

УДК 575.162

КОМБИНАЦИЯ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНОВ *Ppd* И *Vrn* ОПРЕДЕЛЯЕТ СРОКИ КОЛОШЕНИЯ У СОРТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

© 2012 г. **Е.К. Потоккина¹, В.А. Кошкин¹, Е.А. Алексеева¹, И.И. Матвиенко¹, В.А. Филобок², Л.А. Беспалова²**

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: e.potokina@yahoo.com;

² Краснодарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко, Краснодар, Россия

Поступила в редакцию 14 ноября 2011 г. Принята к публикации 16 декабря 2011 г.

Комбинация аллелей генов *Ppd-D1*, *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1* анализировалась с использованием аллель-специфичных праймеров у 56 сортов и линий мягкой пшеницы селекции КНИИСХ им. П.П. Лукьяненко. Установлено достоверное влияние комбинации этих аллелей на сроки начала колошения изученных сортов, которое по-разному проявляется в условиях длинного и короткого фотопериода, а также зависит от наличия или отсутствия яровизации. Молекулярное маркирование аллелей генов *Vrn* и *Ppd* пшеницы дает возможность селекционерам сознательно манипулировать исходным материалом, заранее располагая информацией об адапционном потенциале растений, вовлеченных в селекционный процесс, а также выбрать сочетания аллелей, оптимальные для конкретных условий возделывания.

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

Введение

Конкурентоспособность отечественных сортов зерновых культур во многом определяется оптимальной комбинацией аллелей ключевых генов, детерминирующих основные хозяйственно ценные признаки. Такими ключевыми генами, в частности, являются локусы *Vrn* (vernalization response) и *Ppd* (photoperiod response), определяющие реакцию растения на яровизацию и длину дня. Комбинация аллелей *Vrn* и *Ppd* достоверно влияет на скорость развития растений, структуру урожая, морозо- и зимостойкость, потребность в яровизации, засухоустойчивость, «уход» от высоких летних температур, устойчивость к болезням (Стельмах и др., 1987; Мережко и др., 1997). Гены *Vrn* и *Ppd* клонированы в последние годы для пшеницы и ячменя, описано несколько их аллельных вариантов (Yan *et al.*, 2003, 2004, 2006; Fu *et al.*, 2005; Turner *et al.*, 2005; Beales *et al.*, 2007; Milec *et al.*, 2011; Shcherban *et al.*, 2011).

Ген *Ppd-D1*, локализованный в хромосоме 2D, рассматривается в качестве ключевого локуса, определяющего фотопериодическую чувствительность гексаплоидных пшениц (Beales *et al.*, 2007). Ген относится к семейству генов PRR (Pseudo Response Regulator), известных регуляторов суточных ритмов у *Arabidopsis* (Turner *et al.*, 2005). Доминантный аллель этого гена, обеспечивающий нейтральную реакцию на фотопериод, отличается от рецессивного аллеля делецией размером 2089 п.н., выявляемой с помощью полимеразной цепной реакции с аллель-специфичными праймерами (Beales *et al.*, 2007).

Реакция на яровизацию у пшеницы контролируется по меньшей мере пятью генами *Vrn* (Goncharov, 2003; Yan *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2010), из которых три основных, *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1*, локализованы соответственно в хромосомах 5A, 5B и 5D. Озимый тип развития растения проявляется в том случае если три основных гена представлены рецессивными аллелями. При этом присутствие только одного

доминантного аллеля гена *Vrn-A1* обеспечивает полную нечувствительность растения к яровизации, доминантные аллели генов *Vrn-B1* и *Vrn-D1* лишь частично снижают потребность в ней (Pugsley, 1971, 1972). Клонирование генов *Vrn* у мягкой пшеницы позволило разработать геноспецифичные маркеры, эффективные для диагностики реакции растений на яровизацию в лабораторных условиях (Yan *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2005).

Эффективность маркирования аллелей генов *Vrn* и *Ppd* для ранней диагностики реакции растений на яровизацию и фотопериод показана в многочисленных зарубежных публикациях (Yang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Cockram *et al.*, 2009), однако в практической селекции пшеницы и ячменя Российской Федерации эти маркеры пока не используются. Отечественные селекционеры, создавая сорта для разнообразных климатических зон РФ, имеют дело с мозаикой яровых и озимых форм, а также двуручек, отличающихся между собой по чувствительности к яровизирующим температурам и реакции на короткий день. Селекционерам необходима информация о генетической изменчивости, детерминирующей это разнообразие, а также реальный инструмент, позволяющий диагностировать адаптивный потенциал растения на ранней стадии развития. В задачи нашего исследования входило охарактеризовать с помощью аллель-специфичных маркеров, разработанных на сегодняшний день для *Vrn* и *Ppd*, аллельное разнообразие этих генов у сортов и линий мягкой пшеницы Краснодарского края, – ведущего по возделыванию пшеницы региона РФ, с тем чтобы установить, какие сочетания аллелей могут рассматриваться как наиболее оптимальные для конкретных условий возделывания.

Материалы и методы

Молекулярное тестирование аллелей генов *Vrn* и *Ppd* сортов мягкой пшеницы производилось на материале 54 сортов и линий Краснодарского научно-исследовательского института сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко (КНИИСХ) с известными параметрами вегетационного периода, полученными в результате наблюдений 2009–2010 гг. в ВИР.

