

УДК 575.224.2

ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО СОСТАВА ГЕНОВ *Vrn-1* И *Ppd-1* У РАННЕСПЕЛЫХ И СРЕДНЕРАННИХ СОРТОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ СИБИРИ

© 2014 г. И.Е. Лихенко¹, А.И. Стасюк², А.Б. Щербань²,
А.Ф. Зырянова¹, Н.И. Лихенко¹, Е.А. Салина^{1,2}

¹ ГНУ Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции
Россельхозакадемии, Краснообск, Россия,
e-mail: salina@bionet.nsc.ru;

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 3 октября 2014 г. Принята к публикации 17 октября 2014 г.

Комбинация аллелей генов *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, *Ppd-D1*, *Ppd-B1* анализировалась с использованием аллель-специфичных праймеров у 48 раннеспелых и среднеранних сортов яровой мягкой пшеницы из различных селекционных центров Сибири. По *Vrn-1* и *Ppd-1* генам выявлено 6 гаплотипов, включая 2 наиболее распространенных с двумя доминантными генами, *Vrn-A1* и *Vrn-B1*, на фоне рецессивных генов *Ppd-D1b*, обуславливающих чувствительность к фотопериоду. Доминантный аллель *Ppd-D1a* встречается очень редко и был описан в сочетании с доминантными генами *Vrn-A1* и *Vrn-B1* только у одного сорта (Тулун 15), который является наиболее скороспелым из всех проанализированных сортов. Внутри каждого гаплотипа выявлена значительная вариабельность по продолжительности вегетации, что предполагает сильное влияние «генетического фона» на данный признак. Полученные результаты могут быть использованы в маркер-опосредованной селекции для отбора генотипов, наиболее оптимальных для тех или иных условий возделывания.

Ключевые слова: аллели генов *Ppd* и *Vrn*, вегетационный период, фотопериод, сорт, мягкая пшеница.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важнейших биологических характеристик, определяющих хозяйственную ценность сортов зерновых культур и их пригодность для возделывания в той или иной климатической зоне, являются продолжительность и структура вегетационного периода растений. По мнению Н.И. Вавилова (1935), вегетационный период является одним из мощных средств приспособления растений к условиям среды. Тесно связаны с продолжительностью различных периодов роста и развития растений большинство признаков и свойств сорта и в конечном итоге его урожайность. Основное количество работ по генетике вегетационного периода у пшеницы связано с изучением продолжительности периода «всходы–колошение». Данный факт

отражает, в первую очередь, возможность более точного определения срока выколашивания, в отличие от времени созревания.

По современным представлениям, сроки кошения (созревания) у пшеницы определяются тремя генетическими системами, контролирующими реакцию растений на: 1) яровизирующие температуры (гены *Vrn-vernalisation*); 2) фотопериод (гены *Ppd-photoperiod response*) и 3) комплекс других, менее изученных, факторов (гены *Eps-earliness per se*, контролирующие время цветения, и независимые от факторов внешней среды) (Worland, 1996). При этом большинство исследователей сходятся во мнении, что главную роль играют две первые системы, а третья имеет лишь второстепенное значение. А.Ф. Стельмах (1984, 1987) пришел к заключению, что 70 % генетически обусловленного варьирования про-

должительности периода «всходы–колошение» детерминировано генами *Vrn*, 25 % – генами *Ppd* и только 5 % – другими генами.

Растительный материал классифицируется как чувствительный или нечувствительный к фотопериоду, в зависимости от того, требует ли он длинного дня для перехода к цветению. Гены *Ppd-D1*, *Ppd-B1* и *Ppd-A1*, расположенные на гомеологичных хромосомах 2-й группы, контролируют реакцию на фотопериод у мягкой пшеницы ($2n = 42$, BBAADD) (Scarth, Law, 1984). По силе влияния на чувствительность к фотопериоду *Ppd-I* гены находятся в следующем порядке: *Ppd-D1* > *Ppd-B1* > *Ppd-A1*, хотя в отдельных случаях эффект аллеля *Ppd-B1* сопоставим с *Ppd-D1* (Worland *et al.*, 1998; Nishida *et al.*, 2013). J. Beales с соавт. (2007) разработали диагностические маркеры для *Ppd-D1*, основного локуса реакции на фотопериод. Доминантный аллель этого гена *Ppd-D1a* обуславливает нейтральную реакцию на длину дня, в отличие от рецессивного аллеля *Ppd-D1b*.

На данный момент достигнут определенный успех в расшифровке молекулярно-генетического механизма детерминации чувствительности к яровизации и срока колошения. Было показано, что в основе этого механизма лежат мутации в регуляторных районах *Vrn-I* гена (Distelfeld *et al.*, 2009). Эти мутации снимают зависимость перехода к стадии колошения от фактора яровизации и переводят ген из рецессивного в доминантное состояние. У мягкой пшеницы имеется три гомеологичных *Vrn-I* локуса: *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1*. Установлено, что сочетание различных доминантных аллелей гомеологичных *Vrn-I* локусов влияет на срок колошения и, соответственно, на общую продолжительность вегетационного периода (Stelmakh, 1993). Изучение продолжительности фаз развития мягкой пшеницы у изогенных и замещенных линий с различными аллелями генов *Vrn-I* показало, что срок вегетационного периода зависит в основном от продолжительности этапа «кушение–первый узел» (Воронин, Стельмах, 1985; Kosner, Pankova, 2004; Емцева и др., 2013).

