

УДК 575.162

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНОВ *Ppd* И *Vrn* ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ВЕГЕТАЦИОННОГО ПЕРИОДА СОРТОВ ЯЧМЕНЯ

© 2013 г. М.М. Злотина, О.Н. Ковалева, И.Г. Лоскутов, Е.К. Потоккина

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства
им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия,
e-mail: e.potokina@vir.nw.ru

Поступила в редакцию 24 декабря 2012 г. Принята к публикации 18 января 2013 г.

У 91 сорта ярового ячменя, допущенного к использованию на территории России и Беларуси, с помощью аллель-специфичных молекулярных маркеров проанализировано аллельное состояние генов *Vrn-H1*, *Vrn-H2*, *Vrn-H3*, *Ppd-H1* и *Ppd-H2*. В полевом эксперименте произведена оценка сроков выколашивания у сортов этой же выборки в условиях северо-запада России.

Показано, что сорта ячменя, имеющие доминантный аллель гена *Ppd-H1*, достоверно опережают другие генотипы по скорости развития (колошению) и являются более скороспелыми при возделывании в условиях длинного светового дня. Среди изученного в данном эксперименте отечественного сортамента ячменей носители доминантного аллеля *Ppd-H1* составили всего 9 %. Аллели генов *Vrn* также оказывают достоверное влияние на продолжительность периода «всходы–колошение» изученных сортов. Среди генотипов, несущих одинаковые аллели генов *Ppd-H1* и *Ppd-H2*, носители аллельной комбинации *Vrn-H1vrn-H2Vrn-H3* переходят к колошению достоверно раньше генотипов с другим сочетанием аллелей генов *Vrn*. Использование аллель-специфичных маркеров генов *Ppd* и *Vrn* может значительно упростить отбор на скороспелость и ускорить селекцию сортов на этот признак.

Ключевые слова: молекулярные маркеры, аллели генов *Ppd* и *Vrn*, сроки колошения, маркер-вспомогательная селекция, ячмень.

По производству ячменя (*Hordeum vulgare* L.) и занятым под этой культурой площадям Россия занимает первое место в мире (Сортосы ресурсы ..., 2010). Как скороспелая, засухоустойчивая и солевыносливая культура ячмень возделывается практически во всех регионах страны, легко приспосабливаясь к контрастным условиям климата и разнообразию почв. Для каждой климатической зоны требуются сорта с определенной продолжительностью вегетационного периода. Для Нечерноземной зоны России показано преимущество по урожайности сортов ячменя среднеспелого и позднеспелого типов (Глуховцев, 2004). На территории европейского Севера с суммой температур от 800–1000 °С до 1200–1400 °С возможно возделывание в открытом грунте

только ультраскороспелых и скороспелых холодостойких сортов (Батакова, 2011). Селекция на скороспелость затрудняется наличием корреляции между продолжительностью вегетационного периода и урожайностью. Известно, что ультраскороспелые сорта при благоприятном длинном периоде вегетации, как правило, являются менее урожайными (Лукьяненко, 1990). Однако в северных районах европейской части России с коротким и очень коротким вегетационным периодом такие сорта оказываются вне конкуренции по сравнению с потенциально более продуктивными, но в большинстве случаев невызревающими сортами (Гуляев, 1999).

Общая продолжительность вегетационного периода зерновых культур зависит от длины

отдельных межфазных периодов: всходы–колошение и колошение–созревание. У ячменя и пшеницы контроль продолжительности периода всходы–колошение в основном осуществляют генетические системы генов *Vrn* (vernalization response) и *Ppd* (photoperiod response). Гены *Ppd* определяют реакцию растений ячменя на длину дня и, как следствие, сроки зацветания и начала колошения растений в разных условиях возделывания. Гены *Vrn* определяют потребность растений в яровизации для перехода к колошению, тем самым также участвуют в регуляции скорости развития и выраженности структуры урожая ячменя. Разнообразие комбинаций аллелей генов *Ppd* и *Vrn*, встречающихся у ячменя, возможно, обуславливает адаптацию растений к различным условиям окружающей среды.

На сегодняшний день для ячменя разработаны молекулярные маркеры, позволяющие идентифицировать аллели *Vrn* и *Ppd* на больших выборках сортов и селекционных линий с помощью ПЦР и рестрикционного анализа. Целью настоящего исследования было выявление аллелей генов *Vrn* (*Vrn-H1*, *Vrn-H2*, *Vrn-H3*) и *Ppd* (*Ppd-H1*, *Ppd-H2*) у яровых сортов ячменя, возделываемых на территории России и Беларуси, а также сравнение сроков выколашивания сортов ячменя, несущих разные комбинации аллелей изучаемых генов, в условиях северо-западного региона РФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на 91 сорте ячменя, районированном в различных климатических зонах России и сохраняемом в коллекции генофонда Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВИР). Данные о сроках появления всходов и начала колошения растений ячменя были получены в результате полевого эксперимента 2012 г., проведенного на Пушкинской опытной станции ВИР. Задача полевого эксперимента состояла в предварительном сравнительном анализе продолжительности фазы «всходы–колошение» у генотипов с разными сочетаниями аллелей *Vrn* и *Ppd* при выращивании в одних и тех же условиях.

Для молекулярно-генетического анализа аллелей генов *Ppd* и *Vrn* геномную ДНК

выделяли из листьев ячменя по стандартной методике с использованием СТАВ-буфера (Saghai-Marooft *et al.*, 1984). Маркирование генов *Vrn* и *Ppd* осуществляли с помощью ПЦР с использованием опубликованных аллель-специфичных праймеров (табл. 1) и рестрикционного анализа.

ПЦР проводили в термоциклере (GeneAmp PCR system 9700). При выявлении аллелей гена *Ppd-H1* в состав реакционной смеси объемом 20 мкл входили: 50–100 нг ДНК, 1 × буфер для Taq полимеразы (pH 8,6, 2,5 mM Mg²⁺) (Sileks), 200 мкмоль dNTPs, 0,25 мкмоль каждого праймера и 2,5 ед. Taq полимеразы (Dialat). Рестрикционный анализ проводили в общем объеме 15 мкл, содержащем 3 мкл продукта ПЦР, 1 × SEBuffer B (pH 7,6), 7,5 ед. активности эндонуклеазы *Msp I*.

При тестировании аллелей гена *Ppd-H2* в состав реакционной смеси объемом 25 мкл входили: 50–100 нг ДНК, 1 × буфер для Taq полимеразы (pH 8,6, 2,5 mM Mg²⁺) (Sileks), 200 мкмоль dNTPs, 0,20 мкмоль каждого праймера и 2,5 ед. Taq полимеразы (Dialat).

При маркировании аллелей гена *Vrn-H1* в состав реакционной смеси объемом 20 мкл входили: 50–100 нг ДНК, 1 × буфер для Taq полимеразы (pH 8,6, 2,5 mM Mg²⁺) (Sileks), 200 мкмоль dNTPs, 0,5 мкмоль каждого праймера и 2,5 ед. Taq полимеразы (Dialat).

