

Національна академія аграрних наук України
Селекційно-генетичний інститут —
Національний центр насіннезнавства та сортовивчення

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ *VRN*- ТА *PPD*-
ГЕНОТИПІВ ЯЧМЕНЮ (*HORDEUM*
VULGARE L.) ЗА ПЛР-АНАЛІЗОМ**

Методичні рекомендації

Одеса
«Екологія»
2021

На основі експериментальних досліджень та аналізу отриманих даних розроблено методику виявлення в ячменю доволі поширених *VRNH1*-алелів (гаплотипів), ідентифікації у генотипів функціональних та неактивних алелів *VRNH2*, *VRNH3*, *PPDH1* та *PPDH2* на основі ПЛР-аналізу поліморфізму відповідних генів-кандидатів. Запропоновано ПЛР-тести для швидкого визначення *Vrn*- та *Ppd*-генотипів ячменю.

Методичні рекомендації можуть застосовуватися в генетико-селекційних дослідженнях для науково-практичних цілей при скринінгу сортів ячменю та оцінки селекційного матеріалу щодо визначення *Vrn*- та *Ppd*-генотипів.

Розглянуто і затверджено до друку вченою радою Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннезнавства та сортовивчення (протокол № 8 від 6 листопада 2020 р.)

Автори:

Бальвінська М. С., провідний науковий співробітник відділу загальної та молекулярної генетики СГІ—НЦНС, кандидат біол. наук;

Файт В. І., заступник директора з наукової роботи, доктор біол. наук, с. н. с., член-кор. НААН

Рецензенти:

Гудзенко В. М., заступник директора з наукової роботи Миронівського інституту пшениці ім. В. М. Ремесла НААН, завідувач лабораторії селекції ячменю, доктор с.-г. наук;

Замбріборщ І. С., завідувачка лабораторії культури тканин СГІ—НЦНС, кандидат біол. наук

Відповідальний за випуск: директор СГІ—НЦНС, член-кор. НААН **Соколов В. М.**

ЗМІСТ

<i>Вступ</i>	4
1. ОПИС МЕТОДУ	6
2. ЕТАПИ АНАЛІЗУ	7
2.1. Виділення ДНК	7
2.2. ПЛР-ампліфікація	8
2.3. Електрофорез, візуалізація і документування даних	10
3. ОПРАЦЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	10
3.1. Визначення <i>HvVRN1</i> -алелів (гаплотипів)	10
3.2. Детекція алелів <i>Vrn-H2</i> , <i>Vrn-H3</i> , <i>Ppd-H1</i> та <i>Ppd-H2</i>	12
<i>Висновки</i>	14
<i>Список бібліографічних посилань</i>	14

ВСТУП

Ячмінь (*Hordeum vulgare* L.) є одним з найважливіших культурних видів рослин в Україні та загалом у світі. Втрата генетичного різноманіття багатьох сільськогосподарських рослин, зокрема ячменю, призводить до того, що вони стають дедалі сприйнятливішими до різних екологічних стресів. Одним з найважливіших аспектів створення продуктивних генотипів ячменю, стійких до несприятливих умов вирощування, негативних та високих позитивних температур, посухи, грибних фітопатогенів, є підвищення адаптивності рослин методом контролю тривалості перебігу окремих етапів органогенезу та оптимальних темпів розвитку.

В ячменю, як і в інших злакових культур, системи генів *Ppd* та *Vrn* беруть головну участь у контролі адаптивних реакцій рослинного організму до навколишнього середовища. За рахунок контролю тривалості й темпів початкових етапів органогенезу алелі зазначених генів здійснюють вплив на стійкість генотипів до морозу та комплексу інших несприятливих факторів зимівлі [17; 31] і на рівень формування окремих складових урожаю. Вивчення алельного стану генів яровизації та фотоперіоду є додатковим необхідним етапом для добору генотипів, стійких до несприятливих умов вирощування, і створення вихідного матеріалу в селекційних програмах [17].