Кроме селекционного материала КНИИСХ, в анализ были взяты также сорта Ленинградка и Фотон, несущий доминантные аллели генов *Ppd-D1*, *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1* (Кошкин и др., 1998). Сорт Фотон был использован в качестве стандарта, по отношению к которому оценивалась продолжительность периода всходы–колошение сортов и линий, проанализированных в 2009 и 2010 гг. Для определения влияния яровизации на скорость развития растений семена образцов яровизировали при температуре 2 °С в течение 60 сут. Чувствительность сорта пшеницы к длине дня определялась задержкой по срокам колошения на естественном длинном (17 ч 30 мин – 18 ч 50 мин) и коротком (12 ч) фотопериодах. Коэффициент фотопериодической чувствительности растения определялся соотношением двух этих величин (Кошкин и др., 1998).

Для молекулярно-генетического анализа геномную ДНК выделяли из 3-дневных проростков СТАВ-методом по А. Graner с соавт. (1991). Для выявления доминантных и рецессивных аллелей генов *Ppd-D1*, *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1* использовались опубликованные аллель-специфичные праймеры (табл. 1). Протоколы приготовления реакционной смеси и условия ПЦР, использованные для выявления аллелей генов *Ppd* и *Vrn*, подробно описаны в оригинальных публикациях, ссылки на них также приведены в табл. 1.

Рестрикционный анализ проводили в общем объеме пробы 15 мкл, содержащем 5 мкл продукта ПЦР, 1,5 мкл 10 × буфера SE, 1 ед. активности эндонуклеазы *MboI*.

Результаты и обсуждение

Аллель-специфичные праймеры для гена *Ppd-D1* ранее были эффективно использованы для прогнозирования фотопериодической чувствительности почти изогенных линий яровой мягкой пшеницы (Кошкин и др., 2009), а также сортов и линий селекции КНИИСХ (Беспалова и др., 2010). В проведенных экспериментах была установлена достоверная корреляция между присутствием доминантного аллеля гена *Ppd-D1* и слабой чувствительностью генотипов к фотопериоду. Однако сроки колошения гексаплоидных пшениц на коротком и длинном дне

Таблица 1

Аллель-специфичные праймеры, опубликованные для генов *Ppd-D1* и *Vrn* мягкой пшеницы, использованные в анализе

Тестируемый аллель гена	Аллель-специфичные праймеры, использованные в ПЦР	Температура отжига, t°	Время элонгации, с	Ожидаемый размер ДНК-фрагмента, п.н.	Литературный источник
<i>Ppd-D1a</i>	Ppd1_F ACGCCTCCCACTACACTG Ppd1_R1 GTTGGTTCAAACAGAGAGC Ppd1_R2 CACTGGTGGTAGCTGAGATT	54	60	288	Beales <i>et al.</i> , 2007
<i>Ppd-D1b</i>	Ppd1_F ACGCCTCCCACTACACTG Ppd1_R1 GTTGGTTCAAACAGAGAGC Ppd1_R2 CACTGGTGGTAGCTGAGATT	54	60	414	Beales <i>et al.</i> , 2007
<i>Vrn-A1a</i> <i>Vrn-A1b</i>	VRN1AF GAAAGGAAAAATTCTGCTCG VRN1-INT1R GCAGGAAATCGAAATCGAAG	50	60	965 + 876 714	Yan <i>et al.</i> , 2004 Zhang <i>et al.</i> , 2008
<i>vrn-A1</i>	VRN1AF GAAAGGAAAAATTCTGCTCG VRN1-INT1R GCAGGAAATCGAAATCGAAG	50	60	734	Yan <i>et al.</i> , 2004 Zhang <i>et al.</i> , 2008
<i>Vrn-B1</i>	Intr1/B/F CAAGTGGAACGGTTAGGACA Intr1/B/R3 CTCATGCCAAAAATTGAAGATGA	63	43	709	Fu <i>et al.</i> , 2005
<i>vrn-B1</i>	Intr1/B/F CAAGTGGAACGGTTAGGACA Intr1/B/R4 CAAATGAAAAGGAATGAGAGCA	58	69	1149	Fu <i>et al.</i> , 2005
<i>Vrn-D1</i>	Intr1/D/F GTTGTCTGCCTCATCAAATCC Intr1/D/R3 GGTCACTGGTGGTCTGTGC	65	90	1671	Fu <i>et al.</i> , 2005
<i>vrn-D1</i>	Intr1/D/F GTTGTCTGCCTCATCAAATCC Intr1/D/R4 AAATGAAAAGGAACGAGAGCG	63	60	997	Fu <i>et al.</i> , 2005

зависят не только от унаследованных аллелей генов *Ppd*, но и от аллелей генов *Vrn*, определяющих потребность в яровизации. Известно, что от чувствительности растения к длине дня зависят процессы удлинения стебля и сроки развития соцветия, однако сам момент перехода

от вегетативной к генеративной фазе определяется тем, насколько удовлетворена потребность растения в яровизации (Purvis *et al.*, 1937; Gott *et al.*, 1955). В настоящей работе мы останавливаемся подробнее на маркировании аллелей генов *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1*.

Молекулярное тестирование аллелей генов *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1*

В геноме гексаплоидных пшениц *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1* являются ортологами гена *Vrn-1*, кодирующего транскрипционный фактор (MADS box) у диплоидного вида *Triticum monocoocum* L. (Yan *et al.*, 2003). Известно, что воздействие низких температур активирует экспрессию *Vrn-1*, высокий уровень транскриптов которого в верхушечной меристеме необходим для того, чтобы началось развитие соцветия и растение перешло к генеративной фазе (Yan *et al.*, 2003; Sasani *et al.*, 2009). В отсутствие яровизации у озимых пшениц экспрессия гена *Vrn-1* блокирована. Предполагается, что успешной транскрипции гена может препятствовать репрессорный белок, распознающий специфичную для себя «посадочную» нуклеотидную последовательность (binding site) в промоторном участке гена (Trevaskis, 2010). Альтернативная гипотеза заключается в том, что у неяровизированных растений ген инактивируется, благодаря специфической гистонной модификации, неактивному состоянию хроматина в локусе *Vrn-1* (Oliver *et al.*, 2009). Низкие температуры, вероятно, устраняют воздействие гипотетических репрессоров, активируя транскрипцию гена.

