

## ВВЕДЕНИЕ

В народном хозяйстве ячмень имеет широкое применение как ценная зерновая культура, являясь главной зернофуражной культурой в Северо-Западном регионе России. Урожайность культуры в стране в последние годы находится на недостаточном уровне. В связи с этим одним из главных вопросов современного сельскохозяйственного производства является стабилизация производства зерна по годам вне зависимости от изменения погодных условий (Баталова, 2015). На современном этапе развития сельского хозяйства именно сорт является самым эффективным и наиболее доступным средством повышения величины и качества урожая, энергосбережения, увеличения рентабельности и конкурентоспособности аграрного производства. Для Северо-Западного региона необходимы скороспелые сорта ячменя, устойчивые к пониженным весенным температурам, полеганию и прорастанию на корню из-за избыточного увлажнения в период созревания и уборки урожая, толерантные к основным наиболее вредоносным болезням (пыльная головня, листовые пятнистости, мучнистая роса), гарантирующие ежегодное получение высоких урожаев. Таким образом, создание пластичных, скороспелых сортов, устойчивых к абиотическим и биотическим стрессорам, является приоритетным направлением в селекции ячменя на северо-западе.

Для создания новых сортов сельскохозяйственных растений, обладающих комплексом ценных признаков, высокой урожайностью и хорошим качеством продукции, в разнообразных условиях среды требуется комплексно изученный исходный материал. Коллекция ячменя ВИР им. Н. И. Вавилова, возобновляемая по всхожести и постоянно пополняемая, является основным источником нового исходного материала для обеспечения селекционных программ по созданию конкурентоспособных сортов (Шевцов, 2007).

Цель данного исследования – выявление источников хозяйствственно ценных признаков для создания перспективного селекционного материала ярового ячменя на основе изучения коллекционных образцов ячменя и анализ аллельного разнообразия генов *Ppd-H1*, *Ppd-H2*, *Vrn-H1*, *Vrn-H2* и *Vrn-H3* у этого материала.

В течение трех лет изучили 144 образца ярового ячменя *Hordeum vulgare* L., subsp. *vulgare* L., subsp. *distichon* (L.) Koern. коллекции ВИР по основным хозяйствственно ценным признакам. Проведено исследование районированных в РФ сортов, нового материала, поступившего в 2010–2012 гг. от селекционеров России, а также из генбанков стран СНГ, Западной Европы, США и Канады. Работу проводили на научно-производственной базе «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР» Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова (ПЛ ВИР, Санкт-Петербург) согласно методике ВИР. Содержание белка и крахмала определяли в отделе биохимии и молекулярной биологии ВИР по общепринятой методике (Ермаков и др., 1987...).

Метеорологические условия различались по годам. Так, в 2011 г. в период налива зерна наблюдались засушливые условия. В 2012 г. температура в мае и июне была невысокой, на уровне многолетних средних показателей. В первой и третьей декадах июля температура воздуха была на 5° выше средней многолетней. Сезон был влажным, однако осадки выпадали неравномерно. Избыток влаги привел к увеличению высоты растений и полеганию. В 2013 г. температура воздуха в течение периода вегетации превышала средние многолетние показатели. Высокая температура воздуха сочеталась с высокой влажностью, вызванной обильными дождями. В 2014 г. май был теплым (температура воздуха на 5° выше средних многолетних) и влажным. В первой декаде июня температура воздуха значительно превышала средние многолетние данные, во второй и третьей декадах наблюдали температуру воздуха на уровне многолетних. Осадков за месяц выпало значительно выше нормы. В первой половине июля температура воздуха незначительно превышала многолетние, в конце июля температура воздуха доходила до 32°C. Осадков за месяц выпало значительно ниже нормы, наблюдали засушливые условия. В первой половине августа наблюдали засушливые условия.