Сведения об общей продолжительности вегетационного периода яровой пшеницы достаточно разнообразны. По мнению К.А. Фляксбергера (1938) и М.И. Руденко (1960), она варьирует от

76 до 140 и более дней. Другие авторы считают пределами вегетации яровой мягкой пшеницы 70–80 и 120–130 дней (Кумаков, 1980; Зыкин и др., 2000). Единого мнения по вопросу классификации сортов по группам спелости также не существует. Официально в настоящее время принято пользоваться классификацией Государственной комиссии по испытанию и охране селекционных достижений, согласно которой по зерновым приняты группы спелости: ранне-спелая, среднеранняя, среднеспелая, среднепоздняя, позднеспелая (www.gossort.com).

В табл. 1 представлено условное распределение генотипов с доминантными *Vrn-I* генами по группам спелости. На фоне разной реакции на фотопериод генотипы яровых сортов мягкой пшеницы с различными сочетаниями доминантных генов распределены по скорости колошения и, соответственно, общей скороспелости. Генотип с одним доминантным геном *Vrn-B1* характерен для наиболее позднеспелых сортов (двуручки или поздние), хотя в отдельных случаях более позднеспелыми являются сорта с одним доминантным геном *Vrn-D1*. Наиболее

Таблица 1

Условное распределение сортов с генами *Vrn-I* и *Ppd* по группам спелости (Леонтьев, 1980; Stelmakh, 1993)

Группа по скорости спелости	Чувствительные к фотопериоду (гены <i>ppd</i>)	Нечувствительные к фотопериоду (гены <i>Ppd</i>)
Двуручки	<i>Vrn-B1</i>	–
Поздние	<i>Vrn-D1</i> <i>Vrn-B1 Vrn-D1</i>	<i>Vrn-B1</i>
Средние	–	<i>Vrn-D1</i> <i>Vrn-B1 Vrn-D1</i>
Средне-ранние	<i>Vrn-A1</i> <i>Vrn-A1 Vrn-B1</i> <i>Vrn-A1 Vrn-D1</i>	–
Ранние	–	<i>Vrn-A1</i> <i>Vrn-A1 Vrn-B1</i> <i>Vrn-A1 Vrn-D1</i> <i>Vrn-A1 Vrn-B1 Vrn-D1</i>

П р и м е ч а н и е. *Ppd* – доминантные; *ppd* – рецессивные гены, контролирующие реакцию на фотопериод. Даны новые обозначения *Vrn-I* генов. Соответствующие старые обозначения: *Vrn1* (*Vrn-A1*), *Vrn2* (*Vrn-B1*), *Vrn3* (*Vrn-D1*). В таблице указаны только доминантные *Vrn-I* гены.

скороспелыми являются сорта с тремя доминантными генами – *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*. Однако необходимо иметь в виду, что такой генотип оказывается наименее продуктивным и практически не встречается среди существующих сортов (Стельмах, 1986).

Целью данной работы являются характеристика сибирских раннеспелых и среднеранних сортов яровой мягкой пшеницы по генам, детерминирующим продолжительность вегетационного периода, и сопоставление полученных результатов молекулярных исследований с реальными полевыми характеристиками генотипов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Молекулярный анализ генов *Vrn-1* и *Ppd-1* проводился на материале 48 сортов яровой мягкой пшеницы сибирской селекции из отдела растительных ресурсов Сибирского научно-исследовательского института растениеводства и селекции. ДНК выделяли из 3-дневных пророст-

ков, выращенных на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри. Листья 3–4 растений помещали в пробирку объемом 1,5 мл, добавляли 700 мкл буфера (1 мл 1М Трис-НCl, 1 мл 5 М NaCl, 1 мл 0,5 М ЭДТА, 0,625 мл 20 % SDS и 0,04 г Na₂S₂O₅), измельчали на гомогенизаторе FastPrep-24 (MP Biomedicals, USA) и инкубировали на водяной бане при 60 °С в течение 30 мин. Затем добавляли 700 мкл хлороформ-изоамилового спирта (24 : 1) и центрифугировали 25 мин при 12 тыс. об./мин. Верхнюю фракцию помещали в пробирку объемом 2 мл, добавляли 1,4 мл охлажденного при –20 °С 96 %-го этанола и центрифугировали 15 мин при 4,5 тыс. об./мин. К осадку добавляли 700 мкл 70 %-го спирта и центрифугировали 5 мин при 4,5 тыс. об./мин. Надосадочную жидкость удаляли; осадок высушивали на воздухе и растворяли в 50 мкл буфера TE.

Для изучения аллелей генов *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, *Ppd-D1* и *Ppd-B1* использовались аллель-специфичные праймеры (табл. 2). ПЦР проводи-

Таблица 2

Праймеры для идентификации различных аллелей генов *Vrn-1* и *Ppd-1* у гексаплоидной пшеницы

Аллель, определяемый в результате ПЦР	Аллель-специфичные праймеры, использованные в ПЦР	Размер ДНК-фрагмента (п.н.)	Литературный источник
<i>Vrn-A1a</i> <i>Vrn-A1b</i> <i>vrn-A1</i>	VRN1AF GAAAGGAAAAATTCTGCTCG VRN1-INT1R GCAGGAAATCGAAATCGAAG	965+876 714 734	Yan <i>et al.</i> , 2004
<i>Vrn-B1a</i> <i>Vrn-B1c</i>	Intr1 ATCATCTTCTCCACCAAGGG Intr1/B/R3 CTCATGCCAAAAATTGAAGATGA	1124 737	Shcherban <i>et al.</i> , 2012a Fu <i>et al.</i> , 2005
<i>vrn-B1</i>	Intr1/B/F CAAGTGGAACGGTTAGGACA Intr1/B/R4 CAAAATGAAAAGGAATGAGAGCA	1149	Fu <i>et al.</i> , 2005
<i>Ppd-D1a</i> <i>Ppd-D1b</i>	Ppd1_F ACGCCTCCCACTACACTG Ppd1_R1 GTTGGTTCAAACAGAGAGC Ppd1_R2 CACTGGTGGTAGCTGAGATT	288 414	Beales <i>et al.</i> , 2007
<i>Ppd-B1b</i>	For4-PpdB-prom TCCTCCCAGGTACAAAGGCA Rev1-Ppd-exon2 GTGCTTACTGATGACGGGGA	2003	Киселева и др. (Не опубликовано)