Яровые пшеницы отличаются от озимых существенными изменениями нуклеотидной последовательности промотора или первого интрона гена *Vrn-A1*, исключающими воздействие репрессоров. Чтобы выявить эти изменения L. Yan с соавт. (2004) разработали аллель-специфичные праймеры, которые позволяют амплифицировать последовательность, включающую 5'-нетранскрибируемый участок гена, первый

экзон и участок первого интрона. С использованием этих праймеров ожидаемый размер амплифицированного фрагмента ПЦР для «не нарушенного» делециями или вставками рецессивного аллеля *vrn-A1* составляет 734 п.н. (рис. 1, а). Наиболее распространенный доминантный аллель *Vrn-A1a* отличается вставками повторяющихся последовательностей в участке промотора, в результате чего продукт ПЦР представлен двумя фрагментами 965 и 876 п.н. (рис. 1, б). Доминантный аллель *Vrn-A1b* отличается от рецессивного аллеля *vrn-A1* делецией размером 20 п.н. в промоторном участке гена, соответственно, ожидаемый размер ПЦР-фрагмента – 714 п.н. Среди проанализированных генотипов аллель *Vrn-A1b* обнаружить не удалось. Использование агарозного геля не всегда позволяет с уверенностью распознавать фрагменты в 714 (*Vrn-A1b*) и 734 (*vrn-A1*) п.н., различающиеся делецией в 20 п.н. В таких случаях обработка ПЦР продукта эндонуклеазой *MboII*, имеющей сайт рестрикции в районе делеции, достоверно подтверждает присутствие рецессивного аллеля *vrn-A1*. Ожидаемые размеры фрагментов после обработки эндонуклеазой рестрикции составили для *Vrn-A1b* 576 и 138 п.н.; для *vrn-A1* – 315, 281 и 138 п.н. (рис. 1, в).

Известные на сегодняшний день доминантные аллели *Vrn-B1* и *Vrn-D1* отличаются от соответствующих рецессивных аллелей этих генов обширными делециями в первом интроне и эффективно выявляются с использованием аллель-специфичных праймеров, опубликованных D. Fu с соавт. (2005) (рис. 2). А. Щербань с соавт. недавно выявили и описали новый доминантный аллель *Vrn-B1c*, также отличающийся

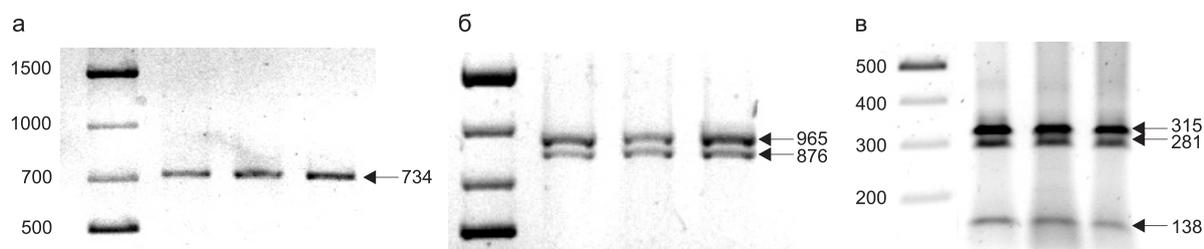


Рис. 1. Выявление аллелей гена *Vrn-A1* с помощью специфичных праймеров.

а – рецессивный (734 п.н.) аллель *vrn-A1* у линий Л.1120я1633-7, Л.1120я16к27 и Л.1120я16к7; б – доминантный аллель *Vrn-A1a* (965 и 867 п.н.) у сортов Фотон, Ленинградка, Курьер; в – рестрикция фрагмента 734 п.н. (*vrn-A1*) эндонуклеазой *MboII*.

существенными изменениями в последовательности первого интрона и широко встречающийся среди российских сортов мягкой пшеницы, в частности у сорта Саратовская 29 (Shcherban *et al.*, 2011). Предположить наличие *Vrn-B1c* у анализируемых сортов можно при отсутствии амплификации с аллель-специфичными праймерами, описанными D. Fu с соавт. (2005) для доминантного *Vrn-B1a* (табл. 1). У проанализированного материала наличие рецессивного аллеля *vrn-B1* подтверждалось контрольной ПЦР во всех случаях, когда с праймерами Intr1/B/F и Intr1/B/R3, специфичными для аллеля *Vrn-B1a*, не удавалось получить ПЦР-продукта (рис. 2).

Влияние комбинации аллелей генов *Ppd-D1*, *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1* на сроки колошения сортов мягкой пшеницы

Ранее сообщалось, что гены *Vrn* по-разному влияют на сроки колошения, высоту растений и структуру урожая у пшеницы. Высказывались предположения о том, что генотипы, несущие доминантные аллели в двух генах *Vrn*, характеризуются более ранним созреванием и более высоким потенциалом урожайности (Stelmakh, 1998). Три доминантных аллеля в локусах *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1* ассоциированы с повышенной скороспелостью, сопровождающейся, однако, снижением урожайности. Чтобы выяснить, каким образом комбинация аллелей этих генов может влиять на сроки начала колошения сортов

мягких пшениц в условиях короткого и длинного дня, мы идентифицировали аллели генов *Ppd-D1*, *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1* у 56 генотипов мягкой пшеницы, взятых в анализ.