При молекулярном анализе гена *Vrn-H2* реакционная смесь объемом 25 мкл включала: 50–100 нг ДНК, 1 × буфер для Taq полимеразы (pH 8,6, 2,5 mM Mg²⁺) (Sileks), 200 мкмоль dNTPs, 0,20 мкмоль каждого праймера и 2,5 ед. Taq полимеразы (Dialat).

При выявлении аллелей гена *Vrn-H3* в состав реакционной смеси объемом 25 мкл входили: 50–100 нг ДНК, 1 × буфер для Taq полимеразы (pH 8,6, 2,5 mM Mg²⁺) (Sileks), 200 мкмоль dNTPs, 0,20 мкмоль каждого праймера и 2,5 ед. Taq полимеразы (Dialat). Рестрикционный анализ проводили в общем объеме 15 мкл, содержащем 3 мкл продукта ПЦР, 1 × SEBuffer 2K (pH 7,6), 2,5 ед. активности эндонуклеазы *Ksp22I*.

Визуализацию продуктов ПЦР проводили с помощью электрофореза в 1,3 %-м агарозном геле в 0,5 × TBE буфере (напряжение 100–120 V, 1–1,5 ч) с добавлением бромистого этидия.

Таблица 1

Последовательности аллель-специфичных праймеров,
опубликованные для генов *Ppd* и *Vrn* ячменя, использованные в анализе

Ген	Тестируемый аллель гена	Последовательность аллель-специфичных праймеров, использованных в анализе	Температура отжига праймеров, t°	Ожидаемый размер ДНК-фрагмента, пн	Литературный источник
<i>Ppd-H1</i>	<i>Ppd-H1</i>	Jones5-F: GATGGATTCAAAGGCAAGGA Jones5-R: CGTTAGAGCCCTGCTTCATC	60	620/MspI = = 276+269+70	Jones <i>et al.</i> , 2008
<i>Ppd-H1</i>	<i>ppd-H1</i>	Jones5-F: GATGGATTCAAAGGCAAGGA Jones5-R: CGTTAGAGCCCTGCTTCATC	60	620/MspI = = 276+339	
<i>Ppd-H2</i>	<i>Ppd-H2</i>	HvFT3-F: GTCCTCCTCCAGTATATGTC HvFT3-R: CТАCTCCCCTTGAGAACTTTC	60	1433	Kikuchi <i>et al.</i> , 2009
<i>Ppd-H2</i>	<i>ppd-H2</i>	HvFT3-F4: GGATGGATCGGATТАТТАТТGTATG HvFT3-R1: CTGCACATТАТТТGTGATGCAA	60	1500	
<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H1</i>	Пара праймеров № 1 HvBM5A-intronI-F3b: CTTGCATGTGTTGTCGGTCT HvBM5A-intronI-R3b: GCTGGGACAAGACTCTACGG	60	830 или 344	Cockram <i>et al.</i> , 2009
<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H1</i>	Пара праймеров № 2 HvBM5A-intronI-F1: GTTCTCCACCGAGTCATGGT HvBM5A-TE-R1: AGAGATGGAGGCATGGAGCA	60	488	
<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H1</i> / <i>vrn-H1</i>	Пара праймеров № 3 HvBM5A-exon2-F1: TCCCAAGAAAАСТTGAACAACACCAG HvBM5Aexon2-R1: ATTAGGTTACATCATTСGACCA	60	616 или 574	
<i>Vrn-H2</i>	<i>Vrn-H2</i>	HvZCCT.06F: CCTAGTTAAAACATATATCCATAGAGC HvZCCT.07R: GATCGTTGCGTTGCTAATAGTG	60	307 и 273	Karsai <i>et al.</i> , 2005
<i>Vrn-H3</i>	<i>Vrn-H3</i>	HvFT1-R: ACGTACGTCCCTTTTCGATG HvFT1-F: CGCTAGGACTTGGAGCATCT	60	350/Ksp22I = = 138+142+69	Kikuchi <i>et al.</i> , 2009
<i>Vrn-H3</i>	<i>vrn-H3</i>	HvFT1-R: ACGTACGTCCCTTTTCGATG HvFT1-F: CGCTAGGACTTGGAGCATCT	60	350/Ksp22I = = 138+211	

Оценку достоверности и степени влияния комбинации аллелей анализируемых генов на продолжительность вегетационного периода (начало колошения) проводили с помощью непараметрических критериев Краскела–Уоллеса (Kruskal–Wallis test) и Манна–Уитни (Mann–Whitney U-test), с использованием программного обеспечения Statistica 5.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Маркирование аллелей генов *Ppd* ячменя

Фотопериодическая чувствительность (ФПЧ) пшеницы и ячменя контролируется главным образом локусами *Ppd*, локализованными на второй группе гомеологичных хромосом у пше-

ницы и хромосоме 2Н у ячменя. Однако эффект локусов *Ppd*, оказываемый на ФПЧ, у этих видов различен (Cockram *et al.*, 2007). У пшеницы слабая ФПЧ означает, что растения переходят к колошению на коротком дне в те же сроки, что и на длинном дне. Такая нечувствительность к короткому дню (слабая ФПЧ) у растений пшеницы определяется доминантными аллелями генов *Ppd*. Для ячменя такого эффекта не наблюдается. Присутствие доминантного аллеля *Ppd-H1* у растений ячменя определяет быструю реакцию на удлинившийся световой день и, как следствие, раннее колошение в условиях длинного дня. Задержка перехода к фазе колошения на длинном дне связана с наличием рецессивного аллеля (*ppd-H1*). В условиях короткого дня время перехода к колошению у ячменя контролируется другим локусом *Ppd-H2*, локализованным на хромосоме Н1 (Laurie *et al.*, 1995). Сообщается, что носители доминантного аллеля *Ppd-H2* в условиях короткого дня переходят к колошению раньше, чем генотипы с рецессивным аллелем *ppd-H2* (Casao *et al.*, 2011).

При сравнении последовательностей гена *Ppd-H1* у чувствительных и нечувствительных к длинному дню генотипов ячменя были выявлены 23 нуклеотидные замены (SNP, single nucleotide polymorphism), из которых 7 меняют аминокислотный состав кодируемого регуляторного белка (Turner *et al.*, 2005).

Позднее Jones с соавт. (2008) проанализировали у 87 сортов ячменя ассоциацию сроков колошения на длинном и коротком дне с аллельным полиморфизмом *Ppd-H1*. Было установлено, что одна из 23 нуклеотидных замен, выявленных ранее, а именно SNP15, демонстрирует сильную и достоверную связь с анализируемым фенотипом ячменя. SNP15 (С/Т) приводит к замене кодируемой аминокислоты пролин (*Ppd-H1*) на серин (*ppd-H1*). При сравнении картины рестрикции последовательностей гена *Ppd-H1* сорта Igr1 (доминантный аллель, AY970701) и сорта Triumph (рецессивный аллель, AY970704), опубликованных в базе данных NCBI, нами было установлено, что в случае Igr1 нуклеотидная последовательность доминантного аллеля *Ppd-H1* (SNP15(С)) имеет дополнительный сайт, узнаваемый рестриктазой *MspI*.