ли в общем объеме реакционной смеси 20 мкл, включающей: ДНК (50–100 нг), 10× буфер для Taq полимеразы (650 mM Tris-HCl (pH 8,9); 160 mM (NH₄)₂SO₄; 25 mM MgCl₂; 0,01 % Tween 20), по 0,25 mM каждого dNTP, по 1 нг каждого праймера, 1 мкл Taq полимеразы (1 единица активности/мкл), H₂O – до конечного объема 20 мкл. Условия ПЦР для выявления аллелей генов *PPD-1* и *Vrn-1* приведены в табл. 3.

Для аллелей гена *Ppd-B1* условия ПЦР были следующие: денатурация при 94 °C в течение 3 мин, далее 2 цикла: 94 °C – 30 с, 58 °C – 30 с, 72 °C – 2 мин, 11 циклов: 94 °C – 30 с, 58 °C с постепенным понижением до 52 °C – 30 с, 72 °C – 2 мин, затем 27 циклов: 94 °C – 30 с, 58 °C – 30 с, 72 °C – 2 мин, финальная элонгация при 72 °C – 7 мин. Разделение продуктов ПЦР проводили с помощью электрофореза в течение 50–70 мин в 1 %-м агарозном геле, содержащем бромистый этидий.

Полевые исследования проводились на опытном поле Сибирского НИИ растениеводства и селекции с 2005 г. по 2013 г., согласно методическим указаниям по изучению мировой коллекции пшеницы (Мережко, 1999). В статье приведены данные по общей продолжительности вегетационного периода.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении влияния генов *Vrn-1* и *Ppd-1* на сроки созревания основное внимание было сосредоточено на идентификации доминантных

аллелей генов *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Ppd-D1* и *Ppd-B1*, вклад которых в сокращение сроков колошения и, как следствие, в сроки созревания, был неоднократно показан ранее. При наличии доминантных *Vrn-A1* и /или *Vrn-B1* достоверного влияния присутствия еще одного доминантного гена *Vrn-D1* на сроки колошения отмечено не было (Потокина и др., 2012). Кроме того, ранее проводимое изучение сортов, произрастающих в Европе и Сибири как генетическими, так и молекулярно-генетическими методами, показало, что *Vrn-D1* практически отсутствует у яровых сортов пшеницы, произрастающих в Европе и Сибири (Stelmakh, 1990; Моисеева, Гончаров, 2007; Shcherban *et al.*, 2012б, 2014). В связи с вышеизложенным, идентификация аллелей *Vrn-D1* у сортов Сибирского региона в данной работе не проводилась.

Аллели гена *Vrn-A1* изучались с использованием VRN1AF и VRN1-INT1R праймеров (табл. 2). Ожидаемый размер амплифицированного фрагмента с использованием этих праймеров для рецессивного аллеля *vrn-A1* составляет 734 п.н., для самого распространенного доминантного аллеля *Vrn-A1a* – 965 и 876 п.н. (рис. 1, а).

Среди проанализированных 48 генотипов рецессивный аллель *vrn-A1* обнаружен только у двух сортов – Сибирячка 4 и Фора. Остальные сорта несут доминантный аллель *Vrn-A1a* (табл. 4).

Использование праймеров Intr1 и Intr1/B/R3 позволяет выявить доминантные аллели *Vrn-B1a* (1124 п.н.) и *Vrn-B1c* (737 п.н.). На рис. 1, б представлена амплификация этих аллелей у

Таблица 3
Условия проведения ПЦР с аллель-специфичными праймерами генов *Vrn-1* и *Ppd-D1*

Тестируемый аллель/ген	Условия ПЦР					
	Начальная денатурация, t° (мин)	Количество циклов	Денатурация, t° (с)	Отжиг, t° (с)	Элонгация, t° (с)	Финальная элонгация, t° (мин)
<i>Vrn-A1a</i> , <i>Vrn-A1b</i> , <i>vrn-A1</i>	94(10)	38	94(45)	50(45)	72(60)	72(5)
<i>Vrn-B1a</i> , <i>Vrn-B1c</i>	94(2)	38	94(45)	58(45)	72(70)	72(5)
<i>vrn-B1</i>	94(2)	38	94(45)	58(45)	72(70)	72(5)
<i>Ppd-D1a</i> , <i>Ppd-D1b</i>	94(2)	38	94(45)	55(45)	72(30)	72(5)

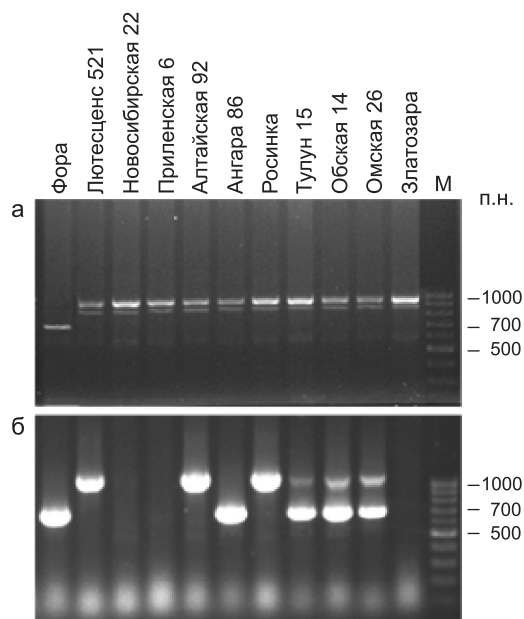


Рис. 1. Выявление рецессивного *vrn-Al* (734 п.н.) и доминантного *Vrn-Ala* (965+876 п.н.) аллелей (а), а также доминантных аллелей *Vrn-B1a* (1124 п.н.) и *Vrn-B1c* (737 п.н.) у сортов сибирской селекции с использованием аллель-специфичных праймеров (б).