Для этого даты начала колошения 23 генотипов, проанализированных в 2009 г. и 32 генотипов, изученных в 2010 г., были соотнесены со стандартом – сортом Фотон. Нормализованная таким образом выборка из 56 генотипов пшеницы была распределена на 8 групп по 2–16 генотипов в каждой, несущих сходную аллельную комбинацию. В табл. 2 суммированы результаты выявления аллельных комбинаций генов *Vrn* и *Ppd* у проанализированных сортов и линий, а также предоставлена информация о сроках начала колошения генотипов пшеницы в условиях естественного (T_1) и короткого (T_2) дня.

Степень и достоверность влияния комбинации аллелей генов *Ppd-D1*, *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1* на скорость развития растений оценивались с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (Factorial ANOVA, программное обеспечение Statistica 5.0.). Анализ показал, что сроки колошения у проанализированных сортов и линий мягкой пшеницы достоверно зависят от определенной комбинации аллелей генов *Ppd* и *Vrn* ($p < 0,00001$), а также от длины фотопериода ($p < 0,00001$). Достоверным является также и взаимодействие этих двух факторов ($p < 0,00001$), т. е. каждая комбинация аллелей по-разному влияет на скорость выколашивания растений, в зависимости от условий выращивания (рис. 3).

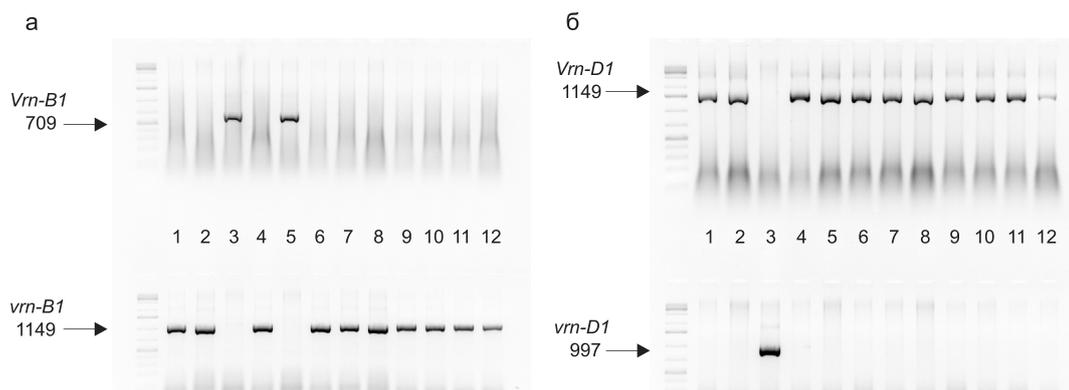


Рис. 2. Выявление доминантного (709 п.н.) и рецессивного (1149 п.н.) аллелей гена *Vrn-B1* (а), а также доминантного (1671 п.н.) и рецессивного (997 п.н.) аллелей гена *Vrn-D1* (б) у линий селекции КНИИСХ по результатам амплификации с аллель-специфичными праймерами.

Линии 1–12: Л.479-02яоС3, Л.481-02я8, Л.481-02я13, Л.481-02яоС22, Л.481-02яоС24, Л.481-02яоС28, Л.481-02яоС43, Л.483-02я6, Л.484-02я9, Л.484-02я15, Л.484-02я36, Л.489-02я6.

Таблица 2

Выявленные аллельные комбинации генов *Ppd-D1*, *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1* у проанализированных сортов и линий мягкой пшеницы

