность контролируется множеством генов, экспрессия которых имеет каскадный характер. Известны работы с использованием методов молекулярного анализа, в которых показано, что низкая температура индуцирует ряд стрессовых генов, где одними из первых в каскадный процесс включаются гены семейства *Cbf* [7].

Cbf-гены кодируют белки – факторы транскрипции некоторых генов семейств *Cor*, *Lea*, *Wcs* и др., объединенных в *Cbf*-регулон. CBF-белки узнают специфические регуляторные элементы (CRT/DRE) в промоторной зоне своих целевых генов и индуцируют их экспрессию [8]. Изучение *Cbf*-генов некоторых видов злаков, среди которых ячмень и рис, выявило, что теплолюбивые виды также несут гены данного семейства, но, например, у риса только один из трех генов *Cbf* индуцируется низкой температурой и функционально соответствует гену *Cbf1* ячменя, что недостаточно для полноценной акклиматизации. Трансгенные растения риса и томатов, содержащие гены *Cbf* арабидопсиса, демонстрируют резкое возрастание уровня устойчивости к низким температурам [9].

Cbf-гены ячменя размещены в 5HL хромосоме в области, близкой к гену *Fr-H2* [10]. Предполагают [8], что у мягкой пшеницы *Cbf*-гены также находятся в хромосомах 5-й гомеологичной группы и достаточно тесно сцеплены с генами *Fr*. Таким образом, 5L хромосомы пшеницы и ячменя (5HL) содержат гены, контролирующие чувствительность к яровизации, морозостойкость и акклиматизацию. В настоящее время у ячменя и пшеницы выявлены 20 генов *Cbf*, организованных в три субсемейства [11]. Накопленная база данных свидетельствует о чрезвычайно важной роли низкотемпературной акклиматизации для достижения высокого уровня морозостойкости. Высказано предположение о том, что генетические различия в низкотемпературной устойчивости между озимыми и яровыми генотипами обусловлены структурными и функциональными отличиями в кластере *Cbf*-генов [10].

Изучение низкотемпературной толерантности, в основном, направлено на идентификацию стрессовых генов, выявление особенностей их организации и функциональной значимости. В существенно меньшей степени рассматривается возможность использования накопленных данных для повышения эффективности анализа селекционного материала и отбора наиболее продуктивных, устойчивых к низкотемпературному воздействию генотипов. Применение методов молекулярно-генетического анализа ДНК, в том числе ПЦР, позволяет выявлять специфические участки ДНК, тесно сцепленные с определенными стрессовыми генами.

Цель работы состояла в анализе молекулярно-генетического полиморфизма ДНК методом STS-ПЦР для выявления ДНК-маркеров гена *Cbf2* у близкородственных видов *Hordeum vulgare* L. и *Triticum aestivum* L.

Данное исследование представляет собой начальный этап выявления потенциальных ДНК-маркеров генов, контролирующих низкотемпературную толерантность.

Материалы и методы. *Растительный материал*. Материалом для исследования служили:

– 13 сортов ярового ячменя (Гетьман, Гонар, Эдем, Незалежний, Оболонь, Переможный, Рось, Одесский 111, Одесский 82, Лотос, Невада, Корона, Табора);

– 4 сорта-двуручки (Основа, Росава, Тайна, Тамань);

– 12 сортов озимого ячменя (Бемир, Вавилон, Михайло, Манас, Скороход, Секрет, Циклон, Паллидум 77, Одесский 165, Одесский 167, Козырь, Кромоз);

– 8 сортов яровой пшеницы различных эколого-географических зон (Santa Catalina (Аргентина), Frontana (Бразилия), Kentana (Мексика), Bledsol (США), Sonalika (Индия), Beacon (Кения), Cocoraqua (Мексика), АНК-18 (РФ));

– изогенные по *Vrn*-генам линии (сорта Одесская 16, Мироновская 808, Скороспелка 3б);