некоторых сортов мягкой пшеницы, включая три гетерозиготных сорта (Тулун 15, Обская 14 и Омская 26), несущих сразу два доминантных аллеля. Сорта, у которых продукт амплификации отсутствует, вероятно, несут рецессивный аллель *vrn-B1*. Для его идентификации исполь-

зовалась комбинация праймеров Intr1/B/F//Intr1/B/R4. Всего из 48 сортов пшеницы рецессивный аллель *vrn-B1* (1149 п.н.) выявлен у 8 (рис. 2), доминантные аллели *Vrn-B1a* и *Vrn-B1c* – у 22 и 12 сортов соответственно; 6 сортов являются гетерозиготными (табл. 4).

Кроме *Vrn-1* генов, контролирующих реакцию растения на яровизацию, существенное влияние на продолжительность вегетационного периода могут оказывать гены *Ppd-1*, определяющие чувствительность растения к длине дня.

Анализ генов *Ppd-D1* с использованием аллель-специфичных праймеров (табл. 2) показал наличие доминантного аллеля *Ppd-D1a* у единственного сорта – Тулун 15 (рис. 3, а), что делает его слабочувствительным к фотопериоду; все остальные сорта характеризуются наличием рецессивного аллеля *Ppd-D1b* и являются чувствительными к длине светового дня (табл. 4). Анализ генов *Ppd-B1* выявил мономорфность всех изученных сортов в регуляторных районах гена – в области промотора и первого интрона (2003 п.н.) (рис. 3, б).

Большинство работ связано с изучением влияния генов *Vrn* и *Ppd* на сроки колошения, в первую очередь, из-за с возможностью более точного определения срока выколашивания, в отличие от времени созревания. В то же время неоднократно было показано, что общая продолжительность вегетационного периода, лежащая в основе классификации сортов по группам

Таблица 4

Выявленные аллельные комбинации генов *VRN-A1*, *VRN-B1* и *PPD-D1* у проанализированных сортов мягкой пшеницы

Сорта	<i>Vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>Ppd-D1</i>	Гаплотип
Балаганка	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Аленькая улучшенная	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Сибирка 1818	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Тулун 14	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Скороспелка улучшенная	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Омская 2078	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Лютеценс 937	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Скала	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Лена	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Бирюсинка	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1

Окончание таблицы 4

Сорта	<i>Vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>Ppd-D1</i>	Гаплотип
Иртышанка 10	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Омская 12	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Приобская	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Лютесценс 521	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Алтайская 92	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Росинка	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Чернява 13	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Страда Сибири	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Новосибирская 15	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Удача	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Омская 36	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Тулун 14h68	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Ангара 86	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	2
Алтайская 98	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	2
Омская 32	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	2
Полюшко	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	2
Катюша	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	2
П. Вавенкова	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	2
Тарская 8	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	2
Тарская 10	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	2
Боевчанка	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	2
Лютесценс 25	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	2
Красноярская 1103	<i>Vrn A1a</i>	<i>vrn B1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	3
Тюменская 80	<i>Vrn A1a</i>	<i>vrn B1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	3
Новосибирская 22	<i>Vrn A1a</i>	<i>vrn B1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	3
Приленская 6	<i>Vrn A1a</i>	<i>vrn B1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	3
Златозара	<i>Vrn A1a</i>	<i>vrn B1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	3
Новосибирская 29	<i>Vrn A1a</i>	<i>vrn B1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	3
Новосибирская 31	<i>Vrn A1a</i>	<i>vrn B1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	3
Алтайская 70	<i>Vrn A1a</i>	<i>vrn B1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	3
Тажная	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i> <i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	4
Обская 14	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i> <i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	4
Омская 26	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i> <i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	4
П. Азиева	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i> <i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	4
Алтайская 99	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i> <i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	4
Сибирячка 4	<i>vrn A1</i>	<i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	5
Фора	<i>vrn A1</i>	<i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	5
Тулун 15	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i> <i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1a</i>	6

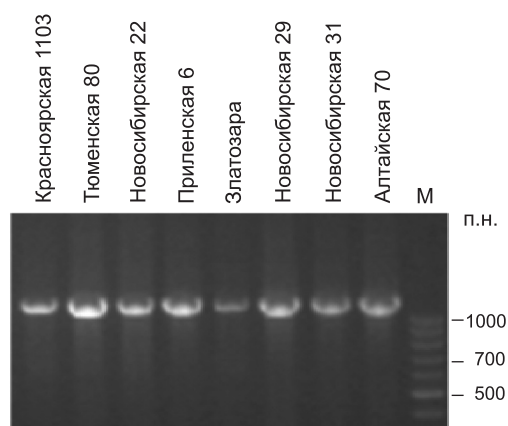


Рис. 2. ПЦР-анализ с использованием комбинации праймеров Intr1/B/F//Intr1/B/R4 для выявления рецессивного аллеля *vrn-B1* (1149 п.н.).