Сорта, линии	Год	Яровизация		Контроль (без яровизации)		<i>Ppd-D1</i>	<i>Vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>	Обозначение в анализе
		T ₁	T ₂	T ₁	T ₂					
Фотон	2009	“	“	34,6 ± 0,16	38,2 ± 0,13	D	D	D	D	D-DDD
Фотон	2010	“	“	36,0 ± 0,00	37,5 ± 0,17	D	D	D	D	D-DDD
Л.1120я1633-7	2009	44,1 ± 0,79	46,8 ± 0,16	54,8 ± 0,76	74,1 ± 1,04	D	R	D	D	D-RDD
Л.1120я16к27	2009	41,9 ± 0,48	47,9 ± 0,62	65,1 ± 0,59	74,2 ± 1,04	D	R	D/R	D	D-RDD
Л.1120я16к7	2009	43,5 ± 0,56	46,7 ± 0,42	66,2 ± 0,65	76,7 ± 0,65	D	R	D/R	D	D-RDD
Л.1695я2	2009	40,2 ± 0,49	42,9 ± 0,38	65,1 ± 1,66	75,7 ± 1,01	D	R	D/R	D	D-RDD
Л.1761я13	2009	42,8 ± 0,74	47,0 ± 0,62	68,3 ± 0,40	75,1 ± 0,59	D	R	D/R	D	D-RDD
Л.1707я5	2009	38,3 ± 0,15	42,8 ± 0,38	43,8 ± 0,52	51,6 ± 1,09	D	R	D/R	R	D-RDR
Л.1710я2	2009	44,7 ± 0,62	49,3 ± 0,30	53,6 ± 0,34	61,6 ± 1,00	D	R	D	R	D-RDR
Паллада озим.	2009	42,7 ± 0,15	49,9 ± 0,73	59,6 ± 0,54	69,0 ± 0,42	D	R	D	R	D-RDR
Паллада яр.	2009	42,0 ± 0,26	47,0 ± 0,29	61,3 ± 0,45	70,9 ± 0,23	D	R	D	R	D-RDR
Афина озим.	2009	42,5 ± 0,27	45,5 ± 0,17	59,2 ± 0,81	71,3 ± 1,14	D	R	R	D	D-RRD
Афина яр.	2009	42,6 ± 0,42	47,1 ± 0,35	61,2 ± 1,14	71,1 ± 0,71	D	R	R	D	D-RRD
Л.1707я2	2009	53,9 ± 2,35	57,9 ± 4,35	69,0 ± 1,00	76,7 ± 1,76	D	R	R	D/R	D-RRD
Л.241-02я1	2010	37,0 ± 0,00	40,1 ± 0,31	49,0 ± 0,83	60,3 ± 0,70	D	R	R	D/R	D-RRD
Л.262-02я6	2010	37,7 ± 0,29	42,6 ± 0,54	49,9 ± 0,53	62,2 ± 0,83	D	R	R	D	D-RRD
Л.322-02я10	2010	43,8 ± 0,95	47,5 ± 2,29	54,8 ± 2,22	62,4 ± 0,98	D	R	R	D	D-RRD
Л.323-02я3	2010	38,7 ± 0,24	41,2 ± 0,13	58,9 ± 0,72	79,1 ± 3,22	D	R	R	D	D-RRD
Л.330-02я3	2010	39,1 ± 0,51	42,7 ± 0,53	52,5 ± 1,05	65,1 ± 1,34	D	R	R	D	D-RRD
Л 483-02я6	2010	35,9 ± 0,20	49,4 ± 0,22	45,9 ± 0,71	76,6 ± 0,79	D/R	R	R	D	D-RRD
Л.484-02я15	2010	41,0 ± 0,52	43,2 ± 0,20	57,8 ± 1,10	68,2 ± 1,09	D	R	R	D	D-RRD
Л.484-02я9	2010	39,7 ± 0,33	44,3 ± 0,47	55,9 ± 0,85	68,7 ± 1,11	D	R	R	D	D-RRD
Л.512-02я18	2010	39,1 ± 0,18	42,2 ± 0,20	56,5 ± 2,13	67,2 ± 1,33	D/R	R	R	D	D-RRD
Л.538-02яоС5	2010	39,0 ± 0,00	41,5 ± 0,17	52,3 ± 1,51	63,6 ± 1,18	D	R	R	D	D-RRD
Л.538-02яоС51	2010	39,5 ± 0,64	42,3 ± 0,15	54,2 ± 2,01	61,5 ± 0,95	D	R	R	D	D-RRD
Л.94-03я12	2010	40,8 ± 0,13	44,5 ± 0,17	56,6 ± 1,07	65,9 ± 0,77	D	R	R	D	D-RRD
Луро	2009	39,7 ± 0,15	42,8 ± 0,13	–	–	D	R	R	R	D-RRR
Безостая 1	2009	43,6 ± 0,73	47,5 ± 0,54	–	–	D	R	R	R	D-RRR
Л.1120я16к12	2009	38,3 ± 0,33	40,0 ± 0,15	–	–	D	R	R	R	D-RRR
Нота	2009	41,3 ± 0,25	46,3 ± 1,34	–	–	D	R	R	R	D-RRR
Л.339-02яС23	2010	43,3 ± 0,15	50,8 ± 0,76	–	–	D	R	R	R	D-RRR
Л.339-02яС24	2010	49,0 ± 0,76	59,7 ± 0,76	–	–	D	R	R	R	D-RRR
Курьер	2009	43,7 ± 0,37	66,2 ± 1,48	43,0 ± 0,24	62,7 ± 0,54	R	D	D	R	R-DDR
Ленинградка	2009	43,6 ± 0,60	76,6 ± 1,51	43,6 ± 0,19	77,8 ± 1,20	R	D	D	R	R-DDR
Л.99-01яв5	2009	43,0 ± 0,00	55,0 ± 1,15	58,6 ± 0,50	108,2 ± 0,70	R	R	D/R	D	R-RDD
Ласточка озим.	2009	39,5 ± 0,27	54,6 ± 0,34	61,1 ± 1,58	94,0 ± 3,29	R	R	D	D	R-RDD
Ласточка яр.	2009	39,9 ± 0,47	55,4 ± 0,34	56,9 ± 1,38	93,3 ± 4,22	R	R	D	D	R-RDD
Эр1685я13	2009	43,1 ± 0,95	58,1 ± 0,48	61,9 ± 1,13	90,9 ± 1,13	R	R	D/R	D	R-RDD
Л.481-02яоС24	2010	36,2 ± 0,20	54,9 ± 0,69	43,9 ± 0,26	76,4 ± 1,72	R	R	D	D	R-RDD

