

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ ТИПУ РОЗВИТКУ ПШЕНИЦІ

О.Ф. МУТЕРКО, І.А. БАЛАШОВА, В.І. ФАЙТ, Ю.М. СИВОЛАП

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннізнавства та сортовивчення НААН України, Одеса
E-mail: muterko@gmail.com

*Необхідність у довготривалій експозиції рослин низькою температурою, що передусь переходу до репродуктивної стадії розвитку, визначається їх потребою у яровизації. Чутливість пшениці до яровизації залежить від алейного стану генів системи *Vrn*. Майже для всіх генів цієї системи встановлено молекулярну структуру і досліджено причини виникнення альтернативних алейних варіантів. Гени *Vrn1*, *Vrn2* та *Vrn3* залучені у епістатичну взаємодію та формують регуляторну петлю з позитивним зворотним зв'язком, яка у озимих рослин активується умовами яровизації. Локус *Vrn2* є ключовим у пригніченні переходу в репродуктивну фазу розвитку озимих рослин до проходження яровизації, в той час як локус *Vrn1* головним чином визначає терміни зацвітання ярої пшениці. Огляд присвячено аналізу досліджень молекулярних механізмів та генетичної детермінації контролю чутливості до яровизації у пшениці. Детально обговорюється організація, структура і функції генів *Vrn* та продуктів їх експресії. Особливу увагу приділено структурі регуляторних ділянок цих генів та молекулярним механізмам регуляції їх експресії. Сформульовано сучасну узагальнену модель, яка відображає взаємодію між генами *Vrn* та факторами навколишнього середовища під час яровизації.*

Ключові слова: *Vrn* гени пшениці, гени *ZCCT*, локус *TaFT1*, чутливість до яровизації, морозостійкість, епістатична взаємодія, регуляція зі зворотним зв'язком.

Вступ. Терміни колосіння пшениці є однією з найважливіших агрономічно-цінних ознак, що визначає адаптивність рослинного організму до навколишнього середовища конкретного регіону, забезпечуючи проходження певної фази індивідуального розвитку за найбільш сприятливих умов і впливаючи на урожайність [1]. У пшениці контроль типу та темпу розвитку здійснюється за участі головним чином трьох генетичних систем: *Vrn* (контролює реакцію на яровизацію – тип розвитку), *Ppd* (регулює чутливість до фотоперіоду) та *Eps* (визначає власну скоростиглість) [2]. Потреба рослин у довготривалій дії низької температури для своєчасного зацвітання визначається їхньою чутливістю до яровизації. Чутливість пшениці до яровизації контролюється головним чином чотирма генами – *Vrn1*, *Vrn2*, *Vrn3* та *Vrn4* [3–6]. Система цих генів формує єдиний

регуляторний механізм, окремі елементи якого залучені у епістатичну взаємодію між собою. В результаті взаємодії між генами *Vrn* утворюється регуляторна петля з позитивним зворотним зв'язком, де зміна активності транскрипції будь-якого гена впливає на активність експресії решти генів системи, що контролює процес яровизації та визначає час зацвітання [7].

Вивчення тієї або іншої генетичної системи зручніше проводити, спираючись на дані, заздалегідь отримані на модельному організмі, яким для квіткових рослин зазвичай є арабідопсис. Для генів *Vrn2* пшениці не виявлено гомологів у арабідопсису, так само як і для залученого у контроль чутливості до яровизації гена *FLC* арабідопсису не представлені гомологи в геномі пшениці. Передбачається, що системи, які регулюють процес яровизації, або принаймні окремі елементи цієї системи у цих двох видів розвинулися незалежно одна від іншої [4]. Водночас встановлено існування міжвидової функціональної активності генів, що залучені у регуляцію процесу цвітіння. Наприклад, виявлено контроль часу зацвітання продуктами експресії гена *SOC1* рису в трансгенному арабідопсису та відповідно контроль часу зацвітання продуктами експресії гена *FLC* арабідопсису в трансгенному рисі [8]. Наявна також регуляція часу зацвітання, що опосередкована геном *Vrn1* та локусом *Vrn2* пшениці у трансгенному арабідопсису [9, 10]. У зв'язку з цим передбачається, що однодолні та дводолні класи рослин хоч і мають різні системи контролю процесу яровизації та часу зацвітання, проте відрізняються за компонентами, що виконують аналогічні функції [10].

Майже для всіх локусів генетичної системи *Vrn* (окрім локусу *Vrn4*) ідентифіковано гени-кандидати, а вивчення їхньої молекулярної структури дозволило з'ясувати причини, що обумовлюють зміни відповідних фізіологічних процесів в рослинних організмах, які утримують альтернативні алелі цих генів, та побудувати узагальнену модель, яка відображає взаємодію між окремими елементами цієї системи в процесі регуляції чутливості до яровизації та темпу розвитку пшениці.

Загальна характеристика генів *Vrn1* та продуктів їх експресії. Гени *Vrn1* картовані в середині довгих плечей хромосом п'ятої гомеологічної групи [3]. Ідентифіковано два гени (дистанція між якими 0,03 сМ), які є імовірними кандидатами для локусу *Vrn1*. Обидва гени кодують транскрипційні фактори, що утворюють MADS-бокс, ортологічного сімейства генів ара-

бідопсису *APETALA1 (API)/FRUITFULL (FUL/AGL8)* та *AGL1* відповідно [3, 11, 12]. Продукти генів цього сімейства беруть участь в регуляції процесів, що забезпечують перехід рослинного організму з вегетативної стадії розвитку у генеративну [13]. Порушення функції гена *Vrn1* у диплоїдній пшениці супроводжується відсутністю генеративної стадії розвитку [14, 15]. Проте подальшими дослідженнями встановлено, що у поліплоїдній пшениці перехід до цвітіння відбувається і в разі повної відсутності генів *Vrn1* [16]. Ці нуль-алельні мутанти мають найбільш тривалий темп розвитку, однак продукують здорові квіти та фертильне зерно. Припускається, що у таких рослин індукція зацвітання опосередкована продуктами експресії інших генів, які також утримують MADS-бокс, наприклад *FUL2* та *FUL3* [16]. Оскільки кореляція між структурою та експресією перерахованих генів-кандидатів і альтернативними формами алелів локусу *Vrn1* характерна лише для гена *API*, припускається, що найбільш вірогідним кандидатом для локусу *Vrn* є ген *APETALA1 (API)/FRUITFULL ((API/FUL)-like)* [3, 13]. Подальші дослідження показали, що саме ген *WFUL1* ідентичний пшеничним генам *Vrn1* [17].

В рослинах, які утримують домінуючі і рецесивні алелі генів *Vrn1* та були вирощені на подовженому дні і не підлягали яровизації, транскрипти домінуючих алелів детектуються на стадії 1–3 листків, однак вже за декілька тижнів (на стадії шести листків) можна спостерігати продукти експресії як домінуючих, так і рецесивних алелів [18]. Домінуючі алелі генів *Vrn-A1*, *Vrn-B1* та *Vrn-D1* знижують чутливість до яровизації та визначають ярий або факультативний тип розвитку [19]. Проте вплив домінуючих алелів гомеологічних генів *Vrn1* на чутливість до яровизації та темп розвитку пшениці не рівнозначний, зміну сили впливу можна прослідкувати у ряду *Vrn-A1* > *Vrn-B1* > *Vrn-D1* [20, 21], що збігається з відносним рівнем активності транскрипції відповідних генів та дією продуктів їх експресії на пригнічення локусу *Vrn2* [18]. Тобто ярі сорти, домінуючі за геном *Vrn-A1*, більш ранні, ніж сорти, що утримують домінуючий алель гена *Vrn-B1* або *Vrn-D1*. Окрім того, ген *Vrn-A1* спричиняє сильний епістатичний вплив на два інші гени *Vrn1* з геномів В та D [22].

Базальний рівень транскрипції інтактних генів *Vrn1* дуже низький, проте він різко збільшується після дії низької температури [3, 11–13, 23]. Активність експресії *Vrn1* кількісно змінюється в залежності від тривалості низькотемпературної дії і становить пряму кореляцію по відношенню до неї [11, 12, 24, 25]. Подальшими дослідженнями генетичної експресії *Vrn1* за умови яровизації встановлено, що ані інсерція у 231 п.н. в ділянці промотору домінуючого алеля *Vrn-A1a*, ані мутації, локалізовані в першому інтроні, не є критичними в індукції транскрипції, яка обумовлена дією низької температури [23, 26, 27].

Для генів *Vrn1* характерна багатокопійність [28–30]. Кількість копій, так само як і їхній нуклеотидний склад, можуть варіювати, що значно впливає на потребу у яровизації (тривалість яровизації) та темп розвитку [28, 30]. Деякі зразки утримують одночасно декілька різних варіантів домінуючих алелів або ж домінуючі та рецесивні алелі гена *Vrn-A1* [29].

В структурі білків *Vrn1* ідентифіковано домен надродини MADS – SRF-TF [31] та послідовність К-боксу. Амінокислотна послідовність SRF (serum response factor) домену родини TF (transcription factor) утримує декілька функціонально активних ділянок, зокрема сайт, що забезпечує зв'язування з ДНК, сайти фосфорилування та димеризації [32]. Сайт зв'язування забезпечує специфічне сполучення білка з цільовою послідовністю ДНК, де завдяки утворенню в домені димеризації амфіпатичним альфа-спіралям відбувається обгортання молекули ДНК довкола SRF-утримуючого білка [33]. Ділянка з К-боксом зазвичай присутня в амінокислотній послідовності транскрипційних факторів SRF-типу. Передбачається, що К-бокс бере участь в утворенні на певних ділянках білка суперспіральних структур [34]. Домен SRF-TF кодується нуклеотидною послідовністю першого екзону, К-бокс кодується частиною другого, третім, четвертим, п'ятим та шостим екзонами генів *Vrn1*. У сьомому та восьмому екзонах генетичної інформації, що кодує домени або інші функціональні послідовності білків, виявити не вдалося. Проте згідно з результатами вирівнювання амінокислотних послідовностей саме тут локалізована переважна кількість місенс-мутацій, які відрізняють між собою білки *Vrn1* (*Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*). Доведено, що місенс-мутації, локалізовані в четвертому та сьомому екзонах гена *Vrn-A1*, впливають на темп розвитку пшениці [30, 28]. Встановлено вплив місенс-мутації в послідовності четвертого екзона, що кодує К-бокс, на потребу у яровизації (тривалість яровизації) [30].

