

SECTION: BIOLOGICAL SCIENCES.

SEKCJA: NAUKI BIOLOGICZNE.

How to cite: Balvinska, M., Balashova, I., & Fait, V. (2024). Functional Allelic Diversity at the ZCCT Locus in Some Species of Valuable Cereal Crops. *International Conference on Science, Innovations and Global Solutions*. (pp. 476-480). Futurity Research Publishing. <https://futuraity-publishing.com/international-conference-on-science-innovations-and-global-solutions-archive/>

Functional Allelic Diversity at the ZCCT Locus in Some Species of Valuable Cereal Crops

Бальвінська Марина Сергіївна¹, Балашова Ірина Анатоліївна², Файт Віктор Іванович³

¹кандидат біологічних наук, в.о. завідувача відділу загальної та молекулярної генетики, Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннізнавства та сортовивчення (СГІ-НЦНС), вул. Овідіопольська дор., 3, м. Одеса, Україна, 65036, balvinska@yahoo.com, <https://orcid.org/0000-0003-0404-9787>

²кандидат біологічних наук, провідний науковий співробітник відділу загальної та молекулярної генетики, Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннізнавства та сортовивчення (СГІ-НЦНС), вул. Овідіопольська дор., 3, м. Одеса, Україна, 65036, ibalashova@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0001-7855-1134>

³доктор біологічних наук, заступник директора з наукової роботи, Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннізнавства та сортовивчення (СГІ-НЦНС), вул. Овідіопольська дор., 3, м. Одеса, Україна, 65036, faygen@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0001-9994-341X>

Accepted: July 24, 2024 | **Published:** July 31, 2024 | **Language:** Ukrainian

Abstract: The DNA polymorphism at the *ZCCT* (*VRN2*) locus, the presence of deletions and functionally significant *ZCCT* alleles of wheat and barley genotypes with different growth types of domestic and foreign plant breeding were studied. In the wheat genotypes the *ZCCT-B1* gene null allele was predominated. In particular, it was present in wheat genotypes of spring soft, winter and spring durum wheat. Also, null alleles of other copies of the *ZCCT-1* gene and double mutants of *ZCCT-1* were found, but in significantly smaller numbers. Genotypes with *ZCCT-H* deletion were found in barley, as well as the absence of typical alternative alleles among the studied genotypes of different growth types.

Keywords: *T. aestivum*. L., *T. durum*. Desf., *H. vulgare* L., *ZCCT* (*VRN2*), DNA polymorphism, DNA markers.

Вступ

Потреба в яровизації є одним із адаптивних механізмів рослин злаків, що забезпечують затримку переходу їх до генеративної стадії розвитку. Завдяки цьому рослини здатні витримувати суворі умови вирощування протягом тривалого періоду. Наразі, як і раніше, у більшості селекційних програм значна увага приділяється підвищенню адаптивного потенціалу створюваних генотипів, зокрема важливих злаків за рахунок стійкості до біотичних та абіотичних стресових чинників та оптимальних темпів розвитку у конкретному регіоні вирощування (Hasan et al., 2021). Одним з важливих елементів адаптаційного регуляторного яровизаційного механізму у пшениці та ячменю є ген *VRN2*, що разом з іншими генами контролює типів та темпів розвитку рослин, робить спільний внесок у реакцію на яровизацію, а також впливає на тривалість вегетаційного періоду (Dubcovsky et al., 2005; Mulki et al., 2016). В даний час ідентифіковані гени-кандидати майже для всіх генів, що контролюють адаптивні реакції рослин, включаючи *VRN2* у важливих злаків. Визначення функціонального поліморфізму ДНК за локусом *ZCCT* (*VRN2*) та ідентифікація *ZCCT*-алелів у пшениці та ячменю на основі ДНК-маркерів є важливим кроком для характеристики вихідного матеріалу та подальшого використання у генетико-селекційній практиці при створенні нових сортів, більш адаптованих до певних умов вирощування.