Окончание таблицы 2

Сорта, линии	Год	Яровизация		Контроль (без яровизации)		<i>Ppd-D1</i>	<i>Vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>	Обозначение в анализе
		T ₁	T ₂	T ₁	T ₂					
Л.1762я15	2009	40,9 ± 0,23	60,5 ± 0,87	49,2 ± 0,35	83,9 ± 0,82	R	R	D	R	R-RDR
Л.481-02я13	2010	38,1 ± 0,14	58,9 ± 1,29	45,4 ± 0,27	85,5 ± 1,23	R	R	D	R	R-RDR
Л.115-03я35	2010	38,1 ± 0,31	56,3 ± 0,70	50,2 ± 1,11	95,8 ± 2,95	R	R	R	D	R-RRD
Л.327-02я9	2010	38,1 ± 0,28	56,1 ± 2,42	46,1 ± 0,69	92,1 ± 1,83	R	R	R	D	R-RRD
Л.339-02яС30	2010	38,1 ± 0,10	59,5 ± 1,01	48,1 ± 0,86	95,0 ± 2,45	R	R	R	D	R-RRD
Л.455-02я11	2010	37,1 ± 0,18	56,3 ± 0,99	49,4 ± 0,72	93,9 ± 2,10	R	R	R	D	R-RRD
Л.455-02я5	2010	36,2 ± 0,53	56,2 ± 0,17	46,7 ± 0,79	97,0 ± 1,84	R	R	R	D	R-RRD
Л.479-02яоС3	2010	35,2 ± 0,44	54,9 ± 0,59	46,7 ± 0,83	94,8 ± 1,88	R	R	R	D	R-RRD
Л.481-02я8	2010	36,4 ± 0,22	53,1 ± 0,53	50,1 ± 0,72	93,3 ± 8,67	R	R	R	D	R-RRD
Л.484-02я36	2010	37,6 ± 0,34	65,6 ± 0,73	47,2 ± 0,57	99,8 ± 0,45	R	R	R	D	R-RRD
Л.507-02яоС15	2010	41,7 ± 0,45	59,5 ± 0,81	57,4 ± 0,81	96,8 ± 1,97	R	R	R	D	R-RRD
Л.512-02я39	2010	38,2 ± 0,20	57,7 ± 0,70	49,2 ± 0,55	99,5 ± 1,50	R	R	R	D	R-RRD
Л.70-03яБ8	2010	37,6 ± 0,52	58,7 ± 0,80	46,0 ± 0,60	85,4 ± 6,03	R	R	R	D	R-RRD
Л.481-02яоС22	2010	38,0 ± 0,10	79,3 ± 3,93	48,1 ± 0,75	–	R	R	R	D	R-RRD
Л.481-02яоС28	2010	36,9 ± 0,20	54,0 ± 0,82	49,4 ± 0,43	–	R	R	R	D	R-RRD
Л.481-02яоС43	2010	37,9 ± 0,51	63,7 ± 0,92	56,8 ± 1,05	–	R	R	R	D	R-RRD
Л.99-01яв.5	2010	37,7 ± 0,15	70,6 ± 0,64	49,3 ± 1,00	–	R	R	R	D	R-RRD
Л.489-02я6	2010	41,4 ± 0,31	68,7 ± 0,56	55,3 ± 0,82	–	R	R	R	D	R-RRD

Примечание. Год – год наблюдений срока выколашивания в вегетационном опыте на фотопериодической площадке Пушкинского филиала ВИР. T₁, T₂ – продолжительность периода всходы–колошение в условиях естественного (17 ч 30 мин – 18 ч 50 мин) и короткого (12 ч) фотопериода соответственно. D – доминантный аллель, R – рецессивный аллель, D/R – выявлена гетерозиготность по соответствующему локусу. «←» – растения не выколосились. «←» – яровизация не проводилась.

После того как с помощью дисперсионного анализа была установлена общая достоверность влияния аллельной комбинации генов *Ppd* и *Vrn* на скорость развития растений в условиях длинного и короткого светового дня, был использован тест значимых различий (Post Hoc Test) с целью выяснить, для каких именно комбинаций аллелей генов *Ppd* и *Vrn* различие между средними значениями сроков выколашивания было значимым. На рис. 3, в, г приведены значения критерия Тьюки (Tukey HSD test), достоверные для попарных сравнений средних значений сроков выколашивания разных генотипов при 5-, 1- и 0,1 %-м уровне значимости.

Общая картина скорости развития генотипов с разными аллельными комбинациями *Ppd* и *Vrn* под воздействием яровизации и без нее (рис. 3, а, б) относительно сходна. Все изученные генотипы несут рецессивный аллель хотя бы одного гена

Vrn, поэтому почти у всех генотипов в отсутствие яровизации сроки начала колошения увеличиваются. Отсутствие колошения без яровизации отмечено для генотипов D-RRR (рецессивные аллели всех генов *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1*), что является ожидаемым фактом. Наиболее чувствительными к яровизации оказались генотипы с комбинацией R-RRD: в отсутствие яровизации на коротком дне колошение начинается на 85–99-й день или не начинается вообще (табл. 2). Абсолютным «чемпионом» по скорости выколашивания остается сорт Фотон, сочетающий доминантные аллели во всех четырех проанализированных генах (D-DDD), на рис. 3 сроки его колошения принимаются за единицу.

Ожидаемыми являются также достоверные различия по скорости выколашивания у носителей рецессивного и доминантного аллелей гена *Ppd-D1* на коротком дне (рис. 3). Однако эти раз-