Плейотропний вплив генів *Vrn1* на толерантність до дії низьких температур. Локус *Vrn1*, окрім індукції зацвітання, асоційований з холодовою чутливістю злаків. Відомо, що толерантність пшениці до дії низьких температур знижується після переходу від вегетативної стадії розвитку до генеративної. Генетичні системи, які регулюють процеси яровизації та акліматизації до низьких температурних умов у зернових взаємопов'язані, проте регулюються різними чинниками. Запропоновано гіпотезу, згідно з якою зернові отримали здатність використовувати присутність продуктів експресії генів *Vrn1* як сигнал пригнічення регуляції *COR (Cold Regulated)* генів (генів холодової чутливості), більш того, підвищення активності експресії локусу *Vrn1* асоційоване зі зниженням холодової витривалості (морозостійкості) [11]. Майже ізогенні лінії за рецесивними алелями генів *vrn1* (озими) здатні переносити температури

на 11 °С нижче, ніж ярі лінії, що майже ізогенні за домінантними алелями цих генів. При цьому ярі лінії, що були вирощені на скороченому дні, який, як відомо, пригнічує транскрипційну активність локусу *Vrn1*, можуть витримувати температури на 8,5 °С нижче, ніж ті, що були вирощені на подовженому дні [35]. Аналогічні результати спостерігаються і у ячменю. Лінії ячменю, що рецесивні за геном *vrn1*, характеризуються вищим рівнем експресії гена *CBF* (*C-repeat binding factor*), на відміну від ліній – носіїв домінантного алеля *Vrn-H1*. Окрім того, у ліній, які були вирощені на скороченому дні, зазначено вищу транскрипційну активність локусу *CBF*, ніж у ліній, що вирощені за умови подовженого дня [36]. Ген *CBF*, що активується низькими температурами, кодує транскрипційний фактор, який індукує експресію генів *COR*, і таким чином відіграє важливу роль у холодовій акліматизації та низькотемпературній стійкості злаків [37, 38]. Проте ця гіпотеза не припускає безпосередньої взаємодії між генами *Vrn1* та *CBF* або ж *COR* [39], оскільки молекулярні і генетичні механізми, які залучені у взаємозв'язок між активністю *Vrn1* та пригніченням генів *COR*, наразі не з'ясовані [3, 11, 13]. Передбачається, що один з мажорних QTL холодової толерантності – локус *FROST RESISTANCE-1*, насправді є плейотропним ефектом локусу *Vrn1* [40]. Спираючись на ці дані, можна припустити, що зернові розвинули здатність використовувати продукти експресії генів *Vrn1* для регулювання холодової стійкості. Так, підвищення транскрипційної активності *Vrn1* сприяє пригніченню експресії генів холодової стійкості навесні, але не восени, коли висока холодова толерантність є корисною адаптацією, що допомагає протидіяти низьким температурам зимового періоду [41].

Встановлено, що рівень зимостійкості сортів пшениці, домінантних за генами *Vrn1* з різних гомеологічних геномів, не рівнозначний. Цей вплив на збільшення зимостійкості спостерігається в ряду *Vrn-D1* > *Vrn-B1* > *Vrn-A1*, тобто сорти м'якої пшениці, що моногенно домінантні за *Vrn-D1* або *Vrn-B1*, виявляються більш толерантними до дії низьких температур, ніж сорти, які утримують домінантний алель гена *Vrn-A1* [42, 43]. Дійсно, гени *Vrn-D1* та *Vrn-B1* є менш активними в порівнянні з геном *Vrn-A1* і головним чином за рахунок більш низького рівня їх експресії. Оскільки зимостійкість пшениці пригнічується активною експресією генів *Vrn1*, то передбачається, що більш низький рівень експресії домінантних алелів генів *Vrn-D1* та *Vrn-B1* буде чинити менший вплив на зниження витривалості рослин до дії низьких температур, ніж домінантний алель гена *Vrn-A1*. Саме тому сорти пшениці, що моногенно домінантні за *Vrn-B1* або *Vrn-D1*, спроможні витримувати холодний зимовий період і за типом розвитку виявляються як факультативні – «дворучки» [20].

Регуляція експресії генів *Vrn-1*. Гени *Vrn1* характеризуються наявністю принаймні двох регуляторних ділянок, локалізованих в області промотору та першого інтрона відповідно [44, 45]. Припускається, що регуляція експресії локусу *Vrn1* у злаків залежить здебільшого від дії двох антагоністичних механізмів: 1) активація транскрипції із залученням регуляторних сайтів промотору, що характеризується низьким бальним рівнем транскрипції, який може бути збільшений дією низької температури під час яровизації; 2) протидіючий механізм конститутивної репресії хроматину, яка контролюється регуляторними ділянками першого інтрона [23]. Домінантні алелі генів *Vrn1* обумовлені порушеннями в регуляції їх експресії та пов'язані з виникненням численних мутацій на ділянці промотору та першого інтрона. Наприклад, у пшениці такі алелі, як *Vrn-A1(a, b, b^m, d, e, f, g)*, утримують делеції та SNP-мутації на ділянці промотору гена *Vrn-A1* [45, 29, 46], а домінантні алелі *Vrn-A1(c, f^m, h^m)*, *Vrn-B1(a, b, c)* та *Vrn-D1a* асоційовані з мутаціями у першому інтроні генів *Vrn-A1*, *Vrn-B1* та *Vrn-D1* відповідно [44, 47–49].

Дослідження молекулярної структури першого інтрона у зразків пшениці та ячменю, що розрізняються за мутаціями в домінантних алелях *Vrn1*, виявило в структурі цього інтрона критичну ділянку (4,2 тис. п.н.), в якій перші 400 нуклеотидів відрізняються дуже високою консервативністю. Передбачається, що саме на цій ділянці можуть бути локалізовані регуляторні послідовності [44]. Проте подальшими дослідженнями встановлено, що інсерції, локалізовані вище критичної ділянки, також спричиняють зниження чутливості до яровизації (домінантні алелі *Vrn-A^m1f*, *Vrn-A^m1h*) [48]. Аналіз епістатичної взаємодії між генами *Vrn* ячменю показав, що вплив на фенотип окремих мутацій на ділянці інтрона-1 гена *Vrn-H1* нерівнозначний: більш протяжні делеції асоційовані з більш активною експресією гена *Vrn1* та більш раннім зацвітанням за відсутності яровизації, ніж короткі делеції [26, 50]. Важливість першого інтрона генів *Vrn1* в пригніченні транскрипції до проходження яровизації підтверджується наявністю на цій ділянці щонайменше 18 мутацій, які асоційовані з підвищенням активності експресії цих генів та зниженням чутливості до яровизації у пшениці і ячменю [26, 25, 44, 47–49, 51, 52].

В результаті мутацій можуть, наприклад, бути делетовані сайти зв'язування з гіпотетичними транскрипційними факторами, що пригнічують транскрипцію локусу *Vrn1* [44], або мутації можуть вплинути на сайти, які необхідні для підтримання пригніченого стану хроматину за допомогою модифікації гістонів, формуючи таким чином механізм соматичної пам'яті про яровизацію («зимовий код») у злаків [53–55], подібно до того, як це відбувається у арабідопсису [56].

Епігенетична регуляція *Vrn1*. Дослідженнями Олівера та ін. [55] встановлено, що репресія гена *Vrn1* ячменю асоційована з високим вмістом гістона-3, метильованого за лізином-27 (H3K27me3), у хроматині локусу *HvVRN1*. Після яровизації спостерігається зниження вмісту гістона-3 на ділянці першого екзона та на початку першого інтрона, а також повна елімінація гістонів H3K27me3 на ділянці промотору, першого екзона та першого інтрона з хроматину локусу *HvVRN1*, у зв'язку з чим передбачається, що яровизація сприяє активації хроматину гена *HvVRN1*. При цьому вплив яровизації на вміст модифікованих гістонів H3K4me3 та H3K27me3 у хроматині локусів *HvVRN2* і *HvVRN3* не виявлений. Зміни кількісного вмісту метильованих гістонів, індуковані яровизацією паростків, у хроматині локусу *HvVRN1* зберігаються надалі і в листках вегетуючої рослини, що підтверджує дані, згідно з якими саме в регульованні активного стану хроматину локусу *HvVRN1*, що опосередковане модифікацією його гістонів, і проявляється механізм епігенетичної пам'яті про яровизацію у злаків.

Нещодавно аналогічні дослідження були проведені на генетичному матеріалі м'якої пшениці. Аналіз вмісту модифікованих гістонів H3K4me3 та H3K27me3 ділянки промотору генів *Vrn1* та *TaFT1* (*Vrn3*) у зразків гексаплоїдної пшениці, контрастних за типом розвитку, виявив збагачення гістонами H3K4me3 при незмінному рівні H3K27me3 в озимій пшениці, що пройшла яровизацію. Вміст H3K4me3 у зразків ярої пшениці після яровизації, навпаки, знижується при незмінному рівні гістонів H3K27me3 [53]. Отже перехід до цвітіння озимой пшениці, який індуковано умовами яровизації, асоційований зі зміною вмісту метильованих гістонів H3K4me3 та H3K27me3 на ділянці промотору генів *Vrn1* та *TaFT1*. Встановлено також пряму кореляцію між рівнем експресії цих генів та зміною у вмісті модифікованих гістонів [53].

Модифіковані гістони H3K4me3 та H3K27me3 локалізовані в ділянках геному, що асоційовані з активним та пригніченим станом хроматину відповідно [57]. У рослин, як і в інших організмів, регуляція вмісту модифікованих гістонів H3K4me3 та H3K27me3 в різних ділянках хроматину опосередкована активністю білкових комплексів PcG (polycomb group), TrxG (trithox group), які відіграють ключову роль в процесах епігенетичної репресії та активації відповідно [58–60]. Так, у арабідопсису ключові локуси системи, що контролює час зацвітання – *FLC* та *FLM*, в пригніченому стані характеризуються високим вмістом в хроматині гістонів H3K27me3 [61].

Передбачувані компоненти комплексу, що регулює активний стан хроматину через зміну вмісту модифікованих гістонів, виявлені також у злаків [62, 63]. Зокрема гени, що кодують білки типу VII

(VIN3 (vernalization insensitive 3)-Like), картовано у прицентромерній ділянці хромосом 1, 5, 6 в А-геномі *Triticum monococtum* L. [62] та в D-геномі *Aegilops tauschii* Coss. [63]. Умови яровизації, а саме дія низьких температур сприяє підвищенню рівня експресії (активації) генів *TmVIL* пшениці як при подовженому, так і скороченому дні, а після підвищення температури рівень експресії генів *TmVIL* повертається до вихідних (до яровизації) значень [62]. Якщо прийняти до уваги той факт, що продукти експресії *Vrn1* знижують морозостійкість, то можлива роль підвищення транскрипційної активності генів *VIL* під час дії низьких температур могла б полягати в пригніченні експресії генів *Vrn1*, що сприяло б таким чином підвищенню толерантності організму до низькотемпературної дії. Гени *VIL* активуються на початку періоду яровизації, що передуює активації генів *Vrn1*. Аналогічний вплив дії низьких температур та скороченого дня на активність транскрипції генів *VIL* арабідопсису і пшениці разом з ідентичною доменною структурою білків, кодovаних цими генами, дозволяє припустити, що гени *VIL* у арабідопсису та злаків виконують аналогічні функції [62, 63].