ПЦР была проведена с парой праймеров, Jones5-F и Jones5-R, описанных Jones с соавт.

(2008) (табл. 1), в результате чего был амплифицирован фрагмент последовательности гена размером 620 п.н., содержащий SNP15. После обработки ПЦР-продукта рестриктазой *MspI* размеры ДНК-фрагментов рецессивного аллеля *ppd-H1* составили 276+339 п.н., для доминантного аллеля *Ppd-H1* – 276+269+70 п.н. (рис. 1).

Только у 8 из 91 проанализированного сорта ячменя (9 %) был идентифицирован доминантный аллель *Ppd-H1*.

Наиболее вероятным геном-кандидатом для локуса *Ppd-H2* ячменя является *HvFT3* (Faure *et al.*, 2007). К настоящему моменту для *HvFT3* описаны доминантный и рецессивный аллели; последний представляет собой усеченный и нефункциональный вариант структуры гена, фактически псевдоген. Наличие доминантного аллеля в условиях короткого дня ускоряет переход к фазе колошения, присутствие рецессивного аллеля наоборот приводит к его задержке (Kikuchi *et al.*, 2009). Установлено, что сорт Morex содержит интактный ген *HvFT3* (доминантный аллель), включающий 4 экзона и 3 интрона, тогда как *HvFT3* у сорта Steptoe утратил почти всю структурную часть, кроме фрагмента одного из экзонов. Этот рецессивный аллель эффективно выявляется с помощью праймеров *HvFT3-F4* и *HvFT3-R1* (табл. 1). Для выявления доминантного аллеля в настоящем исследовании использовали пару праймеров *HvFT3-F* и *HvFT3-R* (Kikuchi *et al.*, 2009) (табл. 1, рис. 2).

Из 91 проанализированного сорта 88 (93 %) являлись носителями доминантного аллеля *Ppd-H2* (*HvFT3*).

Маркирование генов *Vrn-H1*, *Vrn-H2* и *Vrn-H3* ячменя

Реакция на яровизацию у ячменя контролируется тремя основными генами *Vrn-H1*, *Vrn-H2* и *Vrn-H3*, локализованными на хромосомах 5Н, 4Н и 7Н соответственно. Озимыми, т. е. восприимчивыми к яровизации, являются носители аллельной комбинации *vrn-H1 Vrn-H2 vrn-H3*, тогда как остальные аллельные комбинации этих трех генов ассоциированы с «яровым» типом развития (Takahashi, Yasuda, 1971).

Ген *VRN1* кодирует AP1-подобный MADS-бокс-транскрипционный фактор, необходимый

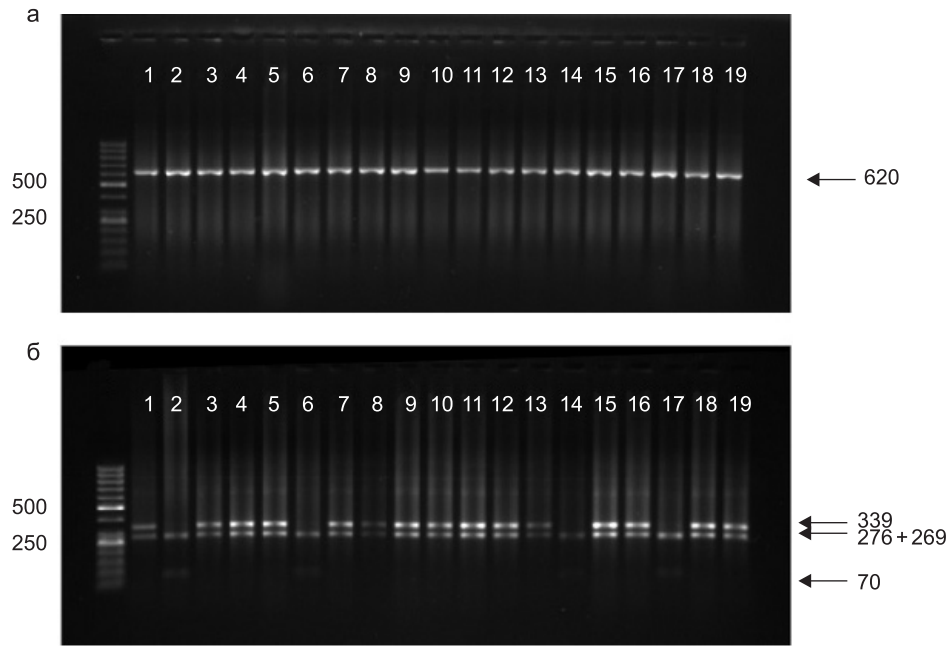


Рис. 1. Выявление доминантного (276+269+70 п.н.) и рецессивного (276+339 п.н.) аллелей гена *Ppd-H1* с помощью CAPS маркера у сортов: 1 – Чакинский 221; 2 – Мамлюк; 3 – Тандем; 4 – Danuta; 5 – Первоцелинник; 6 – Симон; 7 – Никита; 8 – Омский 91; 9 – Казьмински; 10 – Натали; 11 – Зерноградец 770; 12 – Margret; 13 – Messina; 14 – Одесский 22; 15 – Владимир; 16 – Велес; 17 – Биом; 18 – Бином; 19 – Ястреб.

а – продукт ПЦР с парой праймеров Jones5-F, Jones5-R; б – картина рестрикции продукта ПЦР с эндонуклеазой *MspI*.