– 44 сорта озимой пшеницы, преимущественно отечественного происхождения, различающихся по морозостойкости [14–16] (высокоморозостойкие: Одесская 16, Мироновская 808, Альбидум 114, Ульяновка, Одом, Омская озимая, Ульяновка; среднеморозостойкие: Безостая 1, Бригантина, Бриз, Прогресс, Федоровка, Донская п/к, Прима одес-

ская, Зустрич, Лелека, Фантазия, Чайка, Одом, Омская 3, Лузановка одесская, Эритроспермум 604, Знахидка одесская, Юна, Vakka, Mercia; слабоморозостойкие: Bandit, Namba-Komugi, Triple Dirk C, Червона, Панна, Одесская красноколосая, Скороспелка 3б, Обрий, Юбилейная 75). Помимо того, проанализированы ДНК сортов Бонатка, Кооператорка, Norin 1, Capelle-Desprez, Ольвия, Струмок, Юннат одесский, Никония, Лада одесская.

Выделение и амплификация геномной ДНК. Высокомолекулярную ДНК выделяли из пятидневных этиолированных проростков и листьев растений «цетавлоновым» методом по методике, разработанной Сиволапом и соавт. [12].

Для ПЦР-анализа использовали пару праймеров, созданных при получении копии гена *HvCbf2* ячменя [13]. Последовательности праймеров следующие:

HvCBF2S4: 5'-TCTCGACGCTAGCTGCGAGC-3';
HvCBF2A2: 5'-CGCCATCTCGGGGTTGGCGA-3'.

Реакционная смесь для проведения ПЦР объемом 20 мкл содержала: 50 мМ KCl, 20 мМ трис-HCl, pH 8,4 (25 °C), 4 мМ $MgCl_2$, 0,01 % твин-20, dNTP (каждый в концентрации 0,2 мМ), 0,2 мкМ праймер, 20 нг ДНК и 1 ед. Taq-полимеразы. В каждую пробирку наслаивали по 30 мкл минерального масла.

Амплификацию проводили на термоциклере CM2 при таких условиях: денатурация – 93 °C, 1,5 мин (начальная) и 1 мин, отжиг – 55 °C, 40 с; синтез – 72 °C, 40 с; заключительная элонгация – 10 мин. Проведены 35 циклов реакции.

Продукты реакции амплификации фракционировали электрофорезом в 2 % агарозном и 10 % денатурирующем полиакриламидном гелях, окрашивали бромистым этидием и серебром соответственно. Видеоизображение и размеры амплифицированных фрагментов получали, используя видеосистему «Image Master VDS».

Результаты и обсуждение. Яровые генотипы могут проявлять устойчивость к низким температурам на ранних этапах органогенеза, но генетический контроль морозостойкости у них отличается от озимых сортов [14]. В связи с этим в качестве генетического материала для проведения ПЦР-анализа

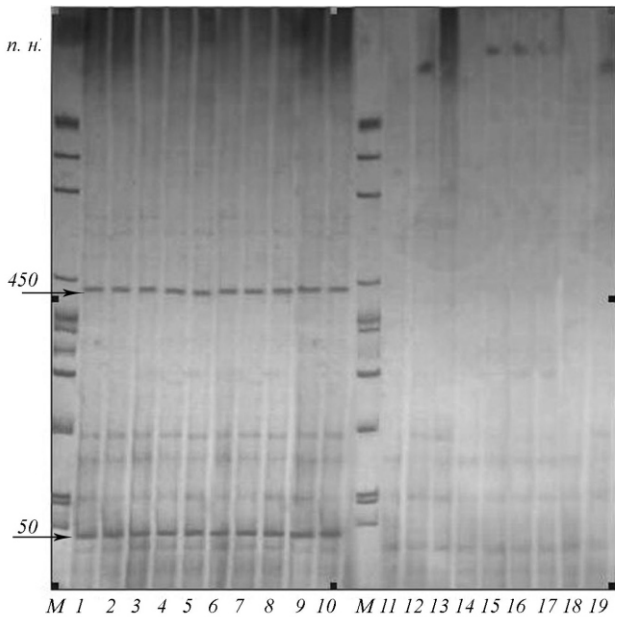

Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК яровых и озимых сортов ячменя: *M* – маркер молекулярной массы *pBR/Msp1*; *1–10* – яровые сорта Гетьман, Гонар, Эдем, Незалежний, Оболонь, Переможный, Рось, Одесский 111, Одесский 82, Лотос; *11*, *12* – двуручки Тайна, Тамань; *13–19* – озимые Бемир, Вавилон, Михайло, Скороход, Секрет, Циклон, Паллидум 77