В качестве стандартных сортов использовали районированный и широко возделываемый в Ленинградской области сорт двурядного среднеспелого ярового ячменя ‘Суздалец’ (var. *mutans* Schudl.) и сорт шестирядного среднераннего ячменя ‘Белогорский’ (var. *pallidum* Ser., var. *rikotense* Regel.). Стандартом для определения скороспелости служил сорт ‘Potra’ (var. *parallelum* Koern.).

Изучение сортов ярового ячменя по морфологическим и хозяйственно биологическим признакам проведено согласно «Методическим указаниям по изучению и сохранению мировой коллекции ячменя и овса» (Лоскутов и др., 2012).

Колошение отмечали, когда колос наполовину выдвинулся из влагалища флагового листа, полное колошение – выколосилось около 75% растений.

Созревание отмечали датой наступления восковой или полной спелости зерна. Признаком восковой спелости является изменение окраски зерна или цветковой чешуи от зеленой до желтой, белой, а у некоторых образцов – до дымчатой, фиолетовой, коричневой или иной окраски. Зерно при восковой спелости легко режется ногтем; а при полной становится твердым.

Устойчивость к полеганию оценивали в течение всего вегетационного периода неоднократно: в периоды колошения и уборки урожая, а также после ливневых дождей или других экстремальных условий. Различали прикорневое полегание, когда растение полегает у основания стебля, и стеблевое. В первом случае главная причина – чрезмерное переувлажнение почвы. Прикорневое и стеблевое полегание вызывали обильные осадки в сочетании с сильным ветром. Степень устойчивости образцов против полегания определяли глазомерно по шкале:

1 – очень низкая – растения лежат на земле в разных направлениях, колосья лежат на земле или на других растениях;

3 – низкая – растения изогнуты в нижней части соломины, почти лежат на земле;

5 – средняя – растения наклонены, часть находится почти в горизонтальном положении;

7 – высокая – растения стоят вертикально, соломина слегка наклонена с середины последнего междуузлия;

9 – очень высокая – растения не полегают, стоят вертикально вместе с колосом или колос слегка поник;

Массу 1000 зерен определяли по двум навескам из 250 зерен. Если одна навеска не превышала другую более чем на 5%, их массу суммировали и умножали на 2. В случае больших различий анализ повторяли.

Начало перехода ячменя к генеративной фазе развития (*Hordeum vulgare*) зависит от длины светового дня и температуры окружающей среды. Потребность в яровизации и чувствительность к длине светового дня детерминированы генетически и влияют на сроки колошения. Экспресс-вариант прогнозирования времени колошения сортов ячменя в определенном географическом регионе основан на молекулярной диагностике их фотопериодической чувствительности и потребности в яровизации с помощью аллель-специфичных маркеров генов *VRN* и *Ppd*.

Гены семейства *VRN* (VERNALIZATION RESPONSE) и *Ppd* (PHOTOPERIOD RESPONSE) являются генетическими системами, контролирующими экспрессию генов, участвующих в запуске программ цветения, в зависимости от длины светового дня и продолжительности воздействия низких положительных температур. У ячменя комбинация генов *Vrn-H1*, *Vrn-H2* и *Vrn-H3* отвечает за чувствительность к яровизации. Гены *Ppd-H1* и *Ppd-H2* определяют чувствительность ячменя к длинному и короткому дню соответственно.

Экспрессия гена *Vrn-H1*(5H) зависит от уровня метилирования 5' региона, который изменяется после периода яровизации. Для активации работы гена требуется длительное воздействие низких положительных температур, запускающее деметилирование гистонов H3K27me3 и метилирование H3K4me3 в области промотора и первого интрона гена *Vrn-H1*. Продукт гена является транскрипционным фактором флоригена и регулирует уровень его экспрессии. Носители рецессивной аллели характеризуются низким уровнем транскрипта *vrn-H1* при отсутствии яровизации. Доминантная аллель *Vrn-H1* имеет делеции/вставки в упомянутых выше областях гена, что приводит к изменению эпигенетической регуляции, и, соответственно, экспрессия *Vrn-H1* перестает зависеть от яровизации. Таким образом, рецессивная аллель является озимой, доминантная – яровой. Идентификация рецессивных и доминантных аллелей *Vrn-H1* проводится при помощи трех пар аллель специфичных праймеров. Для рецессивной аллели возможно несколько

гаплотипов (1A, 5C), остальные возможные комбинации аmplифицируемых фрагментов являются доминантными гаплотипами (1B, 2, 3, 4A, 4B, 5A, 5B). (Cockram et al., 2009).