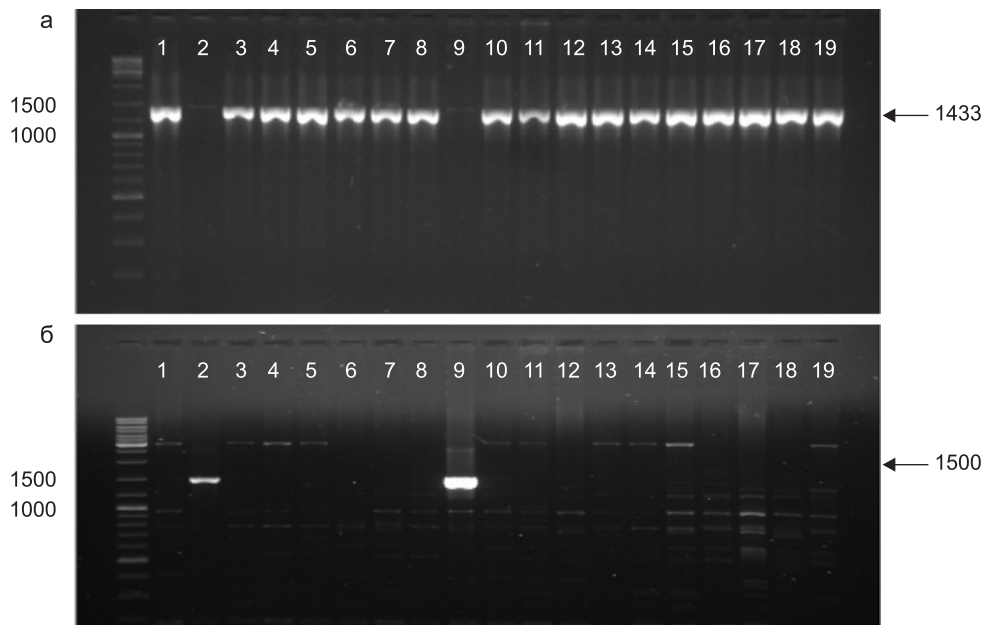


Рис. 2. Выявление доминантного (1433 п.н.) (а) и рецессивного (1500 п.н.) (б) аллелей гена *Ppd-H2* по результатам амплификации с аллель-специфичными праймерами HvFT3-F, HvFT3-R (а) и HvFT3-F4, HvFT3-R1 (б) у сортов: 1 – Ерофей; 2 – Эколог; 3 – Прерия; 4 – Харьковский 99; 5 – Биос-1; 6 – Волгарь; 7 – Джин; 8 – Ача; 9 – Соболек; 10 – Skarlett; 11 – Сонет; 12 – Зерноградец 770; 13 – Задонский 8; 14 – Рахат; 15 – Раушан; 16 – Мик-1; 17 – Зерноградский; 18 – Приазовский 9; 19 – Челябинский 99.

для инициации цветения (Trevaskis *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2003). У озимых форм ген *Vrn-H1* экспрессируется на низком уровне. Делеция в первом интроне *Vrn-H1* («яровой аллель») связана с высоким уровнем экспрессии гена, при этом потребность в яровизации растений отсутствует (Zitzewitz *et al.*, 2005).

При анализе нуклеотидного полиморфизма гена *Vrn-H1* среди 400 сортов ячменя (Cockram *et al.*, 2009) было выявлено 8 аллелей, 2 из которых обуславливают озимый, а 6 – яровой тип развития. Все описанные аллели могут быть идентифицированы в результате ПЦР с использованием трех пар праймеров (Cockram *et al.*, 2009), приведенных в табл. 1. Амплификации фрагмента последовательности гена с парой праймеров № 1, выявляющей «озимый» рецессивный аллель *vrn-H1*, не наблюдалось, за исключением ПЦР с ДНК сорта Волгодон (данные не приведены). Реакция проходила только с парой праймеров № 3 (рис. 3), доказывая наличие доминантного аллеля *Vrn-H1* у 90 анализируемых сортов.

Vrn-H2 – репрессор зацветания – кодирует белок, содержащий «цинковые пальцы» и ССТ домен, и задерживает переход к генеративной фазе у озимых форм ячменя, не прошедших этап яровизации (Karsai *et al.*, 2005).

В локусе *Vrn-H2* у озимых генотипов идентифицирован кластер, состоящий из трех генов *ZCCT-H* (Karsai *et al.*, 2005). Этот «озимый» вариант структуры локуса может рассматриваться

как доминантный аллель. «Яровой» аллель *vrn-H2* характеризуется делецией всех трех *ZCCT-H* генов (Ha, Hb и Hc), является рецессивным и связан с ускоренным колошением (Karsai *et al.*, 2005; Zitzewitz *et al.*, 2005). В настоящее время не установлено, какой именно из трех генов кластера является ключевым. Полагают, что ген *ZCCT-Ha* является наиболее вероятным кандидатом (Dubcovsky *et al.*, 2005). Пара праймеров, HvZCCT.06F и HvZCCT.07R, позволяет амплифицировать фрагменты сразу двух генов: *ZCCT-Ha* (307 пн) и *ZCCT-Hb* (273 пн) (Karsai *et al.*, 2005) (табл. 1). С указанной парой праймеров продукт ПЦР амплифицируется только у озимых форм, диагностируя, таким образом, доминантный «озимый» аллель *Vrn-H2* (рис. 4). Отсутствие ПЦР-продукта свидетельствует о наличии рецессивного «ярового» аллеля *vrn-H2*.

Ген *HvFT1* у ячменя является ортологом гена *FT* (Flowering Locus) у *Arabidopsis* и наиболее вероятным геном-кандидатом для локуса *Vrn-H3* (Yan *et al.*, 2006). В семействе *FT*-подобных генов *HvFT1* является ключевым, ответственным за сроки колошения у ячменя (Kikuchi *et al.*, 2009). Показано, что в условиях, инициирующих цветение, белок FT синтезируется в листьях и транспортируется в апикальную меристему побега, что сопровождается переходом растений от вегетативной фазы развития к репродуктивной (Corbesier *et al.*, 2007; Jaeger, Wigge, 2007; Distelfeld *et al.*, 2009).

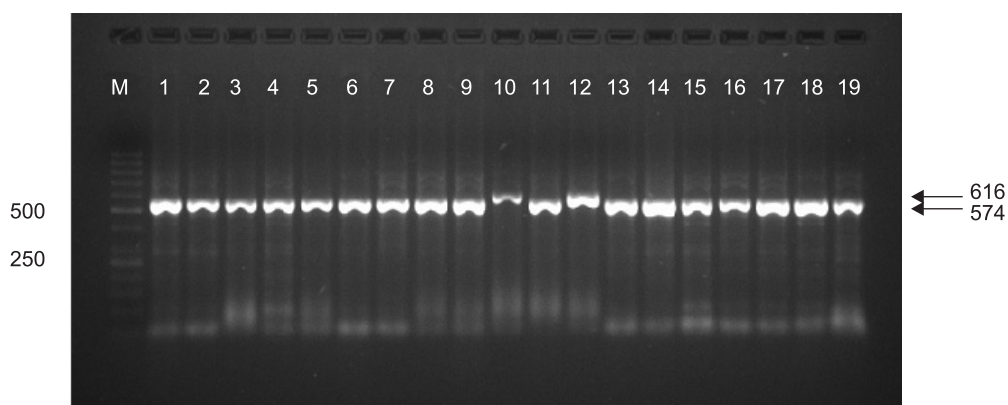


Рис. 3. Выявление доминантного аллеля *VRN-H1* у сортов: 1 – Прерия; 2 – Харьковский 99; 3 – Биос-1; 4 – Волгарь; 5 – Джин; 6 – Ача; 7 – Соболек; 8 – Skarlett; 9 – Сонет; 10 – Зерноградец 770; 11 – Задонский 8; 12 – Рахат; 13 – Раушан; 14 – Мик-1; 15 – Зерноградский; 16 – Приазовский 9; 17 – Челябинский 99; 18 – Безенчукский 2; 19 – Михайловский – по результатам ПЦР с аллель-специфичной парой праймеров № 3.