спелости, находится в прямой зависимости от сроков колошения и, следовательно, во многом обусловлена взаимодействием генов *Vrn* и *Ppd*. Продолжительность вегетационного периода для 48 раннеспелых и среднеранних сортов яровой мягкой пшеницы из различных селекционных центров Сибири оценивалась на протяжении 9 лет (с 2005 г. по 2013 г.) на опытном поле Сибирского НИИ растениеводства и селекции. Данные по продолжительности вегетационного периода с 2011 г. по 2013 г. для отдельных сортов представлены в табл. 5.

Согласно распределению аллелей генов *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Ppd-D1*, проанализированные сорта можно распределить по 6 гаплотипам (табл. 4, 5). Гаплотипы 1 и 2 с полным набором доминантных аллелей по изучаемым генам *Vrn-1* составляют самую многочисленную группу. Следует отметить, что только к гаплотипу 1 относятся сорта, районированные как в 1920–1950-е, так и в 2000-е годы (табл. 5). В данном гаплотипе показатель продолжительности вегетации был наименьшим у Новосибирской 15 в 2006–2007 годах (65–66 дней), у сортов Балаганка и Сибирка 1818 – в 2012 г. (66 дней). Самая длительная вегетация оказалась у сортов Страда Сибири (87 дней) и Омская 36 (88 дней) в 2009 г. В среднем за 2011–2013 гг. показатель варьировал для данной группы сортов от 70,54 до 78,4.

Такой сильный разброс показателей у сортов одного гаплотипа, значительно различающихся по времени допуска к использованию (от 1929 г.

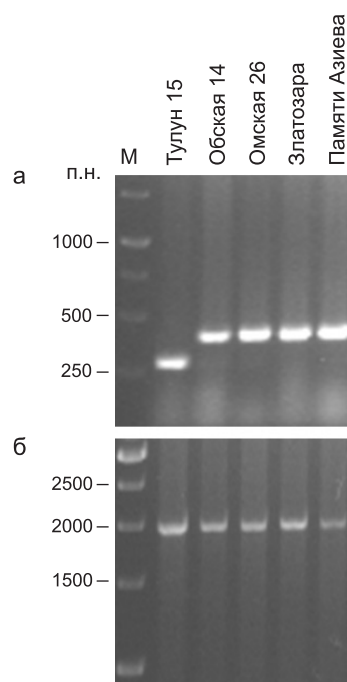


Рис. 3. ПЦР-анализ с использованием комбинации праймеров Ppd1_F//Ppd1_R1//Ppd1_R2 (а) и For4-PpdB-prom//Rev1-Ppd-exon2 (б) для анализа аллелей генов *Ppd-D1* и *Ppd-B1* соответственно.

до 2007 г.), а также происхождению (от Якутии до Омска), позволяет предположить, что данное сочетание аллелей может быть актуальным для сортов, различающихся как по продолжительности вегетации, так и по приспособительным свойствам. Кроме того, следует отметить разнообразие этих сортов и по качеству получаемого от них зерна, поскольку среди них имеются как сорта-филеры (например Омская 12, Росинка и др.), так и сорта сильной пшеницы (Новосибирская 15 и др.).

К гаплотипу 2 относятся сорта, имеющие аллель *Vrn-B1c* (табл. 5). В этой группе оказались сорта, районированные в 1989–2009 гг. Как и сорта предыдущего гаплотипа, они достаточно сильно различаются по продолжительности вегетационного периода, имея примерно такой же размах варьирования по этому признаку. Продолжительность вегетации была наименьшей у Ангара 86 в 2006 г. (62 дня) и Полношко – в 2012 г. (63). Самая длительная вегетация оказалась у омских сортов Катюша и Омская 32 в 2009–2010 гг. (86–88 дней). В среднем за 2011–2013 гг. показатель варьировал от 67,43 до 77,14.

Таблица 5

Продолжительность вегетационного периода сортов мягкой пшеницы, относящихся к различным гаплотипам

Сорт	Год ¹	Г.с. ²	Происхождение	Годы испытания			Размах варьирования 2005–2013
				2011	2012	2013	
Гаплотип 1: <i>Vrn-A1a</i> , <i>Vrn-B1a</i> , <i>Ppd-D1b</i>							
Балаганка ³	1929	с-р	Иркутск, местный	73	66	73	66–77
Сибирка 1818 ³	1940	р	Иркутск, местная Сибирская	81	66	74	66–81
Тулун 14-Н-683 ³	1942	р	Иркутск, Ярославская × Прелюд	74	68	72	68–74
Омская 2078 ³	1952	с-р	Омск, Милыт.290/22821 × Ударница	77	69	79	69–79
Скала	1955	с-р	Иркутск (Ударница × Гарнет) × Линия 1571/5	75	75	72	67–75
Иртышанка 10 ³	1981	с-р	Омск, Скала × Сар.29	79	68	76	68–79
Алтайская 92 ³	1995	с-р	Алтай, Н67 × Лют. 4021	82	68	76	68–85
Росинка	1997	с-р	Омск, Сibaковская 3 (гамма-лучи)	76	68	76	68–85
Черныя 13	2000	с-р	Омск (Тюмень), (АНК-17 × ОмСХИ-6) × ОмСХИ-6	81	74	75	72–86
Страда Сибиря ³	2002	с-р	Омск (Ранг × Гибрид21) × (К-54049 × Л16333/617)	86	70	75	72–87
Новосибирская 15	2003	р	Новосибирск, Без.98 × Ирт.10) × Тул.10	77	75	69	65–80
Удача	2006	с-с	Новосибирск, Лют.25 × Лют.101	78	78	72	69–86
Омская 36	2007	с-р	Омск, Л.15086 × Runar (Норвегия)	81	72	77	72–88
*Среднее ± ошибка среднего				78,46 ± 1,02	70,54 ± 1,07	74,31 ± 0,74	