Регуляторні сайти на ділянці промотору генів *Vrn1*. На ділянці промотору генів *Vrn1* ідентифіковано декілька цис-активних сайтів, що беруть участь у регуляції транскрипції [29, 53], проте дослідження проведено лише деяких з них – CAAG-, VRN- та G-боксів (рис. 1). Трохи вище за сайт ініціації транскрипції, але нижче ACGT-мотиву локалізовано послідовність (CCTCGTTTGG) CAAG-боксу (сайт зв'язування з MADS-боксом) [3], який наявний у всіх представників сімейства генів, що кодують MADS-бокс-утримуючі білки. Спочатку передбачалося, що CAAG-бокс має ключове значення в регуляції активності транскрипції генів *Vrn1* за умови яровизації [3]. Так, пшеничні SVP-like (Short Vegetative Phase) MADS-бокс білки VRT2 (Vegetative to Reproductive Transition 2) задані як *in vitro*, так і *in vivo* зв'язуються з CAAG-боксом промотору *Vrn1* [64, 65]. Проте подальшими дослідженнями встановлено, що чутливість до яровизації зберігається і при повній відсутності CAAG-боксу, отже останній не є критичним в регуляції експресії генів *Vrn1* [46]. Між іншим не виключена потенційна роль білків VRT2 у регуляції експресії *Vrn1* незалежно від яровизації, наприклад, під час дозрівання квітки [27, 65]. Відомо, що для деяких озимих сортів м'якої пшениці, чутливих до фотоперіоду (рецесивних за генами *ppd1*), тривалість яровизації може бути значно скорочена або ж виключена зовсім, якщо протягом декількох тижнів (42 дні) вирощувати такі рослини на скороченому дні і лише потім на подовженому [48, 66–68]. Це явище не характерне для арабідопсису, проте спостерігається також у злаків під родини *Festucoideae* [69]. Така заміна холодової яровизації скороченим фотоперіодом асоційована з пригніченням локусу *Vrn2*

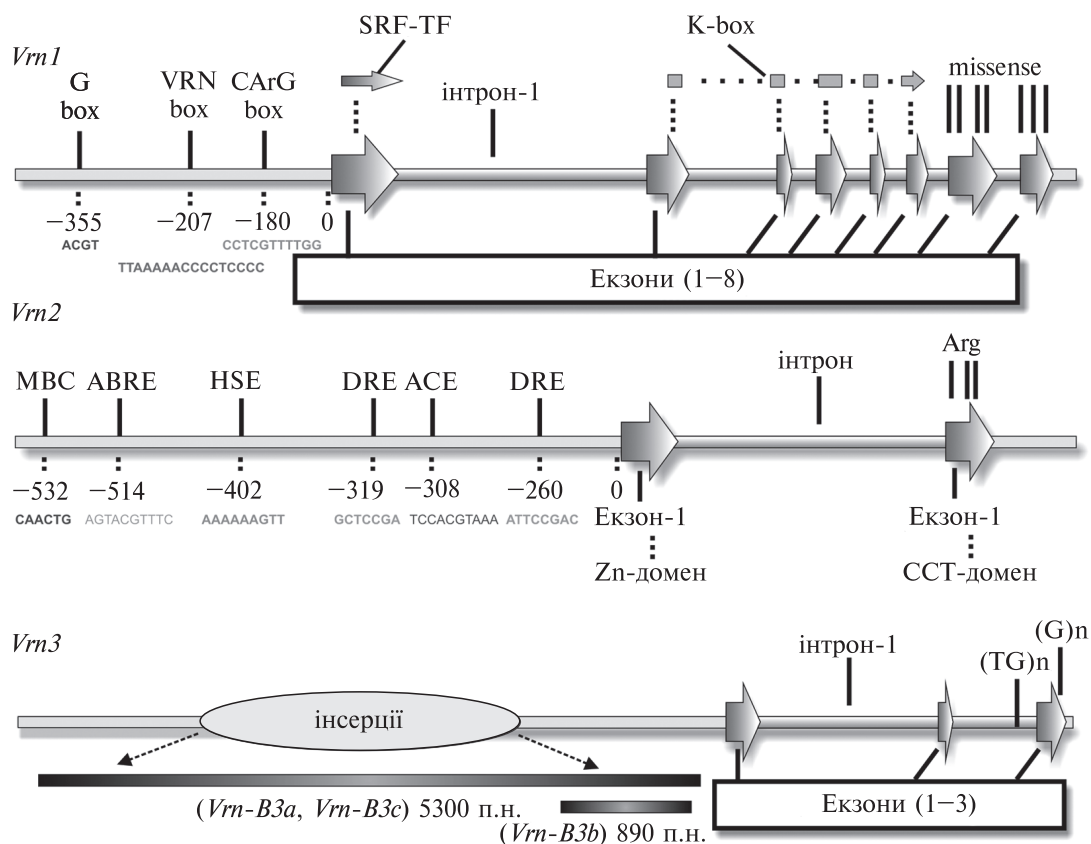


Рис. 1. Структура генів *Vrn*. *Vrn1*: missense – позначає локалізацію кодонів, мутації в яких обумовлюють відмінності у амінокислотних послідовностях білків, що транслюються з генів *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*; також позначена локалізація кодонів, що транслюються у домен SRF-TF та мотив К-боксу відповідно; на ділянці промотору зображено порядок розташування головних регуляторних сайтів: CArG- VRN- та G-боксів. *Vrn2*: схематично зображено порядок розташування на ділянці промотору генів *ZCC1* цис-активних елементів, які залучені у регуляцію чутливості до водного стресу (MBS), дії абсцизової кислоти (ABRE), теплового шоку (HSE), холодного стресу (DRE) та освітлення (ACE); Arg – позначає локалізацію кодонів консервативних залишків аргініну CCT-домену. *Vrn3*: (TG)_n, (G)_n – позначає ділянки генів *Vrn-A3* та *Vrn-D3*, поліморфізм яких асоційований з мінливістю скоростиглості пшениці; на ділянці промотору позначено локалізацію інсерцій у 5300 та 890 п.н., що утримують алелі *Vrn-B3a*, *Vrn-B3c* та *Vrn-B3b* відповідно. Цифрами позначено відстань (у нуклеотидних парах) до стартового кодону

умовами скороченого дня, а також наявністю в промоторі генів *Vrn1* регуляторної ділянки, що залучена у контроль їхньої експресії скороченим фотоперіодом [48]. Пригнічення експресії *Vrn2*, що опосередковане вирощуванням рослин на скороченому дні при кімнатній температурі, не супроводжується подальшою активацією генів *Vrn1* доти, доки ці рослини не будуть перенесені в умови подовженого дня, в той час як у рослин, що пройшли яровізацію, активація експресії *Vrn1* відбувається і без подальшої дії умов подовженого фотоперіоду [48]. Ці факти можна пояснити, припустивши існування гіпотетичного репресора генів *Vrn1*, який є активним за умови скороченого дня. У диплоїдній пшениці з

делетованим CArG- та VRN-боксом або CArG-боксом і частиною послідовності в першому інтроні гена *Vrn1* наявна підвищена активність транскрипції цього локусу при вирощуванні на скороченому дні. У зв'язку з цим передбачається, що CArG-бокс може бути залучений в процес регуляції фотоперіодом та відігравати важливу роль при зв'язуванні з невідомим на даний час репресором, який проявляє активність в умовах скороченого дня [48].

В результаті аналізу нуклеотидних послідовностей ділянки промотору домінуючих алелів *Vrn-A^m1a* і *Vrn-A^m1g* та інтактної послідовності рецесивного алеля *vrn-A^m1* з'ясувалося, що обидва домінуючих алеля утримують делецію у 20 п.н. в аналогічній ділянці

промотору, яка передує СArG-боксу [46]. У цій самій ділянці локалізовано також мутації двох доміантних алелів *Vrn-A1a* та *Vrn-A1b*, які ідентифіковані в геномі поліплоїдної пшениці [45]. Таким чином, базуючись на результатах порівняння нуклеотидних послідовностей ділянки промотору альтернативних алелів гена *Vrn-A1* виділено послідовність довжиною у 16 п.н. (TTAAAAACCCCTCCCC) – VRN-бокс, для якого припускається залучення у регуляцію експресії генів *Vrn1* та чутливості до яровизації [46].

СArG- та VRN-боксу на ділянці –2300±0 п.н. передують bZIP (basic leucine zipper)-зв'язуючі (взаємодіють з транскрипційними факторами, що утримують bZIP-домен) G- та чотири інших гібридних бокси (A/G, A/C, G/A, G/C). Вони включають у свою структуру чотиринуклеотидну послідовність ACGT-мотиву, що є сайтом зв'язування з комплексом FDL2-FT (можливо за участі додаткових білків) [41], подібно до того як білковий комплекс FT–FD зв'язується з регуляторною ділянкою (С-боксом) промотору локусу *API* (гомолог пшеничного *Vrn1*) у арабідопсису [70]. При цьому ACGT-мотив здатний зв'язуватися власне з білком FDL2, тому передбачається, що пшеничний ген *TaFDL2* (Flowering locus D-Like 2) є гомологом гена *FD* арабідопсису. Таким чином, ACGT-мотив є необхідним компонентом системи, що бере участь в активації локусу *Vrn1* продуктами експресії гена *Vrn3* [41].

Загальна характеристика генів *Vrn2*. Локус *Vrn2* вперше картований в геномі диплоїдної пшениці у дистальній ділянці довгого плеча хромосоми 5A (як транслокація з 4A хромосоми) [71]. Методом позиційного клонування ідентифіковано три гені-кандидати для локусу *Vrn2* (як в подальшому виявилось, це один тандемно дуплікований ген), що кодують транскрипційні фактори *ZCCT*-типу (Zinc finger CCT), які утримують домен «цинкового пальця» та CCT мотив [4]. Транскрипційні фактори *ZCCT*-типу у пшениці подібні CO (CONSTANS) та CO-like білкам, які регулюють час зацвітання у арабідопсису [72]. Однак така подібність обмежується лише наявністю в їх структурі домену CCT. Рецесивні алелі *vrn2* обумовлені мутаціями в послідовності генів *ZCCT*, яка кодує CCT-домен, або наявністю нуль-алельної форми цих генів, внаслідок чого знижується чутливість до яровизації [4, 73–75]. Проте наразі не виявлено жодного представника поліплоїдної пшениці, який би утримував нуль-алелі або нефункціональні варіанти одночасно усіх генів *ZCCT* [74–77].

Гени *Vrn2* у гексаплоїдної пшениці, так само як і у тетраплоїдної, локалізовані в довгому плечі хромосоми 5 A-генома та на довгих плечах хромосом четвертої гомеологічної групи В- та D-геномів [10, 75]. Кожен геном поліплоїдної пшениці містить по три копії *ZCCT* гена, однак одна з цих копій (*ZCCT3*) сильно редукована і не функціональна (її можна роз-

глядати як псевдоген), а функціональну активність зберігають лише гени *ZCCT1* та *ZCCT2* – «гіпотеза двох генів *ZCCT*» [74]. Окрім того, частим явищем є дуплікація гена *ZCCT-B2* (*ZCCT-B2a* та *ZCCT-B2b* копії) [74]. Вірогідно, в геномі гексаплоїдної пшениці присутні щонайменше дев'ять варіантів генів *ZCCT* (*ZCCT-1X*, *ZCCT-2X* та *ZCCT-3X*, де *X* позначає А, В, D-геном) по три варіанти в кожному геномі [75]. Оскільки на відміну від локусів *Vrn1* та *Vrn3* озимий тип розвитку пшениці визначається доміантними алелями *Vrn2*, для переходу на ярий тип розвитку потрібна присутність рецесивних гомозигот за всіма генами *ZCCT*. Звичайно, що така вірогідність дуже низька, тому ярі зразки гексаплоїдної пшениці, тип розвитку яких обумовлений лише рецесивною гомозиготою за *vrn2*, не є поширеними [10, 75–77].

Продукти експресії локусу *Vrn2* мають ядерну локалізацію [78] і накопичуються в усіх тканинах листків молодих неярвизованих рослин [10], звідки через флоему потрапляють в клітини апікальної меристеми, де і залишаються впродовж усього вегетаційного періоду [64]. В озимих сортах диплоїдної пшениці та ячменю (доміантні алелі *Vrn2*) експресія генів *ZCCT* прогресивно знижується протягом всього періоду яровизації, що не спостерігається у неярвизованих рослин [4, 79]. Досліди з РНК інтерференцією гена *ZCCT-B1* м'якої пшениці встановили, що зниження концентрації продуктів експресії гена *ZCCT-B1* обумовлює скорочення періоду до зацвітання, у зв'язку з чим передбачається, що цей ген грає істотну роль в регуляції часу зацвітання у пшениці [4].