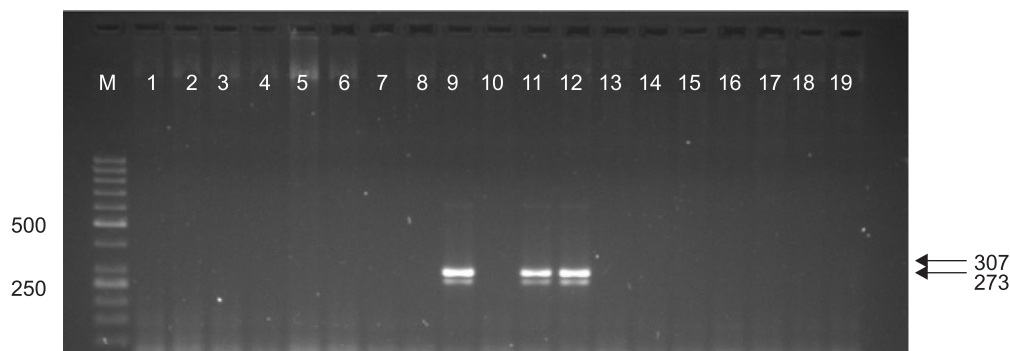


Рис. 4. Выявление доминантного (*Vrn-H2*) (307+273 п.н.) и рецессивного (*vrn-H2*) (отсутствие продукта) аллеля гена *VRN-H2* у сортов: 1 – Джин; 2 – Белогорский; 3 – Купец; 4 – 917-01; 5 – 530-98; 6 – 775-04; 7 – 780-04; 8 – 781-04; 9 – Нудум 95; 10 – С-105; 11 – Астана 2000; 12 – Арна; 13 – Джарело; 14 – Неофит; 15 – Египет; 16 – Сибиряк; 17 – Таусень; 18 – Волгарь; 19 – Лунь по результатам амплификации с аллель-специфичными праймерами HvZCCT.06F, HvZCCT.07R.

Доминантный аллель *Vrn-H3* (DQ898515) отличается от рецессивного аллеля *vrn-H3* (DQ898517) 7 SNP и 2 вставками-делециями в промоторной области гена, а также 2 SNP в первом интроне (Yan *et al.*, 2006). Показано, что полиморфизм первого интрона достоверно ассоциирован с изменчивостью по типу развития (яровой/озимый) у ячменя (Yan *et al.*, 2006). Две нуклеотидные замены в первом интроне (A/T) и (G/C) в позициях 270 и 384 ассоциированы с доминантным аллелем *Vrn-H3* (A и G) и рецессивным аллелем *vrn-H3* (T и C). Наличие аллеля *Vrn-H3* проявляется в ускоренном колошении, а аллеля *vrn-H3* – в задержке перехода к фазе цветения (Yan *et al.*, 2006).

SNP384 (G/C) в случае нуклеотида «G» (*Vrn-H3*) является мишенью для рестриктазы *Ksp22I*. В результате ПЦР с праймерами HvFT1-F и HvFT1-R (табл. 1) амплифицировался продукт ожидаемого размера 350 п.н. После обработки продукта ПРЦ рестриктазой *Ksp22I* размеры фрагментов в случае рецессивного аллеля (*vrn-H3*, SNP384/C) у анализируемых сортов ячменя составили 211 и 138 п.н. Для доминантного аллеля (*Vrn-H3*, SNP384/G), нуклеотидная последовательность которого имеет дополнительный сайт рестрикции для *Ksp22I*, размеры разрезанных фрагментов составили 138, 142 и 69 п.н. (рис. 5). Результаты молекулярно-генетического анализа показали, что 75 % тестируемых сортов ячменя имеют рецессивный аллель *vrn-H3*.

Влияние комбинации аллелей генов *Ppd* и *Vrn* на скорость развития сортов ячменя в условиях северо-западного региона России

Для оценки влияния комбинации аллелей генов *Ppd* и *Vrn* на сроки выколашивания сортов ячменя в условиях Северо-Западного региона РФ были идентифицированы аллели генов *Ppd-H1*, *Ppd-H2*, *Vrn-H1*, *Vrn-H2* и *Vrn-H3* у 91 сорта ячменя, выращенного в течение одного вегетационного периода 2012 г. в условиях Пушкинского опытного участка ВИР (г. Санкт-Петербург). В результате молекулярно-генетического анализа среди тестируемых сортов было выявлено 9 групп, каждая из которых отличалась своей собственной аллельной комбинацией генов *Ppd* и *Vrn* (табл. 2) и содержала от 1 до 56 генотипов ячменя. Самым большим количеством генотипов оказалась представлена группа «RD-DRR», в которую входят сорта, несущие комбинацию аллелей *ppd-H1Ppd-H2Vrn-H1vrn-H2vrn-H3*. Группы «DD-RRR» (*Ppd-H1Ppd-H2vrn-H1vrn-H2vrn-H3*) и «RR-DRR» (*ppd-H1ppd-H2Vrn-H1vrn-H2vrn-H3*), наоборот, были представлены только одним сортом, в связи с чем не рассматривались при дальнейшем статистическом анализе.

Результаты статистического анализа (Kruskal-Wallis test) показали, что сроки начала колошения сортов ячменя достоверно ассоци-

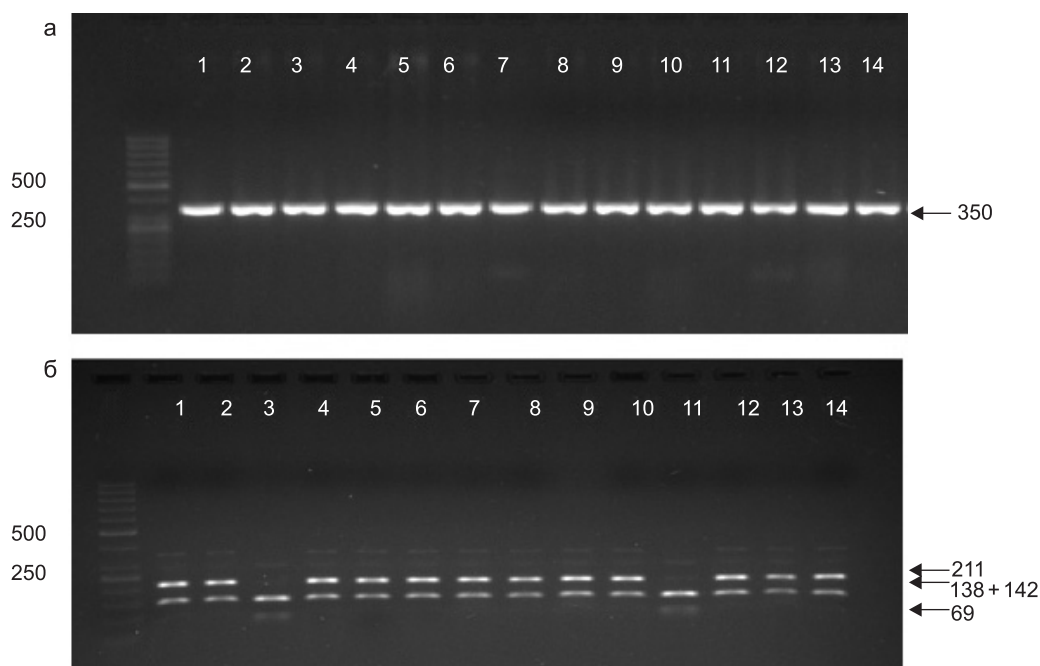


Рис. 5. Выявление доминантного (*Vrn-H3*) (138+142+69 п.н.) и рецессивного (*vrn-H3*) (211+138 п.н.) аллеля гена *Vrn-H3* с помощью CAPS маркера у сортов: 1 – Владимир; 2 – Велес; 3 – Биом; 4 – Бином; 5 – Ястреб; 6 – Т-12; 7 – Жозефин; 8 – Таловский 9; 9 – Марни; 10 – Прикумский 47; 11 – Щедрый; 12 – Родник; 13 – Тимерхан; 14 – Саншайн.