Продолжение таблицы 5

Сорт	Год ¹	Г.с. ²	Происхождение	Годы испытания			Размах варьирования 2005–2013
				2011	2012	2013	
Галлотип 2: <i>Vrn-A1a</i> , <i>Vrn-B1c</i> , <i>Ppd-D1b</i>							
Лютесценс 25 Алтайская 98 Омская 32 Полушко Катюша	1991	с-р	Новосибирск, Wendel (И-306426) × Сар.36	77	65	72	65–79
	2001	с-р	Алтай, Эритроспермум 70 × Лют. 25	78	66	73	70–83
	2001	с-р	Омск, Лют.162/84 × Криз (США)	79	70	75	70–86
	2008	р	Новосибирск, Обская 14 × Н.22	73	63	69	63–73
	2008	с-р	Омск (мутант 717 × В2612) × мутант 769	76	73	81	73–88
Памяти Вавенкова	2008	с-р	Новосибирск, Н.29 × {[Funello × Бирюсинка] × (ЛА-296)} × Тул.12	79	67	73	66–82
Боевчанка	2009	с-р	Омск (Сар.60 × Лют.150/86-10) × (Сар.62 × Bastian)	78	68	74	68–78
*Среднее ± ошибка среднего				77,14 ± 0,80	67,43 ± 1,25	73,86 ± 1,39	
Галлотип 3: <i>Vrn-A1a</i> , <i>vrn-B1</i> , <i>Ppd-D1b</i>							
Тюменская 80 ³ Новосибирская 22 Златозара ³ Новосибирская 29	1985	с-р	Иркутск (Тюмень), Безостая1 × Сар.29	76	66	78	66–86
	1991	р	Новосибирск, мутант Скалы × Красноярская	75	67	74	67–81
	1999	с-р	Омск (Тюмень), Краснододская 210 × Ирт.10	81	74	75	71–85
	2003	с-р	Новосибирск, (ППГ × Sonora) × (ППГ × Грекум 114 × пырей) × Н.22	77	68	74	68–82
	Алтайская 70	2009	с-р	Алтай, Алтайская 98 × Алтайская 325	77	68	75
Новосибирская 31	2010	с-р	Новосибирск {Тюм.80 × [(Целинная 20 × АНК-102) × АНК-102]} × Sport (Швеция)	77	69	74	69–85
* Среднее +\– ошибка среднего.				77,17 ± 0,83	68,67 ± 1,15	75 ± 0,63	

Окончание таблицы 5

Сорт	Год ¹	Г.с. ²	Происхождение	Годы испытания			Размах варьирования 2005–2013
				2011	2012	2013	
Гаплогрупп 4: <i>Vrn-A1a</i> , <i>Vrn-B1a/Vrn-B1c</i> , <i>Ppd-D1b</i>							
Омская 26 ³	1998	с-р	Омск, Н.22 × WW16151	74	74	74	66–81
Памяти Азиева	2000	с-р	Омск, Сар.29 × Лют.99/80-1	88	74	76	71–88
Алтайская 99	2005	с-р	Алтай (Лют.183 × К 54975) × Лют.183	84	68	75	68–84
*Среднее ± ошибка среднего				82 ± 4,16	72 ± 2,00	75 ± 0,58	
Гаплогрупп 5: <i>vrn-A1</i> , <i>Vrn-B1c</i> , <i>Ppd-D1b</i>							
Фора	1996	р	Курган, С.-Петербург, ТРР (Carazino) siete Citros F 66 / 3 /2 Кинельская 30	82	79	71	71–86
Гаплогрупп 6: <i>Vrn-A1a</i> , <i>Vrn-B1a/Vrn-B1c</i> , <i>Ppd-D1a</i>							
Тулун 15	1998	р	Иркутск, Харьковская 93 × Тулунчанка	73	61	70	60–73

¹ Год внесения в Госреестр допущенных к использованию селекционных достижений (районирования); ² группа спелости: р – раннеспелые, с-р – среднеранние; ³ сорт не внесен в Госреестр допущенных к использованию сортов. * Статистически значимых различий между изученными гаплогруппами с использованием t-критерия Стьюдента выявлено не было.

Сокращения. Н. – Новосибирская; Лют. – Лютеценс; Сар. – Саратовская; Без. – Безенчукская; Тул. – Тулунская; Ирт. – Иртышанка; Тюм. – Тюменская.

К гаплотипу 3 относятся сорта с рецессивным аллелем *Vrn-B1*, районированные в 1952–2010 гг. Продолжительность вегетации была наименьшей у Тюменской 80 в 2012 г. (66 дней) и Новосибирской 22 в 2006, 2008 и 2012 гг. (67 дней). Самая длительная вегетация оказалась у сортов Тюменская 80 в 2009 г. (86 дней), Златозара – в 2010 г. (85 дней) и Новосибирская 31 – в 2009 г. (85 дней). В среднем за 2011–2013 гг. показатель варьировал от 68,67 до 77,17 у сорта Златозара. Следует отметить, что большинство данных генотипов по качеству относятся к ценным и сильным сортам. Кроме того, именно в эту группу входят перспективные современные среднеранние сибирские сорта Новосибирская 29, Новосибирская 31 и Алтайская 70, которые особенно близки по вегетации к «классическому» среднераннему сибирскому сорту Скала. Данные сорта в высокой степени насыщены генетическим материалом местных форм и саратовских сортов, как это отмечается для сибирских генотипов и другими авторами. Но они еще и отличаются тем, что при их создании были использованы пшенично-пырейные гибриды и ряд иностранных сортов, которые, видимо, играли роль эффективных источников устойчивости к болезням.