Структура генів *ZCCT* та продуктів їх експресії. Перший екзон пшеничних генів *ZCCT* кодує домен цинкового пальця, а другий – домен CCT (рис. 1). В результаті аналізу нуклеотидних послідовностей ділянки промотору генів *ZCCT* виявлено декілька цис-активних елементів, залучених у регуляцію чутливості до водного стресу (MBS – CAACTG), дії абсцизової кислоти (ABRE – AGTACGTTTC), теплового шоку (HSE – AAAAAAGTT), холодного стресу (DRE – GCTCCGA, ATTCCGAC), освітлення (ACE – TCCACGTA AAA) та до пошкоджень (травматична індукція) [10]. Встановлено, що такі абіотичні стресори, як абсцизова кислота, водний стрес, тепловий шок, солоність та травматична індукція знижують активність транскрипції генів *Vrn2* [10]. Наявність цис-активних елементів, що обумовлюють чутливість до різного роду абіотичних стресорів, є адаптивним механізмом, який дозволяє забезпечити індукцію зацвітання за певних (найбільш сприятливих або навпаки – екстремальних, що ставлять вид під загрозу зникнення) умов середовища, що сприяє збереженню виду. При використанні трансгенних ліній арабідопсису доведено безпосередній вплив продуктів експресії генів *Vrn2* на підвищення морозостійкості [10], що можливо обумовлено при-

гніченням продуктами експресії цих генів локусу *Vrn1*, активність якого має зворотну кореляцію з холодовою толерантністю.

Встановлено, що зміна амінокислотної послідовності в шести консервативних позиціях домена ССТ білків *ZCCT1*, *ZCCT2*, *Ppd1* та *CONSTANS* (*CO*) позначається на часі зацвітання [4, 10, 74, 80, 81]. Керуючись тим, що виявлені мутації в нефункціональних продуктах експресії генів *ZCCT* локалізовані саме в домені ССТ [10, 74], а також спираючись на наявність безпосередньої взаємодії між доменом ССТ генів *ZCCT* та білками *HAP* (*Heme Activator Protein*) [78], можна припустити, що пригнічення транскрипції локусу *Vrn3* продуктами експресії генів *Vrn2*, опосередковане взаємодією останніх з комплексом *HAP*, аналогічно до того, як це відбувається з *CO* та іншими білками, які містять домен ССТ [78]. Передбачається, що ССТ-домен-утримуючі білки, які заміщують субодиницю *HAP2* в комплексі *HAP2/3/5*, також здатні зв'язуватися ССААТ-боксом, в результаті чого виникають альтернативні шляхи регуляції генів, що утримують ССААТ-бок [82].

Послідовність домену ССТ білків *ZCCT* містить в трьох позиціях (16, 35 та 39) консервативні залишки аргініну. Мутації, що виникають в цих позиціях, обумовлюють зниження міцності зв'язування білків *ZCCT* у білок-білкових взаємодіях, що спричиняє зниження їх функціональної активності [4, 10, 74, 78]. Встановлено, що найбільш сильний вплив на зниження міцності зв'язку при взаємодії між білками *ZCCT* та *HAP*, як і при взаємодіях ССТ-ССТ (між білками *ZCCT* і *CO*), чинить мутація за аргініном, який локалізовано в 16-й позиції домену ССТ [78]. Мутації в консервативних сайтах домену ССТ хоча і усувають вплив мутантних білків *ZCCT* на пригнічення експресії локусу *Vrn3*, проте зберігається конкурентна взаємодія з іншими ССТ-домен-утримуючими білками [78], в той час як наявність нуль-алелів обумовлює відсутність продукту трансляції з відповідного гена *ZCCT-1*, що повністю усуває будь-яку конкурентну взаємодію з іншими білками, які утримують домен ССТ. У зв'язку з цим можна припустити, що наявність нуль-алелів генів *ZCCT-1* може позначитися на тих ознаках, що безпосередньо або опосередковано регулюються генами, які кодують ССТ-домен-утримуючі білки та вступають у конкурентну взаємодію з білками *ZCCT*.

При вивченні альтернативних алельних варіантів генів *ZCCT* встановлено, що обидва гени (*ZCCT1* та *ZCCT2*) беруть участь в регуляції чутливості до яровизації, проте для кожного з геномів характерні різні функціональні варіанти. Зокрема, домен ССТ білків *ZCCT-A1* та *ZCCT-B1* у тетраплоїдній пшениці виду *T. durum* утримує фіксовану мутацію *R39C* [74], що також широко розповсюджена, як і мутація *R35W*, в білках *ZCCT-A1* у гексаплоїдній пшениці

T. aestivum [10, 77] (не вдалося знайти жодних даних, які підтверджували б наявність інтактного домену ССТ у білків типу *ZCCT-A1* для виду *T. aestivum*). Білок *ZCCT-A2* у гексаплоїдній, тетраплоїдній та диплоїдній пшениці містить в домені ССТ фіксовану мутацію *R16C* [4, 10, 74, 77]. Наявність цих мутацій обумовлює зниження функціональної активності відповідних білків *ZCCT*. Білок *ZCCT-D2* у виду *T. aestivum* має фіксовану мутацію в домені ССТ – *R33Q* [77], проте вплив цієї мутації на функціональну активність білка не встановлено. Таким чином, загальна кількість генів *ZCCT*, які впливають на потребу у яровизації, значно зменшується.

Алельні варіанти гена *Vrn3*. Локус *Vrn3* (раніше відомий як *Vrn5*, *Vrn-B3* або *Vrn-B4*) картовано в короткому плечі хромосоми 7B [5, 83]. Встановлено, що геном-кандидатом для локусу *Vrn3* є *RAF*-кіназний інгібітор, ортолог *FT* (*Flowering locus T*) локусу арабідопсису – ген *TaFT1* [5]. Локус *FT* є типовим представником флорогенів, продукти експресії якого, переміщуючись від листя до апексу, індукують зацвітання [41, 84, 85]. Пшеничний та ячмінний локуси *FT* на відміну від вивчених до теперішнього часу локусів *FT* інших видів рослин містять не чотири, а три екзони, що обумовлено злиттям третього і четвертого екзонів [86].

Наразі ідентифіковано два домінуючих алеля гена *Vrn-B3* [5, 87]. Домінуючий алель *Vrn-B3a* утримує інсерцію (довжиною у 5300 п.н.) мобільного генетичного елемента ретротранспозону в ділянку промотору, де також присутні шість мутацій *SNP* і ще три *SNP* в інтроні-1 [5]. В результаті цих мутацій активація експресії *Vrn-B3a* відбувається незалежно від дії низьких температур, що обумовлює більш раннє зацвітання рослин. Окрім того, встановлено пряму кореляцію між рівнем експресії *Vrn3* та часом зацвітання [5]. Передбачається, що наявність на ділянці промотору гена *TaFT* мутацій, які обумовлюють алельні відмінності за генотипом *Vrn3*, спричиняє порушення взаємодії між локусом *TaFT* та продуктами експресії локусу *Vrn2*. Це призводить до втрати контролю генами *ZCCT* над регуляцією експресії локусу *TaFT* [5]. Рецесивний алель *Vrn-B3b* утримує інсерцію у 890 п.н. в ділянці промотору, яка на 429 п.н. передує сайту ініціації транскрипції [87]. Цей алель асоційовано зі значним зниженням рівня експресії в порівнянні з інтактним геном *Vrn-B3* та більш пізнім зацвітанням. Алель *Vrn-B3c* відрізняється від алеля *Vrn-B3a* наявністю додаткових делецій у 20 п.н., що передує інсерції ретротранспозону в ділянці промотору та у 4 п.н. в послідовності самого мобільного елемента [87]. Рівень експресії алеля *Vrn-B3c* дещо нижчий за експресію алеля *Vrn-B3a*, у зв'язку з чим припускається, що додаткові делеції (у 20 та 4 п.н.) не впливають (або чинять незначний вплив) на активність промотору домінуючого алеля *Vrn-B3c* в порівнянні з алелем *Vrn-B3a* [87].

Гомологи локусу *TaFT* досліджені також в геномах А і D м'якої пшениці – гени *Vrn-A3* та *Vrn-D3* відповідно. Встановлено, що вплив домінантного алеля *Vrn-D3* на темп розвитку пшениці від виходу у трубку до зацвітання у два рази менше, ніж внесок гена *Ppd-D1*, проте на відміну від нього *Vrn-D3* не впливає на процеси розвитку до виходу у трубку [88]. Показано, що поліморфізм (відмінності у кількості повторень двонуклеотидного мікросателіту у *Vrn-A3* та полі-G мотиву у *Vrn-D3*) в кодуючих і некодуючих ділянках А та D копій гена *TaFT* (рис. 1) асоційований з мінливістю ознак скоростиглості м'якої пшениці [86]. Загалом виявлено три поліморфізми у генах *Vrn-A3* та *Vrn-D3* (детектовано у 239 сортах), які асоційовані зі зміною темпу розвитку пшениці [86]. Проте причини, що обумовлюють існування альтернативних алейних варіантів генів *Vrn-A3* та *Vrn-D3*, не встановлені, оскільки не були досліджені ділянки промотору відповідних генів, та й самі автори підкреслюють, що отримані результати нічого не доводять, а виявлений поліморфізм хоча й асоційовано зі зміною темпу розвитку, однак він не вказує на причини цієї зміни [86].

Локус *Vrn4*. Серед чотирьох генів *Vrn* найменш вивченим на даний час залишається ген *Vrn4* (відомий як *Vrn-D4*, *Vrn-D5*). Домінантний алель *Vrn-D4* зустрічається головним чином в сортах м'якої пшениці з Азії, Індії та прикордонних регіонів [89, 90]. Інтродукція домінантного алеля *Vrn-D4* у західні сорти пшениці відбулася наприкінці 60-х років минулого століття з австралійського сорту *Gabo* [92], який в свою чергу отримав цей алель від індійського сорту *Muzaffarnagar* [91].

Локус *Vrn4* картовано в прицентромірній ділянці короткого плеча хромосоми 5D [93, 94], існуючі відмінності за геном *Vrn4* детектовані лише в D-геномі. Згодом при використанні методів молекулярно-генетичного аналізу вдалося встановити приблизне розташування *Vrn4* в інтервалі 1,8 сМ, який фланковано мікросателітними локусами: *Xcfd78* на короткому плечі та *Xbarc205* на довгому, а сам ген тісно зчеплений з мікросателітним локусом *Xcfd67* [6]. Подальші дослідження та картування високої щільності дозволили більш точно локалізувати ген *Vrn4* в короткому плечі хромосоми 5D на ділянці у 0,09 сМ [95].