Предполагается, что кроме эпигенетической регуляции, на экспрессию гена *Vrn-H1* репрессирующее влияние оказывает продукт гена *Vrn-H2*, являющийся транскрипционным фактором, имеющим домен «цинковые пальцы». Ген *Vrn-H2*, принадлежит к семейству ZCCT генов и имеет CCT domain (CO, CO-подобный, и TOC1) (Yan et al. 2004), определяющий также зависимость экспрессии гена от фотопериода. Так влияние на требовательность к яровизации прослеживается только при длинном световом дне (16 или 24 часа). При коротком световом дне (8 часов) продукт гена *Vrn-H2* не активен (Karsai, 2005). Возможность влияния на чувствительность к яровизации также определяется наличием интактной доминантной аллели. При наличии делеции в локусе *Vrn-H2* (рецессивный) требовательность к яровизации у ячменя отсутствует (Zitzewitz, 2005). Ввиду чего доминантный аллель является озимым, а рецессивный – яровым. В локусе *Vrn-H2* находится несколько близкорасположенных генов-кандидатов семейства ZCCT. Идентификация аллелей гена *Vrn-H2* производится при помощи мультиплексной ПЦР с использованием двух пар праймеров, доминантная аллель имеет амплифицируемый фрагмент 1513 пн, в отличие от рецессивной, которая имеет делецию в данном локусе, содержащим два близкорасположенных гена ZCCT-Ha (AY485977) и ZCCT-Hb (AY485978) (Zitzewitz, 2005).

Аналогом гена *FT* арабидопсиса у ячменя является ген *Vrn-H3* (1H), продукт которого приводит к запуску цветения. Уровень транскрипции *Vrn-H3* значительно выше у ячменя с доминантным аллелем этого гена и ниже у растений ячменя с рецессивным аллелем. Доминантный *Vrn-H3* аллель у ячменя ассоциирован с мутацией в первом инtronе. Статистически подтверждено, что экспрессия *FT* достоверно зависит от яровизации (Yan et al., 2006). Доминантная аллель гена *Vrn-H3* ассоциирована с двумя нуклеотидными заменами в положениях SNP270 (A) и SNP384 (G) (Yan et al., 2006). Идентификация доминантного аллеля производится по определению нуклеотидной замены SNP384. В случае доминантного аллеля амплифицируемый фрагмент (350 пн) будет иметь два сайта рестрикции для эндонуклеазы рестрикции Ksp22I и размеры фрагментов будут составлять 138, 142 и 69 пн. В случае рецессивного аллеля сайтов рестрикции будет один и размеры фрагментов будут составлять 211 и 138 пн (Злотина и др. 2012).

Чувствительность к яровизации зависит от комбинации трех данных генов *VRN*. Так, чувствительным к яровизации является генотип *vrn-H1Vrn-H2vrn-H3* (Takahashi and Yasuda, 1971). Определение требовательности к яровизации у ячменя имеет ключевое значение при планировании оптимального срока колошения культуры. Следует отметить, что у сортов ячменя, несущих разную комбинацию яровых аллелей *Vrn-H1* и *Vrn-H2*,

отмечается разная скорость перехода к колошению. Так, при сочетании аллелей *Vrn-H1 vrn-H1/ Vrn-H2 Vrn-H2* наблюдается немного более позднее колошение, по сравнению с комбинацией аллелей *Vrn-H1 Vvrn-H1/ vrn-H2 vrn-H2*. Наиболее ускоренное колошение наблюдается у ячменей с генотипом *vrn-H1 vrn-H1/ vrn-H2 vrn-H2* (Szucs et al., 2006).