а – продукт ПЦР, размером 350 п.н., полученный при использовании пары праймеров HvFT1-F и HvFT1-R; б – картина рестрикции продукта ПЦР с эндонуклеазой *Ksp22I*.

Таблица 2

Выявленные аллельные комбинации аллелей генов *Ppd-H1*, *Ppd-H2*, *Vrn-H1*, *Vrn-H2* и *Vrn-H3* у проанализированных сортов ячменя

Название сорта, линии	№ по каталогу	Происхождение	Т	<i>Ppd-H1</i>	<i>Ppd-H2</i>	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	<i>Vrn-H3</i>	Обозначение в анализе
Биом	30984	Новосибирская область	45	D	D	D	R	D	DD-DRD
Прикумский 47	31045	Ставропольский край	44	D	D	D	R	D	DD-DRD
Мамлюк	28151	Красноярский край	40	D	D	D	R	R	DD-DRR
Баган	29040	Новосибирская область	43	D	D	D	R	R	DD-DRR
Безенчукский 2	30799	Самара	45	D	D	D	R	R	DD-DRR
Симон	30898	Кемеровская область	47	D	D	D	R	R	DD-DRR
Одесский 22	30969	Украина	44	D	D	D	R	R	DD-DRR
Волгодон	31104	Самарская область	45	D	D/R	R	R	R	DD-RRR
С-105	пр8007	Челябинская область	47	R	D	D	R	D	RD-DRD
Кредо	31116	Челябинская область	47	R	D	D	R	D	RD-DRD
Лукинский	31102	Пензенская область	47	R	D	D	R	D	RD-DRD
Вариант	31103	Пензенская область	49	R	D	D	R	D	RD-DRD
Зенит	31099	Тюменская область	45	R	D	D	R	D	RD-DRD
Зауральский 1	31100	Тюменская область	50	R	D	D	R	D	RD-DRD
Саша	31110	Сиб. НИИСХ	50	R	D	D	R	D	RD-DRD
Красноярский 80	27102	Красноярский край	51	R	D	D	R	D	RD-DRD
Ача	30243	Новосибирская область	45	R	D	D	R	D	RD-DRD

Продолжение таблицы 2

Название сорта, линии	№ по каталогу	Происхождение	T	<i>Ppd-H1</i>	<i>Ppd-H2</i>	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	<i>Vrn-H3</i>	Обозначение в анализе
Skarlett	30371	Германия	46	R	D	D	R	R	RD-DRD
Челябинский 99	30777	Челябинская область	50	R	D	D	R	D	RD-DRD
Михайловский	30803	Московская область	50	R	D	D	R	R	RD-DRD
Челябинец 1	30819	Челябинская область	45	R	D	D	R	D	RD-DRD
Annabel	30821	Германия	50	R	D	D	R	D	RD-DRD
Тандем	30883	Кировская область	45	R	D	D	R	D	RD-DRD
Никита	30900	Кемеровская область	48	R	D/R	D	R	D	RD-DRD
Казьминский	30926	Приморский край	44	R	D	D	R	D	RD-DRD
Селянин	29916	Беларусь	49	R	D	D	R	D	RD-DRD
Купец	31088	Кировская область	56	R	D	D	R	R	RD-DRR
917-01	пр7984	Кировская область	48	R	D	D	R	R	RD-DRR
530-98	пр7986	Кировская область	53	R	D	D	R	R	RD-DRR
775-04	пр7987	Кировская область	57	R	D	D	R	R	RD-DRR
780-04	пр7988	Кировская область	46	R	D	D	R	R	RD-DRR
781-04	пр7989	Кировская область	50	R	D	D	R	R	RD-DRR
Джарело	пр8016	Украина	49	R	D	D	R	R	RD-DRR
Неофит	пр7981	Украина	52	R	D	D	R	R	RD-DRR
Египет	пр7979	Украина	49	R	D	D	R	R	RD-DRR
Сибиряк	30987	Кемерово	52	R	D	D	R	R	RD-DRR
Таусень	31115	Архангельская область	51	R	D	D	R	R	RD-DRR
Лунь	31101	Пензенская область	49	R	D	D	R	R	RD-DRR
IRBE (PR-3528)	31143	Латвия	50	R	D	D	R	R	RD-DRR
Лумага	31144	Латвия	53	R	D	D	R	R	RD-DRR
Фобос	31148	Беларусь	49	R	D	D	R	R	RD-DRR
Криничный	27605	Беларусь	53	R	D	D	R	R	RD-DRR
Кедр	28119	Красноярский край	50	R	D	D	R	R	RD-DRR
Одесский 115	29010	Украина	49	R	D	D	R	R	RD-DRR
Ерофей	29221	Еврейская АО	52	R	D	D	R	R	RD-DRR
Прерия	29438	Украина	46	R	D	D	R	R	RD-DRR
Харьковский 99	29548	Украина	48	R	D	D	R	R	RD-DRR
Биос-1	29634	Московская область	48	R	D	D	R	R	RD-DRR
Волгарь	29831	Куйбышевская область	49	R	D	D	R	R	RD-DRR
Джин	30021	Кировская область	50	R	D	D	R	R	RD-DRR
Сонет	30448	Свердловская область	50	R	D	D	R	R	RD-DRR
Зерноградец 770	30451	Ростовская область	50	R	D	D	R	R	RD-DRR
Задонский 8	30452	Ростовская область	48	R	D	D	R	R	RD-DRR
Рахат	30591	Московская область	51	R	D	D	R	R	RD-DRR
Раушан	30592	Московская область	46	R	D	D	R	R	RD-DRR
Мик-1	30593	Московская область	63	R	D	D	R	R	RD-DRR
Зерноградский	30594	Ростовская область	44	R	D	D	R	R	RD-DRR
Приазовский 9	30595	Ростовская область	47	R	D	D	R	R	RD-DRR
Новичок	30806	Кировская область	45	R	D	D	R	R	RD-DRR
Нур	30820	Московская область	52	R	D	D	R	R	RD-DRR
Сокол	30827	Ростовская область	45	R	D	D	R	R	RD-DRR
Чакинский 221	30859	Тамбовская область	49	R	D	D	R	R	RD-DRR