Гени-кандидати для даного локусу наразі не ідентифіковані. Прицентромірна ділянка хромосом п'ятої гомеологічної групи утримує також гени *TaVIL1* [62], які кодують ортологічні арабідопсису гомеодомен-утримуючі РНД-білки – VIL1. Ці білки разом з VIN3 виконують важливу роль у реалізації епігенетичної пам'яті про яровизацію (є важливими складовими комплексу, який бере участь у модифікації хроматину під час яровизації) та в механізмі, залученому у фотоперіодичну регуляцію цвітіння арабідопсису [96]. У зв'язку з цим припускалося, що пшеничний ген *TaVIL-D1* є потенційним

геном-кандидатом для *Vrn-D4* [62], проте в подальших дослідженнях при побудові генетичної карти високої щільності детектовано дві рекомбінантні події між генами *TaVIL-D1* та *Vrn-D4* [95]. Окрім того, не виявлено поліморфізму в кодуючих та регуляторних послідовностях гена *TaVIL-D1* у зразках, контрастних за алейним станом гена *Vrn-D4*. Нарешті, домінантні алелі генів *VIL* на відміну від гена *Vrn4* не активують, а пригнічують експресію локусу *Vrn1* [62]. Загалом під час пошуку потенційних генів-кандидатів локусу *Vrn-D4* було проаналізовано колінеарну ділянку модельного організму *Brachypodium distachyon* довжиною понад 1М п.н., яка включала 127 потенційних генів, більшість з яких ановано як структурні або метаболічні [95]. Виявлено також десять генів, що кодують транскрипційні фактори, залучені у регуляцію розвитку. Один з таких генів (позначено *TaAGL31*) кодує білки, що утримують MADS-бокс, аналогічно генам *Vrn1*, проте результати аналізу структури та експресії цього гена у зразків, контрастних за *Vrn4*, не дозволяють впевнено стверджувати, що цей ген є потенційним кандидатом на *Vrn-D4* [95].

Епістатична взаємодія між генами *Vrn*. Аналіз експресії генів *Vrn2* виявив, що зниження активності їх транскрипції асоційоване зі збільшенням вмісту продуктів експресії локусу *Vrn1* [4, 48, 18]. Дослідження гена *Vrn3* встановило, що характер його експресії подібний до характеру експресії генів *Vrn1* і в той же час протилежний характеру експресії *Vrn2* [5]. Ці дані підтверджували раніше висунуте припущення про те, що гени *Vrn1*, *Vrn2* та *Vrn3* є елементами однієї регуляторної системи та залучені в епістатичну взаємодію між собою [73] (рис. 2).

Зниження активності транскрипції локусу *Vrn2*, що спостерігається після активації експресії домінантних алелів *Vrn1* та передують транскрипції рецесивних алелів *vrn1*, не визначається у контрольних ізогенних ліній, які рецесивні за всіма гомеологічними генами *vrn1*. У зв'язку з цим передбачається, що продукти експресії генів *Vrn1* безпосередньо або опосередковано беруть участь у пригніченні транскрипції генів *Vrn2* [16, 18, 41]. Домінантні алелі *Vrn2* опосередковано пригнічують експресію рецесивних алелів *vrn1* [4, 54, 65], які безпосередньо залучені в процес ініціації цвітіння. Так, зниження активності транскрипції *Vrn2* у трансгенних рослин озимої пшениці, яке обумовлено штучною РНК-інтерференцією, супроводжується активацією генів *Vrn1* та скороченням періоду яровизації аж до повної його ліквідації [4]. Таким чином, поєднання хоча б одного домінантного алеля *Vrn2* з рецесивною гомозиготою за всіма генами *vrn1* визначає озимий генотип, що має потребу у яровизації [3, 4, 73].

В ході яровизації транскрипція домінантних алелів *Vrn2* негативно регулюється дією низької температури та скороченим фотоперіодом [48, 4], що

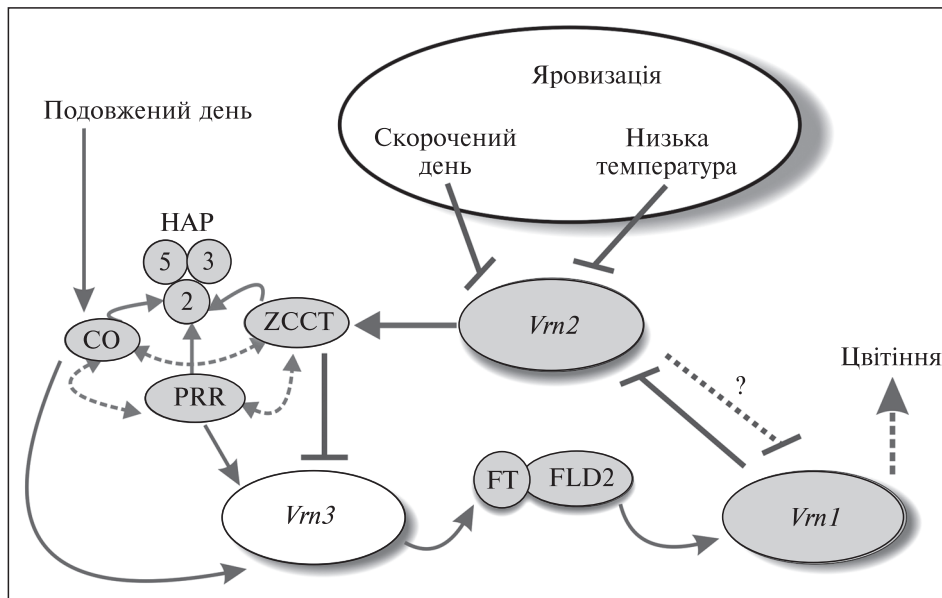


Рис. 2. Узагальнена модель регуляції процесу яровизації пшениці та епістатичної взаємодії між генами *Vrn*. Дія низьких температур та скороченого фотоперіоду, що наявні за умов яровизації, пригнічують активність транскрипції генів *Vrn2*, продукти експресії яких вступають в конкурентну взаємодію (позначено пунктирними стрілками) з іншими білками, які утримують CCT-домен, зокрема PRR та CO (подовжений день активує CO та домінуючі алелі PRR), за зв'язування з HAP-комплексом, де заміщують субодиницю HAP2. Комплекс HAP3-HAP5-ZCCT, зв'язуючись з регуляторною ділянкою промотору гена *Vrn3*, пригнічує його експресію, в той час як комплекс HAP білків з PRR або CO, навпаки, активують. Продукти експресії гена *Vrn3*(*FT*) утворюють комплекс з білком *FLD2* та стимулюють активність локусу *Vrn1*, який безпосередньо або опосередковано пригнічує експресію *Vrn2*. Таким чином виникає регуляторна петля з позитивним зворотним зв'язком

пояснює пригнічення експресії *Vrn2* під час яровизації незалежно від наявності продуктів експресії *Vrn1* у мутантних ліній з делетованими генами *Vrn1* в кожному з гомеологічних геномів [16]. Пригнічення локусу *Vrn2* скороченим фотоперіодом відомо як «яровизація скороченим фотоперіодом» або «індукція скороченим днем» [68]. Встановлено, що активність транскрипції *Vrn2* за умови скороченого фотоперіоду значно збільшена у носіїв домінуючого алеля *Ppd-D1a* [97], який визначає нейтральний до фотоперіоду генотип [98]. Саме тому ефективність «яровизації скороченим фотоперіодом» виявляється частіше у рослин, які рецесивні за генами *ppd1* [97]. Припускається, що активація експресії локусу *Vrn2* в умовах скороченого дня опосередкована активацією механізмів контролю чутливості до фотоперіоду. Це може бути обумовлено порушенням функції циркадного годинника або впливом продуктів експресії домінуючих алелів *Ppd1* [97]. Оскільки продукти експресії локусу *Vrn2* негативно регулюють гени *Vrn1* (опосередковано *Vrn3*), то підвищення активності транскрипції *Vrn2* за наявності домінуючих алелів *Ppd1* в зимовий період обумовлює більшу витривалість рослини до дії низьких температур

[99], адже активність експресії генів *Vrn1* обернено корелює з холодовою толерантністю [35].

У ярих ліній, які рецесивні за *vrn2*, алельні відмінності за локусами *Vrn1* та *Vrn3* не впливають на тип розвитку [73, 100]. Оскільки домінуючі алелі генів *Vrn1* та *Vrn3* знижують або взагалі усувають вплив альтернативних алелів *Vrn2* на час зацвітання, передбачається, що наявність мутацій у регуляторних ділянках генів *Vrn1* та *Vrn3* є достатньою умовою для виключення впливу продуктів експресії локусу *Vrn2* в опосередкованій репресії зацвітання [4, 5]. У зв'язку з цим припускається, що відмінності у впливі мутацій в різних регуляторних ділянках генів *Vrn1* і *Vrn3* на чутливість до яровизації асоційовані з наявністю функціональних продуктів експресії локусу *Vrn2* [45, 44, 5]. Дослідження зсуву електрофоретичної рухливості ДНК-білкових комплексів (EMSA-аналіз), а також експерименти з імуноосадження хроматину (CHIP) встановили, що між білками *Vrn2* та регуляторними ділянками генів *Vrn1* відсутня безпосередня взаємодія [65]. Мутації на ділянці промотору (зокрема делеція 20 п.н. вище сайту CArG), які утримують домінуючі алелі *Vrn1*, лише частково зменшують, але не усувають вплив

продуктів експресії локусу *Vrn2* на час зацвітання [73]. У зв'язку з цим передбачається, що мутації в першому інтроні домінантних алелів *Vrn1* становлять більш сильний вплив на усунення дії продуктів експресії *Vrn2* на час зацвітання, ніж мутації, які локалізовані на ділянці промотору генів *Vrn1* [65].

Попередні дослідження не виявили безпосередньої взаємодії між білком *Vrn3* та промотором генів *Vrn1*. Проте встановлено, що продукти експресії локусу *Vrn3* взаємодіють з bZIP-доменом, що міститься у білках FDL2 та FDL6 [41]. Однак лише білок FDL2 здатний зв'язуватися з регуляторними послідовностями (bZIP-зв'язуючими сайтами), що локалізовані на ділянці промотору генів *Vrn1* [41]. Активність транскрипційного фактора FDL2 не залежить від алельного стану гена *Vrn3*. Продукти експресії локусу *FDL2* в значній кількості присутні в апексі та листках як на вегетативній, так і на репродуктивній стадії розвитку. Таким чином, білки FDL2 присутні в потрібній тканині і на потрібній стадії розвитку, тому не є лімітуючими в індукції експресії генів *Vrn1*. Отже, враховуючи існуючу білок-білкову взаємодію між FDL2 та *Vrn3*, а також взаємодію комплексу FDL2-*Vrn3* з промотором *Vrn1*, доведено, що зміна активності транскрипції гена *Vrn3* супроводжується паралельною зміною в активності транскрипції *Vrn1* [41]. Окрім локусу *TaFT2* (*Vrn3*), в геномі пшениці присутній також аналогічний йому (78%-на гомологія) паралог – локус *TaFT2* [5]. Проте продукти експресії локусу *TaFT2* на відміну від білків *TaFT1* взаємодіють з білком FDL13, який на відміну від FDL2 та FDL6 належить до іншої філогенетичної класи FD-подібних білків і не спроможний взаємодіяти з bZIP-зв'язуючими сайтами, які локалізовані на ділянці промотору *Vrn1* [41].