Активация ключевого гена *CO* является фотопериодически-зависимым процессом и регулируется несколькими факторами: системой циркадных часов LHY, CCA1/TOC1, зависимой от активации фитохрома B; отрицательно убиквитин-лигазной системой, одним из компонентов которой является COP1; стабильностью самого белка CO на свету и ингибирированием экспрессии гена *CO* репрессором CDF1. В рамках данной регуляции, продукт гена *CO*, транскрипционный фактор «флоригена», может не успеть образоваться в достаточном количестве за период однодневной осцилляции. В зависимости от восприятия светового сигнала различными фоторецепторами – крипто- и фитохромами, и ассоциированными с ними системами, может происходить активация CO в разных длинах волн, т. е. и в условиях короткого или длинного дня. Одними из компонентов, воспринимающих длину волны систем является семейство регуляторов фотопериодического ответа PRR (PRR7, PRR9), ортологами которых у ячменя являются *Ppd-H1* (2Н) и *Ppd-H2* (1Н) (Nakamichi et al., 2007). Считается, что PRR7, PRR9 подавляют экспрессию CDF1 – репрессора гена *CO*. Так, носители доминантной аллели гена *Ppd-H1* имеют достаточный уровень CO при длинном дне, и, соответственно, в этих условиях ранее зацветают, чем носители рецессивной аллели *ppd-H1*. Носители доминантной аллели гена *Ppd-H2* могут переходить к цветению при коротком дне, носители рецессивной аллели не переходят к цветению в данных условиях. Выявление аллелей *Ppd-H1* и *Ppd-H2* имеет важное значение при выборе сорта ячменя в соответствии с регионом выращивания.

Для молекулярно-генетического анализа ДНК выделяли из пяти 7–10-дневных проростков, что дало возможность выявить гетерогенность ряда сортов по аллелям изучаемых генов. Выделение ДНК проводили по стандартной методике с использованием СТАВ-буфера (Saghai-Marof et al., 1984).

Для выявления аллелей генов использовали аллель специфичные (функциональные) ДНК-маркеры (табл. 1). Подробное описание лабораторных протоколов дано в Методических указаниях ВИР (Злотина и др., 2012).

Знание генотипов сортов по аллелям *Vrn-* и *Ppd*-генов, использование ДНК-маркеров для отбора нужных комбинаций аллелей, несомненно, ускорит процесс селекции по признакам, контролируемым этими генами.

**Алфавитный указатель сортов ячменя.  
Образцы из России, Белоруссии и Украины.**

Стр.	Стр.
Ача .....	22
Анна .....	20
Атаман .....	24
Баган .....	22
Батька .....	24
Безенчукский 2 .....	20
Белогорский .....	10, 16
Бином .....	21
Биом .....	22
Биос-1 .....	17
Бровар .....	23
Бурштын .....	27
Ванік (Итог) .....	27
Вариант .....	11
Вежа .....	27
Велес .....	18
Владимир .....	17
Волгарь .....	20
Волгодон .....	12
Ворсинский 2 .....	21
Гандвиг .....	27
Густ .....	27
Джерело .....	14
Джин .....	17
Дзівосны .....	27
Дублет .....	13
Ерофей .....	23
Етикет .....	14
Задонский 8 .....	19
Зауральский 1 .....	12
Зенит .....	22
Зерноградец 770 .....	19
Зерноградский .....	11
Золак .....	27
Золотник .....	21
Зубр .....	13
Импульс .....	27
Казьминский .....	23
Кедр .....	23
Корнет .....	27
Красноярский 80 .....	23
Кредо .....	12
Криничный .....	10, 16
Ладны .....	13
Липень .....	13
Лунинский .....	11
Лунь .....	19
Магутны .....	12
Мамлюк .....	18
Мик-1 .....	10
Михайловский .....	17
Московский 86 .....	17
Натали .....	20
Неофит .....	14
Никита .....	22
Новичок .....	17
Нудум 95 .....	21
Нур .....	17
Одесский 115 .....	24
Одесский 22 .....	24
Одон .....	23
Омский 91 .....	22
Оренбургский 17 .....	20
Оскар .....	23
Паніч .....	27
Первоцелинник .....	20
Поспех .....	13
Прерия .....	24
Приазовский 9 .....	19
Прикумский 47 .....	11
Раушан .....	17
Рахат .....	16
Родник Прикамья .....	18
С-105 .....	12
Селянин .....	13
Сибирский авангард .....	22
Сибиряк .....	12
Сигнал .....	21
Симон .....	22
Соболек .....	23
Сокол .....	19
Сонет .....	21
Сталы .....	27
Стимул .....	18
Суздалец .....	10, 16
T-12 .....	20