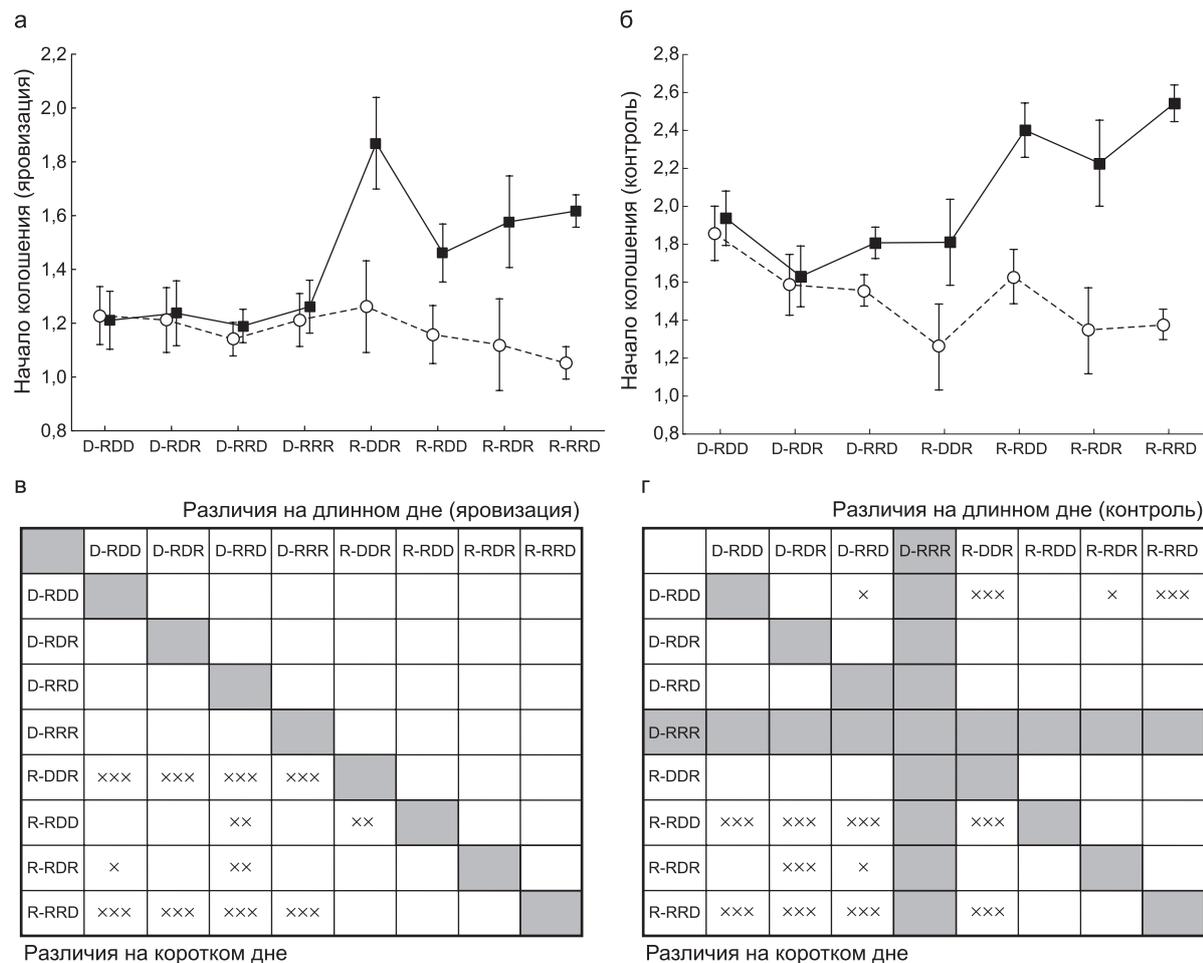


Рис. 3. Изменчивость сроков колошения генотипов пшеницы (среднее значение и ошибка средней) в зависимости от комбинации аллелей генов *Ppd-D1*, *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1* на коротком (■) и длинном (○) дне, после яровизации (а) и без нее (б). Сроки начала колошения по оси Y определены по отношению к сорту Фотон, использованному в качестве стандарта. в, г – достоверные различия, выявленные при попарных сравнениях средних значений сроков выколашивания разных генотипов при 5 %-м (×), 1 %-м (××) и 0,1 %-м (×××) уровнях значимости.

личия проявляются в зависимости от конкретных условий: например, в условиях яровизации на коротком дне носители **R-DDR** остаются самой «медлительной» группой по срокам колошения, но при отсутствии яровизации генотипы **R-DDR** опережают по скорости развития остальные сорта, практически не уступая генотипам с доминантным аллелем *Ppd-D1* (**D-RDR**, **D-RDD**, **D-RRR**). В условиях Краснодарского края при продолжительной теплой осени и зиме такие генотипы могут переходить в репродуктивную фазу развития, вымерзая от возвратных морозов. Поэтому сорта-двуручки должны быть слабочувствительными к яровизации, но достаточно

сильно реагировать на короткий день, ограничивая развитие (Беспалова и др., 2010). С этой точки зрения генотипы **R-RRD**, **R-RDR** и **R-RDD** относятся к группе пшениц-двуручек, возделывание которых в условиях Краснодарского края может быть оптимальным.

Располагая сравнительной картиной темпов развития носителей различных аллелей генов *Ppd-Vrn* в разных условиях возделывания (короткий/длинный день, наличие/отсутствие яровизации), селекционеры могут обратить внимание на генотипы с наиболее подходящей для конкретного региона аллельной комбинацией. Разработанные лабораторные протоколы,

позволяющие идентифицировать аллельные комбинации генов *Vrn* и *Ppd* в любом селекционном материале, предоставляют селекционерам возможность сознательно манипулировать исходным материалом, заранее располагая информацией об адаптационном потенциале растений, вовлеченных в селекционный процесс.

Работа выполнена при поддержке грантов межгосударственной целевой программы Евр-АзЭС «Инновационные биотехнологии» (2011-16-МЦП/16) и гранта РФФИ № 09-04-00326-а.