с праймерами, разработанными к гену *Hvcbf2*, использовали ДНК яровых и озимых сортов ячменя. Полученные спектры продуктов амплификации позволили разделить анализируемые генотипы ячменя на две группы, первую из которых составляют озимые и двуручки, вторую – яровые сорта (рис. 1).

При амплификации анализируемых генотипов детектированы два полиморфных фрагмента размером 450 и 50 п. н. Наличие их в спектрах амплификации ДНК ячменя позволяет идентифицировать генотипы ярового ячменя в общей выборке. Так, у всех 13 проанализированных сортов ячменя ярового типа развития отмечено присутствие в ДНК-спектре данных фрагментов. У сортов озимого типа и двуручек фрагменты размером 450 и 50 п. н. не выявлены.

Исходя из полученных результатов сделано предположение о том, что детектируемый полиморфизм является следствием либо различий по низкотемпературной толерантности, поскольку озимые и двуручки более устойчивы к морозу по сравнению с яровыми, либо аллельными различиями по типу развития.

У ячменя генетический контроль по типу развития значительно отличается от такового у мягкой пшеницы, хотя также контролируется тремя генами *Vrn*: *Vrn-H1*, *Vrn-H2* и *Vrn-H3*. Озимыми являются сорта с генотипом *Vrn-H2 vrnH1 vrnH3*, у двуручек все три гена присутствуют в рецессивном состоянии, тогда как яровые могут иметь шесть различных вариантов *Vrn*-генотипов. Если предположить, что детектируемый полиморфизм ДНК обусловлен генетическими различиями по чувствительности к яровизации, то он может являться только следствием различного аллельного состояния гена *vrnH1*, расположенного в 5HL хромосоме. Учитывая сведения о значительном расстоянии между *Hvcbf2* и *Vrn-H1*, природу используемых праймеров и различия по низкотемпературной устойчивости у яровых и озимых/двуручек, можно с определенной долей уверенности прогнозировать, что выявленный полиморфизм ДНК определяется различным аллельным состоянием гена *Hvcbf2* у генотипов, контрастных по устойчивости к низким температурам.

Ячмень и мягкая пшеница – близкие виды, для которых хорошо известен достаточно высокий уровень гомологии хромосом и генов, выполняющих сходные функции. В связи с этим аналогичный ПЦР-анализ проводили на ДНК яровых и озимых сортов мягкой пшеницы. Как и при анализе ДНК сортов ячменя, спектры продуктов реакции сортов пшеницы можно четко разделить на две группы, где первую группу представляют восемь яровых сортов, а вторую – озимые генотипы и яровые линии, изогенные по *Vrn*-генам, сортов Одесская 16, Мироновская 808 и Скороспелка 3б (рис. 2).

Так, амплификация ДНК анализируемых генотипов пшеницы с данной парой праймеров позволяет детектировать три полиморфных фрагмента размерами 150, 180 и 230 п. н., присутствие которых в спектрах амплификации ДНК пшеницы показывает разницу между яровыми и озимыми сортами. Идентичность спектров амплификации у яровых изогенных линий и их рекуррентных родителей, а также полиморфизм ДНК озимых по отношению к яровым сортам свидетельствуют о том, что полиморфные локусы ДНК не сцеплены с *Vrn*-генами и не отражают различий по типу развития у анализируемых генотипов мягкой пшеницы. Полученные результаты подтверждают и ранее высказанное предположение об отсутствии связи детектируемых полиморфных локусов ячменя с различиями по аллельному составу генов *VrnH*.