Для гена *Vrn3* наголошується роль інтегратора молекулярно-генетичних механізмів, що контролюють чутливість до яровизації та фотоперіоду [5, 54]. Встановлено, що продукти експресії локусу *Vrn2* беруть участь у регуляції експресії гена *Vrn3*. На стадії п'яти листків рівень транскрипції гена *Vrn-B3* в 170 разів вище у зразків, які утримують рецесивні (не функціональні) алелі *vrn2*, ніж у зразків, які домінантні за *Vrn2*, що підтверджує негативний регуляторний вплив продуктів експресії локусу *Vrn2* відносно гена *Vrn3* [5]. Вірогідно, що така генетична взаємодія можлива завдяки наявності ССТ-домена в структурі білків *Vrn2* (ZCCT). Показано, що ССТ-домени-утримуючі ділянки білків *Vrn2* та СО конкурентно взаємодіють між собою при зв'язуванні з білками сімейства НАР (NF-Y), при цьому мутації в ССТ-домени рецесивних алелів *vrn2* знижують силу взаємодії з білками НАР та пригнічують здатність *Vrn2* конкурувати з білками СО, проте не усувають її [78]. Окрім взаємодії з білками НАР, білки, що містять ССТ-домени, зокрема ZCCT та СО, також здатні до самодимеризації (наприклад СО-СО) та

взаємодії між собою [78]. Показано, що наявність саме ССТ-домени є необхідною умовою для такої взаємодії. Втім білок Ppd-D1 (PRR-2D) не взаємодіє ані з ZCCT, ані з СО, що підтверджує специфічність взаємодії ССТ-ССТ. Здатність білків ZCCT до конкуренції з білками СО при зв'язуванні з НАР для подальшої взаємодії з промотором локусу *FT* пояснює пригнічення індукції зацвітання у неяровизованих озимих рослин за умови подовженого дня [78], який активує білки СО [101], що позитивно регулюють локус *FT* [72]. Передбачається, що здатність ССТ-домени взаємодіяти з комплексом НАР забезпечує гнучкість системи адаптації, яка обумовлює проходження тієї або іншої фази індивідуального розвитку і, зокрема, визначає час зацвітання залежно від умов навколишнього середовища, оскільки експресія багатьох ССТ-домени-утримуючих та НАР-подібних білків пов'язана з чутливістю до дії зовнішніх абіотичних стресорів. Так, згідно з викладеними ствердженнями взаємодія між різними ССТ-домени-утримуючими та НАР-подібними білками призводить до утворення великої кількості різноманітних комплексів, які розрізняються за міцністю або специфічністю зв'язування, що у свою чергу може вплинути на активність транскрипції локусу *Vrn3*, а отже і на експресію генів *Vrn1*, і на час зацвітання [7].

Попередніми дослідженнями встановлено, що домінантний алель *Vrn-D4* асоційований з різким зростанням активності експресії локусів *Vrn1* і *Vrn3* (*Vrn-B3*) та водночас з пригніченням локусу *Vrn2* в листках [6]. У взаємодії з домінантними алелями гомеологічних генів *Vrn1* та *Vrn-B3* ступінь домінантності алеля *Vrn-D4* складає від 30,7 до 53,7 %, що значно менше за ступінь домінантності алелів генів *Vrn1*, який становить від 55,6 до 95,9 % з найбільшим показником у домінантного алеля *Vrn-A1a*, саме тому наявність лише алеля *Vrn-A1a* повністю усуває потребу у яровизації [95]. Отже, за наявності домінантних алелів генів *Vrn1* домінантний алель *Vrn-D4* становить незначний вплив на тривалість часу до зацвітання, оскільки у цьому випадку його функція у листках є надлишковою [95]. За присутності домінантного алеля *Vrn-B3* висока активність експресії локусу *TaFT1* пригнічує транскрипцію генів *Vrn2* через стимуляцію експресії *Vrn1* незалежно від дії продуктів експресії гена *Vrn-D4* [95].

Модель регуляції процесу яровизації пшениці. Узагальнена модель [7, 16, 54, 95], яка відображає регуляторні механізми, що визначають чутливість пшениці до яровизації, припускає, що локус *Vrn2*, продукти експресії якого негативно регулюють транскрипцію генів *Vrn1* та *Vrn3*, пригнічується умовами яровизації (низька температура та скорочений день) [4, 48, 79]. Вплив тривалості світлового дня на активність транскрипції генів *Vrn2* аналогічний її впливу на локус *Vrn3*, який позитивно регулює гени *Vrn1* [48, 5]. У яровизованих рослин, що вирощені на

скороченому дні, активність транскрипції генів *Vrn1* значно вища, ніж у неярвизованих, для яких рівень транскрипції *Vrn1* все ж вище, ніж якби ці рослини були вирощені при подовженому дні (оскільки подовжений день активує, а скорочений, навпаки, пригнічує експресію локусу *Vrn2*, який негативно регулює *Vrn3*) [48]. У зв'язку з цим припускається, що локус *Vrn1* активується умовами ярвизації незалежно від генів *Vrn2* та *Vrn3* [48, 54].

Отже, після проростання ранньою осінню, коли тривалість світлового дня все ще достатньо довга, транскрипційна активність гена *Vrn3* пригнічена високим вмістом продуктів експресії локусу *Vrn2*, внаслідок чого знижена експресія *Vrn1* [5, 4]. Однак репресія генів *Vrn1* є неповною, і продукти їх експресії хоч і в незначній кількості, але все ж таки присутні. Вторинний ефект від накопичення продуктів експресії *Vrn1* виявляється в пригніченні експресії локусу *Vrn2*, внаслідок чого активується ген *Vrn3*, який позитивно регулює *Vrn1* (рис. 2) – регуляція з позитивним зворотним зв'язком [18, 79, 48, 64]. Зміна в активності транскрипції будь-якого гена, що утворює регуляторну петлю, призводить до зміни в експресії двох інших генів. Припускається, що ген *Vrn-D4* проявляє активність у листках та бере участь в активації або є частиною регуляторної петлі з позитивним зворотним зв'язком, яка утворена генами *Vrn1/Vrn2/Vrn3* [95]. Проте достовірно невідомо, який саме ген регуляторної петлі знаходиться під впливом продуктів експресії локусу *Vrn-D4*. У рослин з озимим типом розвитку, що не пройшли ярвизацію, регуляторна петля не активна. Поява домінантного алеля *Vrn-D4* спричиняє її активацію, що супроводжується зниженням чутливості до ярвизації [95].

При вирощуванні на скороченому дні всі три локуси показують низький рівень експресії, проте при переході на подовжений день експресія локусів *Vrn1* та *Vrn3* різко підвищується [5, 48]. Наявність білків *Vrn1* спільно з дією низької температури на скороченому дні під час ярвизації створює необхідні умови для пригнічення транскрипції генів *Vrn2* [4]. Окрім того, довготривала експозиція низькою температурою індукує різке зростання активності експресії генів *Vrn1* у рослин, що пройшли ярвизацію [23]. Після ярвизації через зниження концентрації продуктів експресії генів *Vrn2* підсилюється транскрипція локусу *Vrn3*. Це обумовлено його активацією продуктами експресії генів, які залучені у контроль чутливості до фотоперіоду – *Ppd* та *CO* [72, 98]. Продукти експресії гена *Vrn3* з листя транспортуються у апікальну меристему [84], де індукують гени *Vrn1* (рис. 2) та паралогічні їм *FUL2* і *FUL3*, ініціюючи тим самим перехід до генеративної фази розвитку [16, 5]. Незважаючи на те, що подовжений фотоперіод позитивно регулює *Vrn2*, індуковані ярвизацією гени *Vrn1* пригнічують експресію цього локусу. При-

пускається, що експресія генів *Vrn1* в листках є важливою для підтримання пригніченого стану локусу *Vrn2* в озимих рослинах після ярвизації [16]. Таким чином, ярвизовані рослини в умовах подовженого дня характеризуються низьким рівнем експресії локусу *Vrn2* та високим рівнем експресії генів *Vrn1* і *Vrn3*, що спричиняє перехід до генеративної стадії розвитку. В той же час неярвизовані озимі рослини, навпаки, відрізняються високою активністю експресії локусу *Vrn2* з одночасно низьким рівнем експресії генів *Vrn1* та *Vrn3*, що обумовлює пригнічення зацвітання за відсутності проходження ярвизації.

Висновки. Потребу пшениці у ярвизації можна розглядати як адаптивний механізм, що забезпечує затримку у переході до репродуктивної фази розвитку в зимовий період, захищаючи тим самим чутливу апікальну меристему від дії несприятливих умов. Одним із ключових елементів цього механізму є локус *Vrn2*. Умови ярвизації спрямовані на пригнічення *Vrn2*, що необхідно для подальшого переходу до репродуктивної фази розвитку (зацвітання), та активацію генів *Vrn1*, які, окрім індукції флорального морфогенезу, виконують роль постійного репресора локусу *Vrn2* після проходження ярвизації і до кінця вегетації.

Ініціація часу зацвітання пшениці визначається тонким балансом між пригнічуючими та активуючими силами, що впливають на регуляторні ділянки локусу *Vrn1*. При цьому центральну роль відіграє ген *Vrn3*, регуляція активності якого здійснюється в процесі конкурентної взаємодії, зокрема між продуктами експресії генів *Vrn2*, *Ppd1* та *CO*. Інтеграційна роль гена *Vrn3* виявляється в об'єднанні механізмів контролю чутливості до фотоперіоду та ярвизації, яка реалізована через конкурентну взаємодію між білками, що утримують ССТ-домени, експресія яких здійснюється з генів, чутливих до різного роду абіотичних стресорів. Таким чином, утворюється гнучка комбінаторна система, яка об'єднує чутливість до внутрішніх і зовнішніх сигналів та формує найбільш ефективну модель регуляції часу зацвітання залежно від умов навколишнього середовища, а також здатності організму розвиватися в цих умовах.

Дослідження молекулярно-генетичної детермінації та адаптивних реакцій системи генів, що залучені у контроль розвитку пшениці, має важливе значення для вирішення теоретичних та прикладних завдань генетики і селекції. Сучасні уявлення про молекулярно-генетичні механізми, що регулюють темп розвитку пшениці, дозволяють більш чітко зрозуміти взаємодію між ключовими компонентами цієї системи та більш ґрунтовно пояснити їх вплив на кількісні і якісні показники агрономічно-цінних ознак. Встановлення молекулярної структури генів *Vrn* у зразків, що відрізняються за чутливістю до ярвизації, дозволило розробити систему ДНК-мар-

керів, які наразі використовуються для ідентифікації досліджуваних генотипів за відповідними алелями. Маркування генів *Vrn* надає похідну інформацію для розуміння адаптивної цінності окремих алелів або їх комбінацій, що дозволить максимально ефективно створювати сорти, оптимально адаптовані до умов навколишнього середовища конкретного регіону.