Литература

- Беспалова Л.А., Кошкин В.А., Потоккина Е.К. и др. Фотопериодическая чувствительность и молекулярное маркирование генов *Ppd* и *Vrn* в связи с селекцией сортов пшеницы альтернативного образа жизни // Докл. РАСХН. 2010. № 6. С. 3–6.
- Кошкин В.А., Матвиенко Н.И., Егорова Е.М. и др. Использование аллель-специфичных маркеров гена *Ppd-D1* для анализа изогенных линий яровой мягкой пшеницы // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 2009. Т. 166. С. 151–156.
- Кошкин В.А., Мережко А.Ф., Матвиенко И.И. Влияние фотопериода и генов *Ppd* на морфофизиологические признаки гомозиготных линий пшеницы с различной фотопериодической чувствительностью // Докл. РАСХН. 1998. № 4. С. 8–10.
- Мережко А.Ф., Кошкин В.А., Матвиенко И.И. Исходный материал для создания серии почти изогенных линий мягкой пшеницы с различной фотопериодической чувствительностью // Генетика. 1997. Т. 33. № 4. С. 384–393.
- Стельмах А.Ф., Авсенин В.И., Кучеров В.А., Воронин А.И. Изучение роли генетических систем *Vrn* и *Ppd* у мягкой пшеницы // Вопросы генетики и селекции зерновых культур. КОЦ СЭВ. Одесса (СССР). НИИР Прага-Рузыне (ЧССР). 1987. Вып. 3. С. 125–132.
- 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. V. 115. No 5. P. 721–733.
- 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.
- 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. Genomics. 2005. V. 273. P. 54–65.
- Goncharov N.P. Genetics of growth habit (spring vs winter) in common wheat: confirmation of the existence of dominant gene *Vrn4* // Theor. Appl. Genet. 2003. V. 107. P. 768–772.
- Gott M.B., Gregory F.G., Purvis O.N. Studies in vernalization of cereals VIII. Photoperiodic control of stage inflorescence initiation and ear formation in vernalised and unvernalsed petkus winter rye // Ann. Bot. 1955. V. 21. P. 87–126.
- Graner A., Jahoor A., Schondelmaier J. *et al.* Construction of an RFLP map of barley // Theor. Appl. Genet. 1991. V. 83. P. 250–256.
- Milec Z., Tomková L., Sumíková T., Pánková K. A new multiplex PCR test for the determination of *Vrn-B1* alleles in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // Mol. Breeding. Publ. online: August 14, 2011.
- Oliver S.N., Finnegan E.J., Dennis E.S. *et al.* Vernalization-induced flowering in cereals is associated with changes in histone methylation at the VERNALIZATION1 gene // Proc. Natl Acad. Sci. 2009. V. 106. P. 8386–8391.
- Pugsley A.T. A genetic analysis of the spring-winter habit of growth in wheat // Aust. J. Agr. Res. 1971. V. 22. P. 21–23.
- Pugsley A.T. Additional genes inhibiting winter habit in wheat // Euphytica. 1972. V. 21. P. 547–552.
- Purvis O.N., Gregory F.G. Studies in vernalisation of cereals: I. A comparative study of vernalisation of winter rye by low temperature and by short days // Ann. Bot. 1937. V. 1. No 4. P. 569–591.
- 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. Exptl. Bot. 2009. V. 60. P. 2169–2178.
- Shcherban A.B., Efremova T.T., Salina E.A. Identification of a new *Vrn-B1* allele using two near-isogenic wheat lines with difference in heading time // Mol. Breeding. Publ. online: April 21, 2011.
- Stelmakh A.F. Genetic systems regulating flowering response in wheat // Euphytica. 1998. V. 100. P. 359–369.
- Trevaskis B. The central role of the VERNALIZATION1 gene in the vernalization response of cereals // Funct. Plant Biol. 2010. V. 37. P. 479–487.
- Turner A., Beales J., Faure S. *et al.* The pseudo response regulator *Ppd-H1* provides adaptation to photoperiod in barley // Sci. 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.
- Yan L.D., Helguera M., Kato K. *et al.* Allelic variation at the *VRN1* promoter region in polyploid wheat // Theor. Appl. Genet. 2004. V. 109. P. 1677–1686.
- Yang F.P., Zhang X.K., Xia X.C. *et al.* Distribution of the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* allele in Chinese wheat cultivars // Euphytica. 2008. V. 165. P. 445–483.
- 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. V. 120. P. 543–552.
- Zhang X.K., Xiao Y.G., 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. V. 48. P. 458–470.

COMBINATIONS OF ALLELES OF THE *Ppd* AND *Vrn* GENES DETERMINE THE HEADING TIME IN COMMON WHEAT VARIETIES

**E.K. Potokina¹, V.A. Koshkin¹, E.A. Alekseeva¹, I.I. Matvienko¹,
L.A. Bespalova², V.A. Filobok²**

¹ Vavilov Institute of Plant Industry (VIR), St. Peterburg, Russia,
e-mail: e.potokina@yahoo.com;

² Krasnodar Lukyanenko Research Institute of Agriculture, Krasnodar, Russia

Summary

Allele combinations of the *Ppd-D1*, *Vrn-A1*, *Vrn-B1* and *Vrn-D1* genes have been investigated with allele-specific primers in 56 wheat cultivars and breeding lines raised at the Lukyanenko Krasnodar Research Institute of Agriculture. A significant association between the allele combinations and heading dates has been detected, as well as an interaction between the genotype and day length. Allele-specific markers allow breeders to manipulate plant material and to choose allele combinations most suitable for particular growth conditions.

Key words: common wheat, molecular markers, *Ppd* and *Vrn* alleles, heading date, marker-assisted breeding.