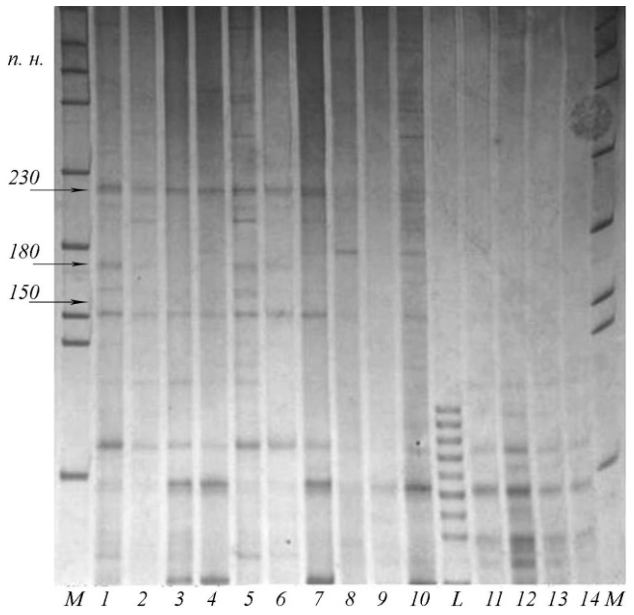

Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК яровых и озимых сортов мягкой пшеницы: *M* – маркер молекулярной массы *pUC/Msp1*; профили амплификации ДНК озимых сортов мягкой пшеницы: *1* – Мироновская 808; *2* – Омская озимая; *3* – Одесская 16; *4* – Альбидум 114; *5* – Лузановка одесская; *6* – Эритроспермум 604; *7* – Знахидка; *8* – Capelle-Desprez; *9* – Triple Dirk C; *10* – Namba-Komugi; *L* – маркер молекулярной массы 111–147 п. н. с шагом 4 п. н.; профили амплификации ДНК яровых сортов мягкой пшеницы: *11* – Santa Catalina; *12* – Sonalika; *13* – Beacon; *14* – АНК-18

Генетический анализ исследуемого материала и сходство результатов ПЦР-анализа двух близкородственных видов, таких как ячмень и пшеница, позволяет сделать вывод о том, что полиморфизм ДНК, обнаруженный между генотипами, контрастными по низкотемпературной толерантности, не может быть случайным событием и, очевидно, является следствием различного аллельного состояния гена *Cbf2* у яровых и озимых форм (рис. 2).

Одним из вопросов, обсуждаемых в ходе данного исследования, является выявление полиморфных локусов ДНК, которые можно рассматривать в качестве потенциальных молекулярных маркеров генов, контролирующих низкотемпературную устойчивость, и использовать их для идентификации генотипов с различным уровнем морозостой-

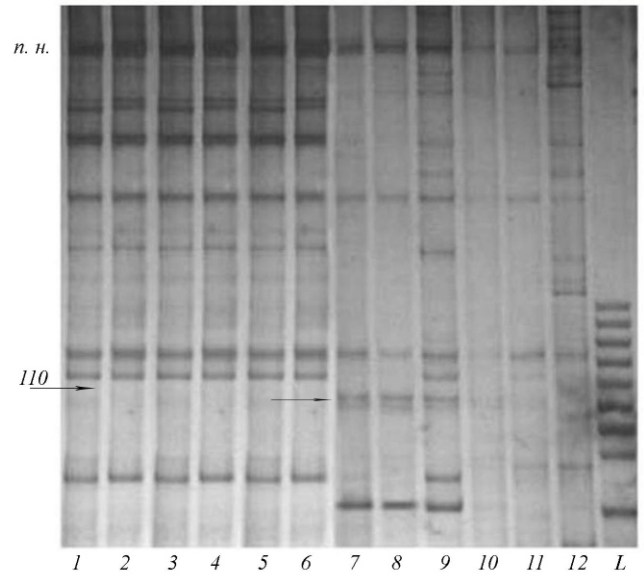

Рис. 3. Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК сортов озимой пшеницы по локусу гена *Cbf2*: *1* – Мироновская 808; *2* – Одесская 16; *3* – Одом; *4* – Омская озимая; *5* – Vakka; *6* – Знахидка; *7* – Юбилейная 75; *8* – Triple Dirk C; *9* – Эритроспермум 604; *10* – Скороспелка 3б; *11* – Безостая 1; *12* – Юна; *L* – маркер молекулярной массы 111–147 п. н. с шагом 4 п. н.