Окончание таблицы 2

Название сорта, линии	№ по каталогу	Происхождение	T	<i>Ppd-H1</i>	<i>Ppd-H2</i>	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	<i>Vrn-H3</i>	Обозначение в анализе
Danuta	30889	Германия	50	R	D	D	R	R	RD-DRR
Первоцелинник	30895	Оренбургская область	47	R	D	D	R	R	RD-DRR
Омский 91	30918	Омская область	46	R	D	D	R	R	RD-DRR
Нагали	30957	Оренбургская область	46	R	D	D	R	R	RD-DRR
Margret	30966	Германия	50	R	D	D	R	R	RD-DRR
Messina	30967	Германия	52	R	D	D	R	R	RD-DRR
Владимир	30981	Московская область	48	R	D	D	R	R	RD-DRR
Велес	30982	Белгородская область	48	R	D	D	R	R	RD-DRR
Бином	30985	Свердловская область	46	R	D/R	D	R	R	RD-DRR
Ястреб	30986	Самарская область	48	R	D	D	R	R	RD-DRR
T-12	30990	Оренбургская область	45	R	D	D	R	R	RD-DRR
Жозефин	31038	Германия	54	R	D	D	R	R	RD-DRR
Таловский 9	31041	Воронежская область	46	R	D	D	R	R	RD-DRR
Марни	31044	Германия	52	R	D	D	R	R	RD-DRR
Щедрый	31046	Ростовская область	47	R	D	D	R	R	RD-DRR
Родник Прикамья	31077	Кировская область	50	R	D	D	R	R	RD-DRR
Саншайн	31129	Германия	52	R	D	D	R	R	RD-DRR
Поспех	31122	Беларусь	53	R	D	D	R	R	RD-DRR
Липень	пр7908	Беларусь	52	R	D	D	D	R	RD-DRR
Дублет-Липень	пр7909		50	R	D	D	R	R	RD-DRR
Нудум 95	пр8006	Челябинская область	55	R	D	D	D	R	RD-DDR
Тимерхан	31096	Татарстан	53	R	D	D	D	R	RD-DDR
Талер	пр7910		49	R	D	D	D	R	RD-DDR
Астана 2000	пр7991	Казахстан	49	R	D	D	D	D	RD-DDD
Арна	пр7992	Казахстан	47	R	D	D	D	D	RD-DDD
Rubiola	31145	Латвия	57	R	D	D	D	D	RD-DDD
Белогорский	22089	Ленинградская область	49	R	R	D	R	D	RR-DRD
Соболек	30245	Красноярский край	49	R	R	D	R	D	RR-DRD
Эколог	29417	Кировская область	53	R	R	D	R	R	RR-DRR

Примечание. T – продолжительность периода «посев–колошение» в условиях естественного фотопериода. D – доминантный аллель, R – рецессивный аллель. D/R – выявлена гетерозиготность локуса.

ированы с наличием той или иной комбинации аллелей *Vrn* и *Ppd* ($p = 0,0005$) (рис. 6).

Для попарного сравнения анализируемого фенотипа у групп сортов с разной комбинацией аллелей генов *Ppd* и *Vrn* использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни (табл. 3). Результаты анализа показали, что сорта, несущие доминантные аллели генов *Ppd* (DD-DRR), достоверно опережают другие генотипы по скорости развития и являются скороспелыми при возделывании в условиях северо-западного региона России. Результаты согласуются с ранее полученными данными, показывающими связь

раннего колошения ячменя на длинном дне с наличием доминантного аллеля гена *Ppd-H1* (Turner *et al.*, 2005).

Статистический анализ показал, что аллели генов *Vrn* также оказывают достоверное влияние на скорость выколашивания ячменя. Так, генотипы с аллельной комбинацией RD-DRD зацветают достоверно раньше генотипов с другими комбинациями аллелей генов *Vrn* (RD-DRR и RD-DDR) (рис. 6, табл. 3).

Таким образом, результаты молекулярного маркирования генов *Ppd* и *Vrn* позволяют на самых ранних этапах онтогенеза прогнози-

ровать продолжительность вегетационного периода у генотипов ячменя. Использование аллель-специфичных маркеров *Ppd* и *Vrn* может оказаться полезным инструментом для селекции на скороспелость сортов ячменя, способных приспосабливаться к неблагоприятным условиям возделывания в зонах рискованного земледелия (короткий период вегетации, «уход» от засухи и высоких летних температур). Наличие или отсутствие доминантного аллеля гена *Ppd-H1*, определяющего ранние сроки начала колошения (см. рис. 6), можно определить у любого сорта ячменя в лаборатории с помощью ПЦР и рестрикционного анализа, при этом отпадает необходимость в трудоемких полевых исследованиях. Использование молекулярного маркирования гена *Ppd-H1* также позволяет контролировать перенос желательного доминантного аллеля *Ppd-H1* в скрещиваниях при выведении новых скороспелых сортов.

Исключительный интерес для селекции представляет также и плейотропный эффект «генов развития» *Ppd* и *Vrn*. Регулируя сроки колошения, локусы *Ppd* одновременно оказывают влияние и на изменчивость многих хозяйственно ценных признаков. Например, показано, что ранний переход к фазе колошения у сортов ячменя коррелирует с низким содержанием белка в зерне – самым важным признаком для селекции пивоваренных сортов (See *et al.*, 2002). Таким образом, прогнозирование продолжительности вегетационного периода сортов ячменя на самых ранних этапах

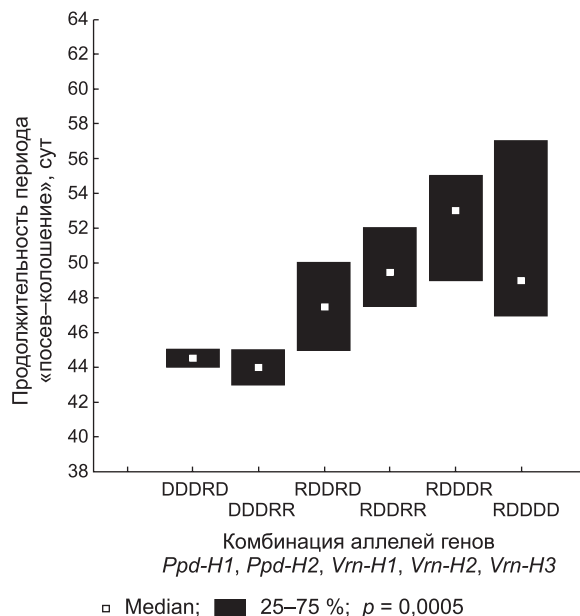


Рис. 6. Изменчивость сроков начала колошения сортов ячменя в зависимости от комбинации аллелей генов *Ppd-H1*, *Ppd-H2*, *Vrn-H1*, *Vrn-H2* и *Vrn-H3* в условиях длинного фотопериода.