Гаплотип 4, гетерозиготный по гену *Vrn-B1*, включает сорта, районированные в 1982–2005 гг. По продолжительности вегетации в 2011–2013 гг. в среднем варьирование было в пределах 72–82 дня.

К гаплотипу 5 отнесен самый позднеспелый из всех изученных сорт Сибирячка 4 (размах варьирования продолжительности вегетации от 80 в 2008 г. до 100 дней в 2005 г.), а также сорт Фора, особой отличительной чертой которого являются очень короткий вегетативный период развития растений (всходы–колошение) и растянутый репродуктивный период от колошения до созревания.

Единственным сортом, имеющим, в отличие от других генотипов, аллель *Ppd-D1a* вместо *Ppd-D1b*, оказался сорт Тулун 15. В настоящее время это самый скороспелый сорт из всего набора допущенных к использованию сортов яровой мягкой пшеницы на территории Сибири и России в целом. Его районирование только в Восточной Сибири оправдывается тем, что сорт способен формировать приемлемую в хозяйственном отношении урожайность только

при достаточной, а еще лучше при избыточной, увлажненности. Следует отметить, что различие яровых сортов только по присутствию *Ppd-D1a/Ppd-D1b* всегда сопровождается более коротким сроком колошения у сортов с *Ppd-D1a* аллелем (Потокина и др., 2012; Kumar *et al.*, 2012). Кроме того, гаплотип *Vrn-A1 Vrn-B1 Ppd-D1a*, описанный у Тулун 15, достаточно редко встречается у яровых сортов пшеницы, произрастающих в Европе и России. Так, анализ 245 европейских сортов выявил только один сорт с гаплотипом *Vrn-A1 Vrn-B1 Ppd-D1a* (Shcherban *et al.*, 2014). Частота встречаемости аллеля *Ppd-D1a*, подавляющего чувствительность к фотопериоду, существенно увеличивается от северных регионов к южным, что можно проследить по результатам оценки генов *Vrn-1* и *Ppd-1* у сортов мягкой пшеницы из различных регионов мира (Iqbal *et al.*, 2010; Gomeza *et al.*, 2014; Shcherban *et al.*, 2014).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наличие в первых трех гаплотипах максимального количества раннеспелых и среднеранних сортов сибирской селекции, актуальных для современного растениеводства, косвенно свидетельствует о перспективности использования в практической селекции имеющихся у них сочетаний аллелей генов *Vrn* и *Ppd*. Немногочисленность сортов 5–6-го гаплотипов, а также локальный характер использования их в производстве предполагают их специфичность и/или узкую экологическую специализацию.

В пределах каждой из выделенных групп имеются весьма значительные различия по продолжительности вегетации. Например, среди сортов 1-го гаплотипа особенно резко различаются раннеспелый сорт Новосибирская 15 и среднеранний сорт селекции Сибирского НИИСХ Омская 36. Размах варьирования продолжительности вегетации первого сорта – от 65 до 80 дней, второго – от 72 до 88 дней. Во второй группе различаются раннеспелый сорт Полюшко селекции СибНИИРС (63–73 дня) и среднеранний сорт Сибирского НИИСХ Катюша (73–83 дня). Данные факты предполагают наличие дополнительных генетических различий, вносящих существенный вклад в определение продолжительности как отдельных

фаз развития, так и вегетационного периода в целом у сортов, имеющих одинаковый гаплотип по генам *Vrn-1* и *Ppd-1*.

Работа выполнена при финансовой поддержке бюджетного проекта VI.53.1.5.