Як було доведено, *VRN2* є домінантним репресором цвітіння та забезпечує перехід рослин від вегетативної фази розвитку до генеративної (Dubcovsky et al., 2005). Встановлено, що локус *VRN2*, як у пшениці так і у ячменю, містить гени, які кодують транскрипційні фактори типу *ZCCT* (Zinc finger CCT) з так званою структурою «цинкових пальців» та CCT-мотивом, що є подібним CO (CONSTANS) та CO-like білкам, які регулюють час цвітіння у арабідопсису *A. thaliana* (Diallo et al., 2010; Kinmonth-Schultz et al., 2019). Продукти експресії *VRN2* мають ядерну локалізацію і накопичуються у всіх тканинах листя молодих неяровизованих рослин, звідки через флоему вони потрапляють у клітини апікальної меристеми, де накопичуються протягом всього періоду (Li et al., 2011).

Гени *ZCCT* вперше картовані в геномі диплоїдної пшениці у ділянці довгого плеча хромосоми 5A (транслокація з 4A). У гекса- та тетраплоїдної пшениць, окрім хромосоми 5A, вони також локалізовані в довгих плечах хромосом четвертої гомеологічної групи В- та Д-геномів (Diallo et al., 2010). У кожному з геномів поліплоїдної пшениці присутні по три гени *ZCCT*, з яких *ZCCT-1* та *ZCCT-2* мають високий рівень гомології та на відміну від *ZCCT-3* (редукований і неактивний внаслідок множинних мутацій) є функціональними. У диплоїдної озимої пшениці та ячменю експресія гена *ZCCT* (домінантні алелі *VRN2*) поступово знижується під час яровизації, чого не спостерігається у неяровизованих рослин (Trevaskis et al., 2006). Основна увага у пшениці приділяється вивченню *ZCCT-1*, який за рядом досліджень є найбільш впливовим на темпи розвитку, зниження реакції на яровизацію (Yan et al., 2015). Кількість функціональних генів *ZCCT1*

характеризується дозовим впливом на темпи розвитку і, згідно з існуючими уявленнями про епістатичну взаємодію з іншими генами *VRN*, може потенційно впливати на агрономічні ознаки, зокрема на морозостійкість, тривалість яровизації, час колосіння. Дослідження з РНК-інтерференції *ZCCT-B1* у м'якої пшениці показали, що зниження його експресії призводить до скорочення часу колосіння, що дозволяє припустити його важливу роль у регуляції часу колосіння пшениці (Yan et al., 2004). Нещодавно було показано, що ген *VRN-B2* значніше впливає на потребу пшениці в яровизації, ніж його гомеологічний ген *VRN-D2* (Kippes et al., 2016).

Щодо ячменю, в нього за локусом *VRN2* локалізований кластер *ZCCT-H*, який складається з трьох *ZCCT*-подібних генів (*ZCCTa*, *ZCCTb*, *ZCCTc*), що також ідентифіковано в довгому плечі хромосоми четвертої гомеологічної групи (4HL) Н-геному (Dubcovsky et al., 2005; Mulki et al., 2016). Механізми дії генів *ZCCT* (*VRN2*) у злаків, зокрема у пшениці та ячменю мають спільні риси. Однак, через видові особливості щодо фотоперіодичної чутливості у пшениці та часу цвітіння в умовах скороченого дня у ячменю, взаємодія *ZCCT* з іншими генами систем контролю темпів розвитку та вплив їх продуктів на дію цих генів для реалізації своєї головної функції у цих злаків має й суттєві відмінності (Dubcovsky et al., 2005; Monteagudo et al., 2019).

Мета роботи полягала у вивченні поліморфізму ДНК за локусом *ZCCT* (*VRN2*), встановлення наявності/відсутності делецій для ідентифікації відповідних *ZCCT*-алелів, що мають функціональне значення у генотипів пшениці та ячменю різного типу розвитку та походження шляхом ПЛР-аналізу.

Результати дослідження

З використанням відповідних ПЛР-тестів для пшениці та ячменю визначено *ZCCT*-алелі у 198 сортів пшениці (145 - м'якої, 53 – твердої) різного типу розвитку української та закордонної селекції та 126 сортів ярого та озимого ячменю різного походження (більшість з яких української селекції).

Результати маркування локусу *ZCCT-1* у пшениці твердої (*T. durum*) показали, що серед досліджених 53 (30 озимих та 23 ярих) сортів нуль-аллель *ZCCT-B1* загалом детектований у 33 зразків, що складає 62,2% від набору сортів. Серед озимих та ярих генотипів твердої пшениці *ZCCT-B1* виявлено у 66,6% та 56,5% сортів відповідно. Слід зазначити, що для сортів зарубіжної селекції також відомо про значне поширення сортів з відсутністю *ZCCT-B1*.