MOLECULAR-GENETIC MECHANISMS REGULATION OF GROWTH HABIT IN WHEAT

A.F. Muterko, I.A. Balashova, V.I. Fayt, Yu.M. Sivolap

Plant Breeding and Genetics Institute – National
Center of Seed and Cultivar Investigation, Odesa
E-mail: muterko@gmail.com

The vernalization requirement determines the need of plants in a prolonged period of cold treatment for transition from a vegetative to reproductive phase. The vernalization response in wheat is controlled by the alleles of *Vrn* genes. A molecular structure and causes which are basis of alternative alleles have been defined for the almost all *Vrn* genes. *Vrn1*, *Vrn2* and *Vrn3* interacts epistatically and form the positive feedback loop that is activated in winter wheat by the vernalization conditions. *Vrn2* is critical for flowering repression in winter wheat before vernalization whereas *Vrn1* in mostly determines of flowering time for spring varieties. In present review the studies of molecular mechanisms and genetic determination of pathways that regulate of growth habit (type of development) in wheat have been analyzed. The organization, structure and functions of the *Vrn* genes and their expression products are discussed. Particular attention is paid to the regulatory regions structure and the molecular mechanisms of these genes expression. The modern view on the model that includes of interaction between the *Vrn* genes and environmental during vernalization has been formulated.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ТИПА РАЗВИТИЯ ПШЕНИЦЫ

А.Ф. Мутерко, И.А. Балашова,
В.И. Файт, Ю.М. Сиволап

Необходимость в продолжительном воздействии на растения пониженной температуры для индукции перехода к репродуктивной стадии развития определяется их потребностью в яровизации. Чувствительность пшеницы к яровизации зависит от аллельного состояния генов системы *Vrn*. Почти для всех генов этой системы установлена молекулярная структура и исследованы причины, обуславливающие возникновение альтернативных аллельных вариантов. Гены *Vrn1*, *Vrn2* и *Vrn3* взаимодействуют эпистатически и формируют регуляторную петлю с положительной обратной связью, которая в ози-

мых растениях активируется в процессе яровизации. Локус *Vrn2* является ключевым в механизме репрессии перехода к цветению озимых растений до прохождения яровизации, тогда как локус *Vrn1* главным образом определяет сроки колошения яровых сортов. Обзор посвящен анализу исследования молекулярных механизмов и генетической детерминации контроля чувствительности к яровизации у пшеницы. В деталях обсуждается организация, структура и функции генов *Vrn* и продуктов их экспрессии. Особое внимание уделено структуре регуляторных участков этих генов и молекулярным механизмам регуляции их экспрессии. Сформулировано современное видение модели, отражающей взаимодействия между генами *Vrn* и факторами внешней среды во время яровизации.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Cockram J., Jones H., Leigh F.J. et al. Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication, and sustainable productivity // J. Exp. Bot. – 2007. – **58**, № 6. – P. 1231–1244.
2. Worland A. The influence of flowering time genes on environmental adaptability in European wheats // Euphytica. – 1996. – **89**, № 1. – P. 49–57.
3. Yan L., Loukoianov A., Tranquilli G. et al. Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2003. – **100**, № 10. – P. 6263–6268.
4. Yan L., Loukoianov A., Blechl A. et al. The wheat *VRN2* gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization // Science. – 2004. – **303**, № 5664. – P. 1640–1644.
5. Yan L., Fu D., Li C. et al. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2006. – **103**, № 51. – P. 19581–19586.
6. Yoshida T., Nishida H., Zhu J. et al. *Vrn-D4* is a vernalization gene located on the centromeric region of chromosome 5D in hexaploid wheat // Theor. Appl. Genet. – 2010. – **120**, № 3. – P. 543–552.
7. Distelfeld A., Li C., Dubcovsky J. Regulation of flowering in temperate cereals // Curr. Opin. Plant Biol. – 2009. – **12**, № 2. – P. 178–184.
8. Tadege M., Sheldon C., Helliwell C. et al. Reciprocal control of flowering time by *OsSOC1* in transgenic *Arabidopsis* and by *FLC* in transgenic rice // Plant Biotechnol. – 2003. – **1**, № 5. – P. 361–369.
9. Adam H., Ouellet F., Kane N. et al. Overexpression of *TaVRN1* in *Arabidopsis* promotes early flowering and alters development // Plant Cell Physiol. – 2007. – **48**, № 8. – P. 1192–1206.
10. Diallo A., Kane N., Agharbaoui Z. et al. Heterologous expression of wheat *VERNALIZATION 2 (TaVRN2)* gene in *Arabidopsis* delays flowering and enhances freezing tolerance // PLoS One. – 2010. – **5**, № 1. – e8690.

11. Danyluk J., Kane N., Breton G. et al. TaVRT-1, a putative transcription factor associated with vegetative to reproductive transition in cereals // *Plant Physiol.* – 2003. – **132**, № 4. – P. 1849–1860.
12. Trevaskis B., Bagnall D., Ellis M. et al. MADS box genes control vernalization-induced flowering in cereals // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2003. – **100**, № 22. – P. 13099–13104.
13. Murai K., Miyamae M., Kato H. et al. *WAP1*, a wheat *APETALA1* homolog, plays a central role in the phase transition from vegetative to reproductive growth // *Plant Cell Physiol.* – 2003. – **44**, № 12. – P. 1255–1265.
14. Distelfeld A., Dubcovsky J. Characterization of the maintained vegetative phase deletions from diploid wheat and their effect on *VRN2* and *FT* transcript levels // *Mol. Genet. Genom.* – 2010. – **283**, № 3. – P. 223–232.
15. Shitsukawa N., Ikari C., Shimada S. et al. The einkorn wheat (*Triticum monococcum*) mutant, maintained vegetative phase, is caused by a deletion in the *VRN1* gene // *Genes Genet. Syst.* – 2007. – **82**, № 2. – P. 167–170.
16. Chen A., Dubcovsky J. Wheat TILLING mutants show that the vernalization gene *VRN1* downregulates the flowering repressor *VRN2* in leaves but is not essential for flowering // *PLoS Genet.* – 2012. – **8**, № 12. – e1003134.
17. Kinjo H., Shitsukawa N., Takumi S., Murai K. Diversification of three *APETALA1/FRUITFULL*-like genes in wheat // *Mol. Genet. Genom.* – 2012. – **287**, № 4. – P. 283–294.
18. Loukoianov A., Yan L., Blechl A. et al. Regulation of *VRN1* vernalization genes in normal and transgenic polyploid wheat // *Plant Physiol.* – 2005. – **138**, № 4. – P. 2364–2373.
19. Stelmakh A.F. Growth habit in common wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.) // *Euphytica.* – 1987. – **36**, № 2. – P. 513–519.
20. Stelmakh A.F. Genetic effects of *Vrn* genes on heading date and agronomic traits in bread wheat // *Euphytica.* – 1993. – **65**. – P. 53–60.
21. Zhang X., Xiao Y., Zhang Y. et al. Allelic variation at the vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1* and *Vrn-B3* in Chinese wheat cultivars and their association with growth habit // *Crop Sci.* – 2008. – **48**, № 2. – P. 458–470.
22. Pugsley A.T. A genetic analysis of the spring-wheat habit in wheat // *Aust. J. Agric. Res.* – 1971. – **22**. – P. 21–23.
23. Alonso-Peral M.M., Oliver S.N., Casao M.C. et al. The promoter of the cereal *VERNALIZATION1* gene is sufficient for transcriptional induction by prolonged cold // *PLoS One.* – 2011. – **6**, № 12. – e29456.
24. Sasani S., Hemming M.N., Oliver S. et al. The influence of vernalization and daylength cues on the expression of flowering-time genes in the leaves and shoot apex of barley (*Hordeum vulgare*) // *J. Exp. Bot.* – 2009. – **60**, № 7. – P. 2169–2178.
25. Zitzewitz J. von, Szucs P., Dubcovsky J. et al. Molecular and structural characterization of barley vernalization genes // *Plant Mol. Biol.* – 2005. – **59**, № 3. – P. 449–467.
26. Hemming M.N., Fieg S., Peacock W.J. et al. Regions associated with repression of the barley (*Hordeum vulgare*) *VERNALIZATION1* gene are not required for cold induction // *Mol. Genet. Genom.* – 2009. – **282**, № 2. – P. 107–117.
27. Trevaskis B., Tadege M., Hemming M. et al. Short vegetative phase-like MADS-box genes inhibit floral meristem identity in barley // *Plant Physiol.* – 2007. – **143**, № 1. – P. 225–235.
28. Diaz A., Zikhali M., Turner A. et al. 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.
29. Golovnina K., Kondratenko E., Blinov A., Goncharov N. Molecular characterization of vernalization loci *VRN1* in wild and cultivated wheats // *BMC Plant Biol.* – 2010. – **10**, № 168. – P. 168–183.
30. Li G., Yu M., Fang T. et al. Vernalization requirement duration in winter wheat is controlled by *TaVRN-A1* at the protein level // *Plant J.* – 2013. – **76**, № 5. – P. 742–753.
31. Treisman R. The serum response element // *Trends Biochem. Sci.* – 1992. – **17**, № 10. – P. 423–426.
32. Santelli E., Richmond T. Crystal structure of MEF2A core bound to DNA at 1.5 Å resolution // *J. Mol. Biol.* – 2000. – **297**, № 2. – P. 437–449.
33. Патрушев Л.И. Экспрессия генов. – М.: Наука, 2000. – 830 с.
34. Lupas A., Van Dyke M., Stock J. Predicting coiled coils from protein sequences // *Science.* – 1991. – **252**, № 5009. – P. 1162–1164.
35. Limin A., Fowler D. Low-temperature tolerance and genetic potential in wheat (*Triticum aestivum* L.): response to photoperiod, vernalization, and plant development // *Planta.* – 2006. – **224**, № 2. – P. 360–366.
36. Stockinger E., Skinner J., Gardner K. et al. Expression levels of barley *Cbf* genes at the frost resistance-H2 locus are dependent upon alleles at *Fr-H1* and *Fr-H2* // *Plant.* – 2007. – **51**, № 2. – P. 308–321.
37. Francia E., Rizza F., Cattivelli L. et al. Two loci on chromosome 5H determine low-temperature tolerance in a Nure (winter) Tremois (spring) barley map // *Theor. Appl. Genet.* – 2004. – **108**, № 4. – P. 670–680.
38. Knox A., Li C., Vargurifalvi A. et al. Identification of candidate *CBF* genes for the frost tolerance locus *Fr-Am2* in *Triticum monococcum* // *Plant Mol. Biol.* – 2008. – **67**, № 3. – P. 257–270.