Талер	13
Таловский 9	18
Тандем	17
Таусень	16
Тимерхан	19
Тонус	19
Фобос	13
Хаго	12
Хаджибей	18
Харьковский 99	14
Чакикский 221	18
Челябинец 1	21
Челябинский 99	21

Щедрый	19
Эколог	17
Эльф	17
Як-401	20
Якуб	13
Ясный	19
Ястреб	20
530-98	10
774-04	11
775-04	11
780-04	11
781-04	11
917-01	10

## Зарубежные сорта

Annabel	15
Astoria	26
Australische zweizeilige	28
Bankuti korai	28
Barke	15
Buck CDC	28
Chebec	28
Clipper	28
Danuta	15
Eifel-3	26
Galleon	28
Harrington	28
Haruna Nijo	28
Irbe (PR - 3528)	15
Jo 1310	27
Jumara	15
KWS Orphelia	15
Maresi	25
Margret	26
Marii	27
Messina	25
Morex	28
Pioneer	26

Posada	15
Potra	10, 16
Rubiola	15
Sahara	28
Scarlett	25
Symko	28
TR 306	28
Triumph	27
Vada	27
Weech	28
Абава	24
Арна	14
Астана 200	14
Грейс	24
Деспина	25
Жозефин	25
Марни	25
Саншайн	25
Себастьян	15
Чилл	24
Чираз	25
Чиф	15
Шармей	15