кости. С учетом этого подобным образом проанализированы ДНК обширной выборки сортов озимой мягкой пшеницы, имеющих высокие, средние и низкие показатели по уровню морозостойкости. Спектры продуктов амплификации позволяют детектировать отсутствие продукта амплификации ДНК в области 110 п. н. у нескольких слабоморозостойких сортов: Скороспелка 3б, линия Triple Dirk C, Юбилейная 75, Юна. В то же время профили ДНК слабоморозостойких сортов Обрий и среднеморозостойкого Безостая 1 идентичны профилям ДНК морозостойких сортов Мироновская 808, Одесская 16 и др. (рис. 3).

В рамках данного исследования однозначно интерпретировать полученные данные, в частности, относительно детектируемого полиморфизма ДНК у сортов озимой пшеницы не представляется возможным. Из литературы [8, 11] известно, что *Cbf*-гены влияют на уровень морозостойкости и представляют собой достаточно обширное семейство, состоящее из трех субсемейств: *Cbf1*, *Cbf3* и *Cbf4*. Ген *Cbf2* входит в субсемейство *Cbf4*, представленное несколькими генами со сходными функциями и достаточно высоким уровнем их гомологии. Весьма вероятно, что детектируемый в результате ПЦР-анализа полиморфизм среди озимых форм мягкой пшеницы обусловлен определенным аллельным состоянием одного из генов семейства *Cbf*.

Выводы. 1. Методом ПЦР-анализа выявлен полиморфизм ДНК между яровыми и озимыми генотипами ячменя и пшеницы. Детектируемый полиморфизм ДНК между яровыми и озимыми генотипами не обусловлен различиями по аллельному составу генов *Vrn*.

2. Предполагается, что обнаруженный полиморфизм определяется различиями в аллельном состоянии гена *Cbf2* у яровых и озимых форм, контрастных по низкотемпературной толерантности.

3. Показана возможность выявления потенциальных ДНК-маркеров генов семейства *Cbf*, контролирующих низкотемпературную толерантность.

I. A. Balashova, M. S. Balvinska, V I. Fait, M. V. Galaeva, Yu. M. Sivolap

PCR-marking of genes of Cbf-family, controlling low temperature acclimatization of barley and soft wheat

Summary

Polymorphism in the genotypes of barley and soft wheat, contrast in high and low temperature tolerance, was detected by STS-PCR-analysis with primers, directed to Cbf2 gene. It is supposed that polymorphic DNA-loci are associated with the presence of Cbf2 gene in different allelic state in genotypes with high and low cold stress tolerance.

Keywords: barley, wheat, frost resistance, Cbf-genes, STS-PCR..

І. А. Балашова, М. С. Бальвінська, В. І. Файт, М. В. Галаєва, Ю. М. Сиволап

Використання ПЛР-аналізу для маркування генів родини *Cbf*, які контролюють низькотемпературну акліматизацію у ячменю і м'якої пшениці

Резюме

Методом ПЛР проаналізовано молекулярно-генетичний поліморфізм ДНК для виявлення ДНК-маркерів гена Cbf2 двох близьких за походженням видів Hordeum vulgare L. і Triticum aestivum L. Показано чіткий поліморфізм ДНК сортів ячменю та м'якої пшениці, контрастних за низькотемпературною толерантністю. Визначений в експерименті поліморфізм між ярими та озимими генотипами не пов'язаний з розбіжностями за типом розвитку. Зроблено припущення стосовно того, що наявність поліморфних локусів ДНК обумовлена присутністю різних алелів гена Cbf2 у генотипів з високою та низькою стійкістю до низькотемпературного стресу. Розглянуто

можливість використання ПЛР для детекції слабоморозостійких генотипів м'якої пшениці.