39. Galiba G., Vargujfalvi A., Li C. et al. Regulatory genes involved in the determination of frost tolerance in temperate cereals // *Plant Sci.* – 2009. – **176**, № 1. – P. 12–19.
40. Dhillon T., Pearce S., Stockinger E. et al. Regulation of freezing tolerance and flowering in temperate cereals: the *VRN1* connection // *Plant Physiol.* – 2010. – **153**, № 4. – P. 1846–1858.
41. Li C., Dubcovsky J. Wheat FT protein regulates *VRN1* transcription through interactions with *FDL2* // *Plant.* – 2008. – **55**, № 4. – P. 543–554.
42. Стельмах А.Ф., Файт В.И. Эффекты локусов *Vrn* мягкой пшеницы по агрономическим признакам в различных условиях среды // *Цитология и генетика.* – 1995. – **29**, № 4. – С. 54–61.
43. Файт В.И., Авсенин В.И., Паламарчук А.И. Эффекты генів *Vrn-A1a* та *Vrn-B1a* за агрономічними ознаками у *Triticum durum* Desf. // *Селекція і насінництво.* – 2008. – Вип. 96. – С. 252–259.
44. Fu D., Szucs P., Yan L. et al. Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat // *Mol. Genet. Genom.* – 2005. – **273**, № 4. – P. 54–65.
45. Yan L., Helguera M., Kato K. et al. Allelic variation at the *VRN1* promoter region in polyploid wheat // *Theor. Appl. Genet.* – 2004. – **109**, № 8. – P. 1677–1686.
46. Pidal B., Yan L., Fu D. et al. The CArG-Box located upstream from the transcriptional start of wheat vernalization gene *VRN1* is not necessary for the vernalization response // *J. Hered.* – 2009. – **100**, № 3. – P. 355–364.
47. Shcherban A.B., Efremova T.T., Salina E.A. Identification of a new *Vrn-B1* allele using two nearisogenic wheat lines with difference in heading time // *Mol. Breed.* – 2011. – **29**, № 3. – P. 675–685.
48. Dubcovsky J., Loukoianov A., Fu D. et al. Effect of photoperiod on the regulation of wheat vernalization genes *VRN1* and *VRN2* // *Plant Mol. Biol.* – 2006. – **60**, № 64. – P. 469–480.
49. Santra D.K., Santra M., Allan R.E. et al. Genetic and molecular characterization of vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, and *Vrn-D1* in spring wheat germplasm from the Pacific Northwest region of the USA // *Plant Breed.* – 2009. – **128**. – P. 576–584.
50. Szucs P., Skinner J.S., Karsai I. et al. Validation of the *VRN-H2/VRN-H1* epistatic model in barley reveals that intron length variation in *VRN-H1* may account for a continuum of vernalization sensitivity // *Mol. Genet. Genom.* – 2007. – **277**, № 3. – P. 249–261.
51. Cockram J., Chiapparino E., Taylor S.A. et al. Haplotype analysis of vernalization loci in European barley germplasm reveals novel *VRN-H1* alleles and a predominant winter *VRN-H1/VRN-H2* multi-locus haplotype // *Theor. Appl. Genet.* – 2007. – **115**, № 7. – P. 993–1001.
52. Cockram J., Mackay I.J., O'Sullivan D.M. The role of double-stranded break repair in the creation of phenotypic diversity at cereal *VRN1* loci // *Genetics.* – 2007. – **177**. – P. 1–5.
53. Diallo A.O., Ali-Benali M.A., Badawi M. et al. Expression of vernalization responsive genes in wheat is associated with histone H3 trimethylation // *Mol. Genet. Genom.* – 2012. – **287**, № 7. – P. 575–590.
54. Trevaskis B., Hemming M., Dennis E., Peacock W. The molecular basis of vernalization-induced flowering in cereals // *Trends Plant Sci.* – 2007. – **12**, № 8. – P. 352–357.
55. Oliver S., Finnegan E., Dennis E. et al. Vernalization-induced flowering in cereals is associated with changes in histone methylation at the *VERNALIZATION1* gene // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2009. – **106**, № 20. – P. 8386–8391.
56. Sung S., Amasino R. Molecular genetic studies of the memory of winter // *Exp. Bot.* – 2006. – **57**, № 13. – P. 3369–3377.
57. Bernstein B.E., Mikkelsen T.S., Xie X. et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells // *Cell.* – 2006. – **125**, № 2. – P. 315–326.
58. Gendall A., Levy Y., Wilson A., Dean C. The *VERNALIZATION 2* gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in *Arabidopsis* // *Cell.* – 2001. – **107**, № 4. – P. 525–535.
59. Pien S., Fleury D., Mylne J. et al. ARABIDOPSIS TRITHORAX1 dynamically regulates *FLOWERING LOCUS C* activation via histone 3 lysine 4 trimethylation // *Plant Cell.* – 2008. – **20**, № 3. – P. 580–588.
60. Schuettengruber B., Chourrout D., Vervoort M. et al. Genome regulation by Polycomb and Trithorax proteins // *Cell.* – 2007. – **128**, № 4. – P. 735–745.
61. Jiang D., Wang U., Wang Y., He Y. Repression of *FLOWERING LOCUS C* and *FLOWERING LOCUS T* by the *Arabidopsis* polycomb repressive complex 2 components // *PloS One.* – 2008. – **3**, № 10. – e3404.
62. Fu D., Dunbar M., Dubcovsky J. Wheat *VIN3-like PHD* finger genes are upregulated by vernalization // *Mol. Genet. Genom.* – 2007. – **277**, № 3. – P. 301–313.
63. Koyama K., Hatano H., Nakamura J., Takumi S. Characterization of three *VERNALIZATION INSENSITIVE3-like (VIL)* homologs in wild wheat, *Aegilops tauschii* Coss. // *Hereditas.* – 2012. – **149**, № 2. – P. 62–71.
64. Kane N., Agharbaoui Z., Diallo A. et al. *TaVRT2* represses transcription of the wheat vernalization gene *TaVRN1* // *Plant.* – 2007. – **51**, № 4. – P. 670–680.
65. Dubcovsky J., Li C., Distelfeld A. et al. Genes and gene networks regulating wheat development // *Proc. 11th Int. Wheat Genet. Symp. (Brisbane, 24–29 Aug.*

- 2008)/ Eds R. Appels et al. — Sydney : Univ. press, 2008. — P. 24–29.
66. McKinney H., Sando W. Earliness of sexual reproduction in wheat as influenced by temperature and light in relation to growth phases // *Agric. Res.* — 1935. — **51**, № 7. — P. 621–641.
 67. Krekule J. Varietal differences in replacing vernalization by a short day in winter wheat // *Biol. Plant.* — 1964. — **6**. — P. 299–305.
 68. Evans L. Short day induction of inflorescence initiation in some winter wheat varieties // *Austr. J. Plant Physiol.* — 1987. — **14**, № 3. — P. 277–286.
 69. Heide O. Control of flowering and reproduction in temperate grasses // *New Phytol.* — 1994. — **128**, № 2. — P. 347–362.
 70. Wigge P., Kim M., Jaeger K. et al. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis* // *Science.* — 2005. — **309**, № 5737. — P. 1056–1059.
 71. Dubcovsky J., Lijavetzky D., Appendino L., Tranquilli G. Comparative RFLP mapping of *Triticum monococcum* genes controlling vernalization requirement // *Theor. Appl. Genet.* — 1998. — **97**, № 5. — P. 968–975.
 72. Putterill J., Robson F., Lee K. et al. The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors // *Cell.* — 1995. — **80**, № 6. — P. 847–857.
 73. Tranquilli G., Dubcovsky J. Epistatic interactions between vernalization genes *Vrn-Am1* and *Vrn-Am2* in diploid wheat // *J. Hered.* — 2000. — **91**, № 4. — P. 304–306.
 74. Distelfeld A., Tranquilli G., Li C. et al. Genetic and molecular characterization of the *VRN2* loci in tetraploid wheat // *Plant Physiol.* — 2009. — **149**, № 1. — P. 245–257.
 75. Zhu X., Tan C., Cao S., Yan L. Molecular differentiation of null alleles at *ZCCT-1* genes on the A, B, and D genomes of hexaploid wheat // *Mol. Breed.* — 2011. — **27**, № 4. — P. 501–510.
 76. Мутерко О.Ф., Балашова І.А., Сиволян Ю.М. Характеристика малопоширених видів гексаплоїдної та тетраплоїдної пшениці за нуль-алелями генів *ZCCT-1* // *Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. Біологія.* — 2013. — Вип. 34. — С. 103–106.
 77. Ma L.-J., Wang X., Wei L. et al. Sequences analysis of the vernalization gene *VRN2* in different development characteristic common wheat (*Triticum aestivum* L.) // *J. Triticeae Crops.* — 2012. — **32**, № 4. — P. 603–609.
 78. Li C., Distelfeld A., Comis A., Dubcovsky J. Wheat flowering repressor *VRN2* and promoter *CO2* compete for interactions with NUCLEAR FACTOR-Y complexes // *Plant.* — 2011. — **67**, № 5. — P. 763–773.
 79. Trevaskis B., Hemming M., Peacock W., Dennis E. *HvVRN2* responds to daylength, whereas *HvVRN1* is regulated by vernalization and developmental status // *Plant Physiol.* — 2006. — **140**, № 4. — P. 1397–1405.
 80. Turner A., Beales J., Faure S. et al. The pseudo-response regulator *Ppd-H1* provides adaptation to photoperiod in barley // *Science.* — 2005. — **310**, № 5750. — P. 1031–1034.
 81. Robson F., Costa M., Hepworth S. et al. Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants // *Plant.* — 2001. — **28**, № 6. — P. 619–631.
 82. Wenkel S., Turck F., Singer K. et al. *CONSTANS* and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis* // *Plant Cell.* — 2006. — **18**, № 11. — P. 2971–2984.
 83. Law C., Worland A. Genetic analysis of some flowering time and adaptive traits in wheat // *New Phytol.* — 1997. — **137**, № 1. — P. 19–28.
 84. Corbesier L., Vincent C., Jang S. et al. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis* // *Science.* — 2007. — **316**, № 5827. — P. 1030–1033.
 85. Turck F., Fornara F., Coupland G. Regulation and identity of florigen: *FLOWERING LOCUS T* moves center stage // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2008. — **59**, № 1. — P. 573–594.
 86. Bonnin I., Rousset M., Madur D. et al. FT genome A and D polymorphisms are associated with the variation of earliness components in hexaploid wheat // *Theor. Appl. Genet.* — 2008. — **116**, № 3. — P. 383–394.
 87. Chen F., Gao M., Zhang J. et al. Molecular characterization of vernalization and response genes in bread wheat from the Yellow and Huai Valley of China // *BMC Plant Biol.* — 2013. — **13**. — P. 199.
 88. Chen Y., Carver B., Wang S. et al. Genetic regulation of developmental phases in winter wheat // *Mol. Breed.* — 2010. — **26**, № 4. — P. 573–582.
 89. Iwaki K., Haruna S., Niwa T., Kato K. Adaptation and ecological differentiation in wheat with special reference to geographical variation of growth habit and *Vrn* genotype // *Plant Breed.* — 2001. — **120**. — P. 107–114.
 90. Iwaki K., Nakagawa K., Kuno H., Kato K. Ecogeographical differentiation in east asian wheat, revealed from the geographical variation of growth habit and *Vrn* genotype // *Euphytica.* — 2000. — **111**. — P. 137–143.
 91. O'Brien L., Morell M., Wrigley C., Appels R. The World Wheat Book. A History of Wheat Breeding / Eds A.P. Bonjean, W.J. Angus. — Lavoisier, 2001. — P. 611–648.
 92. Pugsley A.T. Additional genes inhibiting winter habit in wheat // *Euphytica.* — 1972. — **21**, № 3. — P. 547–552.
 93. Kato K., Nakagawa K., Kuno H. Chromosomal location of the vernalization response, *Vrn2* and *Vrn4*,

- in common wheat, *Triticum aestivum* L. // Wheat Inform. Serv. – 1993. – **76**, № 1. – P. 53.
94. Kato K., Yamashita M., Ishimoto K. et al. Genetic analysis of two genes for vernalization response, the former *Vrn2* and *Vrn4*, using PCR based molecular markers // Proc. 10th Int. wheat genet. symp. – Paestum, 2003. – P. 971–973.
95. Kippes N., Zhu J., Chen A. et al. Fine mapping and epistatic interactions of the vernalization gene *VRN-D4* in hexaploid wheat // Mol. Genet. Genom. – 2014. – **289**, № 1. – P. 47–62.
96. Sung S., Schmitz R.J., Amasino R.M. A PHD finger protein involved in both the vernalization and photoperiod pathways in Arabidopsis // Gene Dev. – 2006. – **20**. – P. 3244–3248.
97. Turner A.S., Faure S., Zhang Y., Laurie D.A. The effect of day-neutral mutations in barley and wheat on the interaction between photoperiod and vernalization // Theor. Appl. Genet. – 2013. – **126**, № 9. – P. 2267–2277.
98. Beales J., Turner A., Griffiths S. et al. A pseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. – 2007. – **115**, № 5. – P. 721–733.
99. Mokuanu N.V., Fayt V.I. Differences in the effects of alleles of the gene *Vrd1* and *Ppd-D1* with respect to winter hardiness, frost tolerance and yield in winter wheat // Cytology and Genetics. – 2008. – **42**, № 6. – P. 384–390.
100. Dubcovsky J., Chen C., Yan L. Molecular characterization of the allelic variation at the *VRN-H2* vernalization locus in barley // Mol. Breed. – 2005. – **15**, № 4. – P. 395–407.
101. Valverde F., Mouradov A., Soppe W. et al. Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering // Science. – 2004. – **303**, № 5660. – P. 1003–1006.

Надійшла 29.10.12