развития растений с использованием системы аллель-специфичных маркеров *Ppd* и *Vrn* может также позволить косвенно оценивать и другие важные для селекции признаки.

Работа выполнена при поддержке грантов межгосударственной целевой программы ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии» (2011-16-МЦП/16) и гранта РФФИ № 12-04-01161-а.

Таблица 3

Попарное сравнение сроков начала колошения у генотипов ячменя с разной комбинацией аллелей генов *Ppd* и *Vrn* в условиях длинного светового дня (непараметрический U-критерий Манна-Уитни)

	DD-DRD	DD-DRR	RD-DRD	RD-DRR	RD-DDR	RD-DDD
DD-DRD		0,857143	0,057143	0,007260*	0,200000	0,200000
DD-DRR			0,007058*	0,000137*	0,035714*	0,035714*
RD-DRD				0,020768*	0,040260*	0,355844
RD-DRR					0,140392	0,807407
RD-DDR						0,700000
RD-DDD						

* Достоверно значимые различия при $p < 0,05$.

ЛИТЕРАТУРА

- Батакова О.Б. Исходный материал для селекции ярового ячменя в условиях европейского Севера РФ: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. СПб., 2011.
- Глуховцев В.В. Роль сорта в проблеме повышения урожайности и качества зерна в условиях Среднего Поволжья // Резервы повышения эффективности агропромышленного производства: Матер. регион. науч.-практ. конф. Уфа, 2004. С. 122–124.
- Гуляев Г.В. Скороспелые сорта зерновых культур – важнейший резерв в борьбе с засухой // Селекция и семеноводство. 1999. № 2/3. С. 10–17.
- Лукьяненко П.П. Избранные труды. М.: Агропромиздат, 1990. С. 125–126.
- Сортовые ресурсы зернофуражных культур Нечерноземной зоны России (каталог) / Под ред. Г.А. Багаловой, Н.Н. Зезина. Екатеринбург: ГНУ Уральский НИИСХ, 2010.
- Casao M.C., Karsai I., Igartua E. *et al.* Adaptation of barley to mild winters: A role for PPDH2 // BMC Plant Biology. 2011. V. 11. P. 164–177.
- 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. V. 58. P. 1231–1244.
- Cockram J., Norris C., O'Sullivan D.M. PCR-based markers diagnostic for spring and winter seasonal growth habit in barley // Crop. Sci. 2009. V. 49. P. 403–410.
- Corbesier L., Vincent C., Jang S. *et al.* FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis* // Science. 2007. V. 316. P. 1030–1033.
- Distelfeld A., Li C., Dubcovsky J. Regulation of flowering in temperate cereals // Curr. Opin. Plant Biol. 2009. V. 12. P. 178–184.
- Dubcovsky J., Chen C., Yan L. Molecular characterization of the allelic variation at the VRN-H2 vernalization locus in barley // Mol. Breed. 2005. V. 15. P. 395–407.
- Faure S., Higgins J., Turner A. *et al.* The FLOWERING LOCUS T-like gene family in barley (*Hordeum vulgare*) // Genetics. 2007. V. 176. P. 599–609.
- Jaeger K.E., Wigge P.A. FT protein acts as a long-range signal in *Arabidopsis* // Curr. Biol. 2007. V. 17. P. 1050–1054.
- Jones H., Leigh F.J., Mackay I. *et al.* Population based resequencing reveals that the flowering time adaptation of cultivated barley originated east of the fertile crescent // Mol. Biol. Evol. 2008. V. 25. No. 10. P. 2211–2219.
- Karsai I., Szucs P., Meszaros K. *et al.* The Vrn-H2 locus is a major determinant of flowering time in a facultative winter growth habit barley (*Hordeum vulgare* L.) mapping population // Theor. Appl. Genet. 2005. V. 110. P. 1458–1466.
- Kikuchi R., Kawahigashi H., Ando T. *et al.* Molecular and functional characterization of PEBP genes in barley reveal the diversification of their roles in flowering // Plant Physiol. 2009. V. 149. P. 1341–1353.
- Laurie D.A., Pratchett N., Bezant J.H. *et al.* RFLP mapping of five major genes and eight quantitative trait loci in a winter/spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cross // Genome. 1995. V. 38. P. 575–585.
- Saghai-Marooif M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A. *et al.* Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 8014–8018.
- See D., Kanazin V., Kephart K. *et al.* Mapping genes controlling variation in barley grain protein concentration // Crop Sci. 2002. V. 42. P. 680–685.
- Takahashi R., Yasuda S. Genetics of earliness and growth habit in barley // Barley genetics II / Ed. R.A. Nilan. Washington State Univ. Press, Pullman, 1971. P. 388–408.
- Trevaskis B., Bagnall D.J., Ellis M.H. *et al.* MADS box genes control vernalization-induced flowering in cereals // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 13099–13104.
- Turner A., Beales J., Faure S. *et al.* The pseudo response regulator Ppd-H1 provides adaptation to photoperiod in barley // Science. 2005. V. 310. P. 1031–1033.
- Yan L., Fu D., Li C. *et al.* The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of FT // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 19581–19586.
- Yan L., Loukoianov A., Tranquilli G. *et al.* Positional cloning of the wheat vernalization gene VRN1 // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 6263–6268.
- Zitzewitz J., Szucs P., Dubcovsky J. *et al.* Molecular and structural characterization of barley vernalization genes // Plant Mol. Biol. 2005. V. 59. P. 449–467.

**USE OF ALLELE-SPECIFIC MARKERS
OF THE *PPD* AND *VRN* GENES
FOR PREDICTING GROWING SEASON DURATION
IN BARLEY CULTIVARS**

M.M. Zlotina, O.N. Kovaleva, I.G. Loskutov, E.K. Potokina

Vavilov Institute of Plant Industry (VIR), St. Petersburg, Russia,
e-mail: e.potokina@vir.nw.ru

Summary

Allelic combinations of the *Vrn-H1*, *Vrn-H2*, *Vrn-H3*, *Ppd-H1*, and *Ppd-H2* genes have been investigated with allele-specific molecular markers in 91 spring barley cultivars recommended for use in Russia and Belarus. In a field experiment under conditions of North-West Russia, heading date evaluation has been performed in these cultivars.

Barley varieties having the dominant *Ppd-H1* allele were shown to overrun other genotypes in the developmental rate (heading date) and to mature earlier under long-day conditions. Among studied cultivars, grown in Russia, only 9 % possessed the dominant *Ppd-H1* allele. A significant association was also found between the allele combination of *Vrn* genes and heading date of barley cultivars. Among cultivars with identical genotypes for *Ppd-H1* and *Ppd-H2*, those having the allelic combination *Vrn-H1vrn-H2Vrn-H3* flower significantly earlier than with other haplotypes. The use of allele-specific markers of *Ppd* and *Vrn* genes makes breeding for early ripeness easier and faster.

Key words: molecular markers, alleles of the *Ppd* and *Vrn* genes, heading date, marker assisted selection, barley.