За результатами аналізу генотипів пшениці м'якої (*T. aestivum* L.), більшість озимих сортів, що досліджувались не мають нуль-алелів за зазначеним локусом, що подібно теоретичним даним, наведеним в літературі (Zhu et al., 2010). Однак у майже 23 % сортів виявлено або відсутність гену *ZCCT-B1* (20,27%), або подвійні мутанти *ZCCT-B1 ZCCT-A1*. Одиначний випадок – нуль-аллель *ZCCT-A1*. Протилежні результати отримано у сортів ярого типу, де більшість – 72 % має нуль-аллель *ZCCT-B1*, у чотирьох сортів, або 5,6 % показано відсутність генів *ZCCT-B1*, *ZCCT-A1*, та у двох випадках ідентифіковано нуль-аллель за геном *ZCCT-D1*. У літературних джерелах є свідчення щодо маркування цього локусу у сортів пшениці м'якої переважно американської та китайської селекції, серед яких нуль-алелі траплялись з досить низькою частотою. Лише у декілька сортів виявлено нуль-аллель за *ZCCT-B1* та знайдено подвійні мутанти (Zhu et al., 2011). Не виявлено залежності між відсутністю/наявністю нуль-алелів у озимих сортів, зокрема української селекції, та рівнем яровизаційної потреби. Наявність всіх трьох генів *ZCCT-1* відзначалося як у сортів, яким необхідна яровизація щонайменше 60 діб, так і сортів, які вискосилися після 30-40 діб яровизації. Однак відомо, що в генах локусу *ZCCT-1* можливі мутації, які призводять до заміни амінокислот в ССТ-домені білків *ZCCT*, що призводять до зниження функціональної активності таких білків.

Мутації в послідовностях *ZCCT*, що кодують ССТ-домен або наявність нуль-алельних варіантів обумовлюють у пшениці появу рецесивних алелів (*vrn2*), що впливає на яровизаційну чутливість, призводить до її зниження (Dubcovsky et al., 2005), в той час як у ячменю частіше за все неактивний (рецесивний) алель є наслідком делеції всього кластеру, всіх трьох генів, що спостерігається у факультативних та більшій частині ярих генотипів. У разі, наприклад, ярих сортів ячменю, через делеції всіх трьох генів *ZCCT-H* в локусі *Vrn-H2* (рецесивний алель) ефективно експресується *VRN-H1*, що дозволяє рослинам швидко перейти до колосіння.

За локусом *ZCCT* (*ZCCT-H*) ячменю (*H. vulgare* L.) імовірно, як відомо з літературних джерел, делеція усього кластеру, що зустрічається в більшості випадків або окремих ділянок (нуль-алелі за окремими генами *ZCCT-H*). За аналізом генотипів ячменю виявлено, що носіями делеції в ділянці *ZCCT-H*, що за даними літератури співвіднесене з рецесивним алелем були більш 80 % ярих сортів. Наявність делеції (*ZCCT-Ha/b*) в досить незначній кількості (до 5 %), але також траплялась і серед озимих, що не є характерним. В той час близько 17 % з проаналізованих зразків ДНК ярих сортів, а також майже всіх факультативних генотипів, які перебували у дослідженні раніше не містили делецію, що, за літературними джерелами відповідає наявності в генотипі функціонального алелю. Відсутність делеції *ZCCT-Ha/b* у більшості досліджених факультативних генотипів відрізняється від даних, наведених у літературних джерелах. Можливо, такі результати пов'язані з особливостями селекції цих сортів та впливом на прояв відповідних ознак інших факторів, що потребує вивчення.