## Список литературы

- Баталова Г. А. Мировое разнообразие как основа адаптивной селекции овса // Тр. по прикл. бот., ген. и сел. 2015. Т. 176, вып. 1. С. 37–46.
- Ермаков А. И., Арасимович В. В., Смирнова-Иконникова М. И., Мурри И. К. Методы биохимического исследования растений. М. ; Л. : Сельхозгиз, 1987. 520 с.
- Злотина М. М., Киселева А. А., Потокина Е. К. Использование аллель-специфичных маркеров генов Vrn и Ppd для экспресс-диагностики фотопериодической чувствительности и потребности в яровизации мягкой пшеницы и ячменя. Методические указания. СПб. : ВИР, 2012. 29 с.
- Шевцов В. М., Серкин Н. В. Учение Н. И. Вавилова в селекции ячменя на Кубани // Тезисы докладов «Генетические ресурсы культурных растений в XXI веке». СПб., 2007. С. 645–646.
- Лоскутов И. Г., Ковалёва О. Н., Блинова Е. В. Методические указания по изучению и сохранению мировой коллекции ячменя и овса // СПб. : ВИР, 2012, 63 с.
- Cockram J., Norris C., O'Sullivan D. M. PCR-based markers diagnostic for spring and winter seasonal growth habit in Barley // Crop. Sci. 2009. Vol. 49. P. 403–410.
- Karsai I., Szucs P., Merszarros K., Filichkina T., Hayes P. M., Skinner J. S., Larnng L., Bedo Z. The Vrn-H2 locus is a major determinant of flowering time in a facultative x winter growth habit barley (*Hordeum vulgare* L.) mapping population // Theor. Appl. Genet. 110, 1458–1466
- Kikuchi R., Kawahigashi H., Ando T., Tonoaka T., Handa H. Molecular and Functional Characterization of PEPP Genes in Barley Reveal the Diversification of Their Roles in Flowering// American Society of Plant Biologists. 2009. Vol. 149. P. 1341–1353.
- Nakamichi N., Kita M., Niinuma K., Ito S., Yamashino T., Mizoguchiand T., Mizuno T. Arabidopsis clock-Associated Pseudo-Response Regulators PRR9, PRR7 and PRR5 Coordinately and Positively Regulate Flowering Time Through the Canonical CONSTANS-Dependent Photoperiodic Pathway // Plant Cell Physiol. 2007. Vol. 48 (6). P. 822–832.
- Saghai-Marof M. A., Soliman K. M., Jorgensen R. A., Allard R. W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics // Proc. NATL. Acad. Sci. USA. 1984. Vol. 81. No. 24. 801–8018.
- Szucs P., Karsai J., von Zitzewitz, Meszaros M., Cooper L. L. D., Gu Y. Q., Chen T. H. H., Hayes P. M., Skinner J. S. Positional relationships between photoperiod response QTL and photoreceptor and vernalization genes in barley // Theor. Appl. Genet. 2006. Vol. 112. P. 1277–1285.
- Takahashi, Yasuga. Genetics of earliness and growth habit in barley // In: Nilan RA (ed) Barley genetics II. Washington State University Press. Pullman. 1971. P. 38–408.
- Turner A., Beales J., Faure S., Dunford R., Laure D. A. The Pseudo Response Regulator Ppd-H1 provides adaptation to photoperiod in Barley // Science. 2005. Vol. 310. P. 103–1033.
- Yan L., Loukoianov A., Blechl A., Tranquilli G., Ramakrishna W., SanMiguel P., Bennetzen J. L., Echenique V., Dubcovsky J. The Wheat VRN2 Gene Is a Flowering

Repressor Down-Regulated by Vernalization // Science. 2004. Vol. 303. P. 1640–1644.

*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. Vol. 103. No. 51. P. 19581–19586.

*Zitzewitz J., Szucs P., Dubcovsky J. et al.* Molecular and structural characterization of barley vernalization genes // Plant Mol. Biol. 2005. Vol. 59. P. 449–467.

## СОДЕРЖАНИЕ

Стр.

Введение .....	3
Таблица № 1. Аллель-специфичные праймеры для <i>VRN</i> - и <i>Ppd</i> -генов ячменя .....	8
Таблица № 2. Агробиологическая характеристика образцов ячменя новых поступлений и генотипы по аллелям генов <i>Ppd-H1</i> , <i>Ppd-H2</i> , <i>Vrn-H1</i> , <i>Vrn-H2</i> , <i>Vrn-H3</i> .....	10
Таблица № 3. Агробиологическая характеристика образцов ячменя Гос Реестра и генотипы по аллелям генов <i>Ppd-H1</i> , <i>Ppd-H2</i> , <i>Vrn-H1</i> , <i>Vrn-H2</i> , <i>Vrn-H3</i> .....	16
Таблица № 4. Генотипы сортов ячменя по аллелям генов <i>Ppd-H1</i> , <i>Ppd-H2</i> , <i>Vrn-H1</i> , <i>Vrn-H2</i> , <i>Vrn-H3</i> .....	27
Таблица № 5. Выявленное разнообразие генотипов у сортов ячменя по аллелям изученных <i>Ppd</i> - и <i>VRN</i> -генов .....	29
Источники агробиологических признаков .....	30
Алфавитный указатель образцов .....	32
Список литературы.....	34