ЛИТЕРАТУРА

- Вавилов Н.И. Ботанико-географические основы селекции // Теоретические основы селекции растений. М.; Л.: Сельхозгиз, 1935. Т. 1. С. 17–94.
- Воронин А.Н., Стельмах А.Ф. Этапы органоогенеза у почти изогенных по локусам *Vrn1_3* линий мягкой пшеницы // Науч.-техн. бюл. ВСГИ. 1985. № 1(55). С. 19–23.
- Емцева М.В., Ефремова Т.Т., Арбузова В.С. Влияние аллелей *Vrn_B1a* и *Vrn_B1c* на продолжительность фаз развития замещенных и изогенных линий мягкой пшеницы // Генетика. 2013. Т. 49. № 5. С. 632–640.
- Зыкин В.А., Шаманин В.П., Белан И.А. Экология пшеницы. Омск: Изд-во ФГОУ ВПО ОмГАУ, 2000. 124 с.
- Кумаков В.А. Физиология яровой пшеницы. М.: Колос, 1980. 207 с.
- Леонтьев С.И. Основные параметры моделей сортов яровой пшеницы интенсивного типа для степи и южной лесостепи Западной Сибири. Омск: ОмСХИ, 1980. 85. С. 139.
- Мережко А.Ф. Пополнение, сохранение в живом виде и изучение мировой коллекции пшеницы, эгилопса и триitikале // Методические указания. СПб.: ВИР, 1999. 82 с.
- Моисеева Е.А., Гончаров Н.П. Генетический контроль ярового типа развития у стародавних и местных сортов мягкой пшеницы Сибири // Генетика. 2007. Т. 43. № 4. С. 469–476.
- Потокина Е.К., Кошкин В.А., Алексеева Е.А., Матвиенко И.И., Филобок В.А., Беспалова Л.А. Комбинация аллелей генов *Ppd* и *Vrn* определяет сроки колошения у сортов мягкой пшеницы // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2012. Т. 16. Р. 77–86.
- Руденко М.И. К вопросу селекционного использования твердой пшеницы в районах Юго-Востока // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1960. Т. 32. Вып. 2. С. 227–247.
- Стельмах А.Ф. Изучение генетики типа и скорости развития мягких пшениц во ВСГИ // Генетико-цитологические аспекты селекции сельскохозяйственных растений: Сб. науч. тр. Одесса, 1984. С. 5–15.
- Стельмах А.Ф. О генетической природе типичных двуручек мягкой пшеницы // С.-х. биология. 1986. № 2. С. 22–30.
- Стельмах А.Ф. Роль генетических систем в онтогенетической адаптации мягкой пшеницы // Экологическая генетика и эволюция. Кишинев, 1987. С. 146–161.
- Фляксбергер К.А. Пшеницы. М.; Л.: ОГИЗ, 1938. 269 с.
- Beales J., Turner A., Griffiths S., Snape J.W., Laurie D.A. 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.
- Distelfeld A., Li C., Dubcovsky J. Regulation of flowering in temperate cereals // Curr. Opin. Plant Biol. 2009. V. 12. P. 1–7.
- Gomez D., Vanzettia L., Helguera M., Lombardoa L., Franschinea J., Miralles D.J. Effect of *Vrn-1*, *Ppd-1* genes and earliness per se on heading time in Argentinean bread wheat cultivars // Field Crops Res. 2014. V. 158. P. 73–81.
- Fu D., Szucs P., Yan L., Helguera M., Skinner J.S., Zitzewits J.V., Hayes P.M., Dubcovsky J. Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat // Mol. Genet. Genom. 2005. V. 273. P. 54–65.
- Iqbal M., Shahzad A., Ahmed I. Allelic variation at the *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, *Vrn-B3* and *Ppd-D1a* loci of Pakistani spring wheat cultivars // Electron. J. Biotechnol. 2010. V. 14. P. 1–8.
- Kosner J., Pankova K. Chromosome substitutions with dominant loci *Vrn_1* and their effect on developmental stages of wheat // Czech J. Genet. Plant Breed. 2004. V. 40. No. 2. P. 37–44.
- Kumar S., Sharma V., Chaudhary S., Tyagi A., Mishra P., Priyadarshini A., Singh A. Genetics of flowering time in bread wheat *Triticum aestivum*: complementary interaction between vernalization-insensitive and photoperiod-insensitive mutations imparts very early flowering habit to spring wheat // J. Genet. 2012. V. 91. No. 1. P. 33–47.
- Nishida H., Yoshida T., Kawakami K. *et al.* Structural variation in the 5'upstream region of photoperiod insensitive alleles *Ppd-A1a* and *Ppd-B1a* identified in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.), and their effect on heading time // Mol. Breeding. 2013. V. 31. No. 1. P. 27–37.
- Scarath R., Law C.N. The control of day length response in wheat by the group 2 chromosomes // Z. Pflanzenzücht. 1984. Bd. 92. S. 140–150.
- 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. 2012a. V. 29. No. 3. P. 675–685.
- Shcherban A.B., Emtseva M.V., Efremova T.T. Molecular genetical characterization of vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1* and *Vrn-D1* in spring wheat germplasm from Russia and adjacent regions // Cereal Res. Commun. 2012b. V. 40. P. 54–65.
- Shcherban A.B., Boerner A., Salina E.A. Effect of *VRN-1* and *PPD-D1* genes on heading time in European bread wheat cultivars // Plant Breeding. 2014. doi:10.1111/pbr.12223.
- Stelmakh A.F. Geographic distribution of *Vrn* genes in landraces and improved varieties of spring bread wheat // Euphytica. 1990. V. 45. P. 113–118.
- Stelmakh A.F. Genetic effects of *Vrn* genes on heading date and agronomic traits in bread wheat // Euphytica. 1993. V. 65. P. 53–60.
- Worland A.J. The influence of flowering time genes on environmental adaptability in European wheats // Euphytica. 1996. V. 89. P. 49–57.
- Worland A.J., Börner A., Korzun V., Li M.W., Petrovic S., Sayers E.J. The influence of photoperiod genes on the adaptability of European winter wheat // Euphytica. 1998. V. 100. P. 385–394.
- Yan L., Helguera M., Kato K., Fukuyama S., Sherman J., Dubcovsky J. Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploid wheat // Theor. Appl. Genet. 2004. V. 109. P. 1677–1686.

ANALYSIS OF THE ALLELIC VARIATION OF THE *VRN-1* AND *PPD-1* GENES IN SIBERIAN EARLY AND MEDIUM EARLY VARIETIES OF SPRING WHEAT

**I.E. Likhenko¹, A.I. Stasyuk², A.B. Shcherban'²,
A.F. Zyryanova¹, N.I. Likhenko¹, E.A. Salina^{1,2}**

¹ Siberian Research Institute of Plant Industry and Breeding, Krasnoobsk, Russia,
e-mail: salina@bionet.nsc.ru;

² Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Summary

Combinations of alleles of the *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, *Ppd-D1*, and *Ppd-B1* genes were analyzed with allele-specific primers in 48 spring wheat varieties from different breeding centers in Siberia. Six haplotypes were identified for *Vrn-1* genes, including two most abundant with two dominant genes *Vrn-A1* and *Vrn-B1* against the background of recessive *Ppd-D1b* genes, which cause sensitivity to photoperiod. Only one variety (Tulun 15) was found to bear the photoperiod-neutral *Ppd-D1a* allele, combined with the dominant *Vrn-A1* and *Vrn-B1* alleles. It showed the earliest ripening of all accessions examined. Within each haplotype, a considerable variability was found in growing duration, suggesting a strong influence of the “genetic background” on this trait. Nevertheless, the results can be used for marker-assisted selection of genotypes most appropriate for different growing conditions.

Key words: alleles of *Vrn* and *Ppd* genes, time of vegetation, photoperiod, variety, common wheat.