Ключові слова: ячмінь, пшениця, морозостійкість, Cbf-гени, ПЛР.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Levitt J*. Responses of plants to environmental stresses.–New York: Acad. press, 1980.–Vol. 1.–697 p.
2. *Xin Z.*, *Browse J*. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures // Plant, Cell and Environ.–2000.–**23**.– P. 893–902.
3. *Michael F*. Thomashow Update on adaptation to physical stress. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance // Plant Physiol.–1998.–**118**.– P. 1–8.
4. *Xiao F. H., Xue G. P*. Analysis of promoter activity of late embryogenesis abundant protein genes in barley seedlings under conditions of water deficit // Plant Cell Report.–2001.–**20**.–P. 667–673.
5. *Murelli C., Rizza F., Albini F. M., Dulio A., Terzi V., Cattivelli L*. Metabolic changes associated with cold-acclimation in contrasting cultivars of barley // Physiol. Plant.–1995.–**94**.–P. 87–93.
6. *Uemura M., Joseph R. A., Steponkus P. L*. Cold acclimation of *Arabidopsis talianha*. Effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions // Plant Physiol.–1995.–**109**.–P. 15–30.
7. *Gilmour S. J., Fowler S. G., Thomashow M. F*. Arabidopsis transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities // Plant Mol. Biol.–2004.–**54**.–P. 767–781.
8. *Xue G. P*. Characterisation of the DNA-binding profile of barley HvCBF1 using an enzymatic method for rapid, quantitative and high-throughput analysis of the DNA-binding activity // Nucl. Acids Res.–2002.–**30**.–P. 77.
9. *Dubouzet J. G., Sakuma Y., Ito Y., Kasuga M., Dubouzet E. G., Miura S., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression // The Plant J.–2003.–**33**.–P. 751–763.
10. *Kobayashi F., Takumi S., Kume S*., *Ishibashi M., Ohno R., Murai K., Nakamura C*. Regulation by Vrn-1/Fr-1 chromosomal intervals of CBF-mediated Cor/Lea gene expression and freezing tolerance in common wheat // J. Exp. Bot.–2005.–**56**, N 413.–P. 887–895.
11. *Skinner J. S., Zitzewitz J., Szucs P*., *Marquez-Cedillo L., Filichkin T., Amundsen K., Stockinger E. J., Thomashow M. F., Chen T. H., Hayes P. M*. Structural, functional, and phylogenetic characterization of large CBF gene family in barley // Plant Mol. Biol.–2005.–**59**.– P. 533–551.
12. *Сиволап Ю. М., Календарь Р. Н., Нецветаев В. П*. Использование продуктов полимеразной цепной реакции для картирования генома ячменя (*Hordeum vulgare* L.) // Генетика.–1997.–**33**, № 2.–С. 56–60.
12. *Сиволап Ю. М., Календарь Р. Н., Чеботарь С. В*. Генетический полиморфизм злаковых растений при помощи ПЦР с произвольными праймерами // Цитология и генетика.–1994.–**28**, № 6.–С. 54–61.
13. *Xue G. P*. The DNA-binding activity of an AP2 transcriptional activator HvCBF2 involved in regulation of low-temperature responsive genes in barley is modulated by temperature // The Plant J.–2003.–**33**.–P. 373–383.
14. *Трофимовская А. Я*. Ячмень.–Ленинград.: Колос, 1972.–294 с.
15. *Литвиненко М. А., Лифенко С. П., Друзьяк В. В., Друзьяк В. Г*. Вплив строків сівби і сублетальних зимових температур на виживаність та врожайність озимої пшениці // Вісн. аграр. науки.–2004.–№ 5.–С. 27– 32.
16. *Моргун В. К., Логвиненко В. Ф., Улич Л. И., Кравець В. С*. Зимо- и морозостойкость современных сортов озимой пшеницы // Физиология и биохимия культурных растений.–2000.–**32**, № 4.–С. 255–260.
17. *Pilipenko M. V., Chebotar S. V., Fayt V. I., Sivolap Yu. M*. Microsatellite marker analysis of winter hardness in wheat // Eur. Wheat Neuploid Co-operative Newsletter.–Amsterdam, 2006.– P. 117–120.

УДК 633.16:575
Надійшла до редакції 23.07.07