Висновки

За результатами даного дослідження встановлено, що серед генотипів пшениці різного типу розвитку та походження спостерігається поширення варіанту з нуль-алелем за геном *ZCCT-B1*, що, як вважають, має найбільший вплив на потребу у яровизації. В той час, сорти з відсутністю *ZCCT-B1* найчастіше зустрічається серед ярих генотипів пшениці м'якої у порівнянні з озимими генотипами та у генотипів пшениці твердої різного типу розвитку. Не доведено залежність між відсутністю/наявністю нуль-алелів у озимих сортів пшениці, зокрема української селекції, та рівнем яровизаційної потреби. Виявлені носії нуль-алелів по іншим копіям *ZCCT-1* та подвійні *ZCCT-1*-мутанти. Виявлені нуль-алельні варіанти можуть бути корисними як природне генетичне джерело мутантів при дослідженні впливу окремих генів *ZCCT-1* на якісні та кількісні показники агрономічно цінних ознак пшениці. У ячменю ідентифіковано носії делеції *ZCCT-H* та наявність не характерних альтернативних алелів серед досліджених генотипів різного типу розвитку. При більш детальному дослідженні локусу *ZCCT* такий аналіз здатний виявити більше відмінностей у сортів для подальшого маніпулювання їх генетичною мінливістю та прогнозування необхідних ознак на ранніх етапах онтогенезу, зокрема це стосується яровизаційної потреби у пшениці та розпізнання факультативних генотипів у ячменю.

Література

- Diallo, A., Kane, N., Agharbaoui, Z., Badawi, M., Sarhan, F. (2010). Heterologous expression of wheat VERNALIZATION 2 (TaVRN2) gene in Arabidopsis delays flowering and enhances freezing tolerance. *PLoS One*, 5(1), 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008690>
- Dubcovsky, J., Chen, C. L., & Yan, L. L. (2005). Molecular characterization of the allelic variation at the VRN-H2 vernalization locus in barley. *Molecular Breeding*, 15(4), 395-407. <https://doi.org/10.1007/s11032-005-0084-6>
- Fernández-Calleja, M., Casas, A. M., & Igartua, E. (2021). Major flowering time genes of barley: allelic diversity, effects, and comparison with wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 134(7), 1867-1897. <https://doi.org/10.1007/s00122-021-03824-z>

Hasan, N., Choudhary, S., & Naaz, N. (2021). Recent advancements in molecular marker-assisted selection and applications in plant breeding programmes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 128. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00231-1>

Kinmonth-Schultz, H. A., MacEwen, M. J. S., Seaton, D. D., Millar, A. J., Imaizumi, T., & Kim, S. H. (2019). An explanatory model of temperature influence on flowering through whole-plant accumulation of FLOWERING LOCUS T in *Arabidopsis thaliana*. *In Silico Plants*, 1(1), diz006. <https://doi.org/10.1093/insilicoplants/diz006>

Kippes, N., Chen, A., Zhang, X., Adam, J., Lukaszewski, A. J., & Dubcovsky, J. (2016). Development and characterization of a spring hexaploid wheat line with no functional VRN2 genes. *Theoretical and Applied Genetics*, 129(8), 1417-1428. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2713-3>

Li, C., Distelfeld, A., Comis, A., & Dubcovsky, J. (2011). Wheat flowering repressor VRN2 and promoter CO2 compete for interactions with NUCLEAR FACTOR-Y complexes. *The Plant Journal*, 67(5), 763-773. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04630.x>

Monteagudo, A., Igartua, E., Contreras-Moreira, B et al (2019). Fine-tuning of the flowering time control in winter barley: The importance of *HvOS2* and *HvVRN2* in non-inductive conditions. *BMC Plant Biology*, 19, 113. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1727-9>

Mulki, M., & von Korff, M. (2016). CONSTANS controls floral repression by up-regulating VERNALIZATION2 (VRN-H2) in barley. *Plant Physiology*, 170(1), 325-337. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01350>

Trevaskis, B., Hemming, M. N., Peacock, W. J., & Dennis, E. S. (2006). *HvVRN2* responds to day length, whereas *HvVRN1* is regulated by vernalization and developmental status. *Plant Physiology*, 140(4), 1397-1405. <https://doi.org/10.1104/pp.105.073486>

Yan, L., Li, G., Yu, M., Fang, T., Cao, S., & Carver, B. F. (2015). Genetic mechanisms of vernalization requirement duration in winter wheat cultivars. In Y. Ogihara et al. (Eds.), *Advances in Wheat Genetics: From Genome to Field* (pp. 117-125). <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03279-z>

Zhu, X., Tan, C., Cao, S., & Yan, L. (2011). Molecular differentiation of null alleles at ZCCT-1 genes on the A, B, and D genomes of hexaploid wheat. *Molecular Breeding*, 27(4), 501-510. <https://doi.org/10.1007/s11032-010-9447-8>