Більшість генів, що залежать від дії низької температури, розташовані в хромосомі 5Н ячменю, в якій і знаходяться головний QTL зимостійкості, включає локус *Vrn-H1* (раніше *Sh2*) [26]. Відомо, що деякі з цих генів, локалізованих в 5НL хромосомі ячменю, знаходяться у зоні локусу морозостійкості *Fr* та генів чутливості до яровизації, зокрема *Vrn-H1*, що входять до QTL зимостійкості [17; 18]. Показано, що експресія *Vrn-H1* швидко активується після впливу коротких періодів низьких температур і вважається залученою до холодового акліматизаційного шляху, що призводить до підвищення морозостійкості [22; 27; 29]. У сортів ячменю чутливість до яровизації контролюється також генами *Vrn-2H* і *Vrn-3H*, які локалізовані в хромосомах 4Н і 7Н відповідно [15; 20; 24], і прямо чи опосередковано впливають один на одного та на *Vrn-H1* [21; 22; 25]. Крім того, важливу роль у доборі необхідного генетичного матеріалу ячменю відіграє рівень фотоперіодичної чутливості, що визначається локусами *Ppd-H* і *Ppd-H2*, які знаходяться в хромосомах 2Н і 1Н відповідно [11; 19; 30]. Домінантні *Ppd*-алелі сприяють скороченню тривалості

періоду до колосіння, зниженню зимостійкості та морозостійкості [5; 28].

Діод маркування локусів, пов'язаних з яровизацією та фотоперіодом, головними генами-кандидатами в ячменю визначено гени *HvBM5A*, *HvZCCT*, *HvFT*, *HvPRR* [7; 13; 16; 31; 32].

Пропонується ідентифікація генотипів ячменю за різноманіттям алелів *Vrn-H1* (*Vrn-H1*-гаплотипів), яке зумовлене наявністю мутацій (в більшості делецій) в інtronі I *HvBM5A* (*Vrn-H1*) поблизу так званого «vernalization critical region». Вважається, що кожен алель має певну адаптивну цінність. Серед виявленого різноманіття алелів на генетичному матеріалі різного походження алель дикого типу *HvVRN1* (за класифікацією Hemming at al., 2009 [9; 13]) або гаплотип 1A (за Cockerham at al., 2009 [8]) детектований переважно в озимих сортах, але зустрічається й у ярих, хоча й зі значно меншою частотою. Алелі *HvVRN1-6* та *HvVRN1-4* (гаплотипи 5C та 5B відповідно) в більшості випадків виявлені у ярих, але також поширені й серед озимих. Інші *HvVRN*-алелі притаманні виключно ярим генотипам. Більш розповсюдженими з них у зародковій плазмі ячменю різного походження, зокрема європейського, є алелі *HvVRN1-1* — *HvVRN1-3*, *HvVRN1-5*, *HvVRN1-7*. Алельні варіанти *HvVRN1-8* — *HvVRN1-10* виявлені лише у генотипів ячменю, що вирощують у регіонах з тропічним та субтропічним кліматом, *HvVRN1-11* — у стародавніх сортів з Китаю.

Пропонується визначення генотипів — носіїв домінантних (функціональних) та рецесивних (неактивних) алелів [5; 30] у локусах *Vrn-H2*, *Vrn-H3*, *Ppd-H2* та *Ppd-H1* на основі аналізу поліморфізму генів-кандидатів *HvZCCT*, *HvFT1*, *HvFT3* та *HvPRR* відповідно.

Кластер *HvZCCT* (*ZCCT-H*), який складають три гени *ZCCT-Ha*, *ZCCT-Hb*, *ZCCT-Hc*, виявлений у локусі *Vrn-H2* і, як було досліджено, впливає на яровизаційну потребу рослин ячменю. Показано, що в озимих генотипів спостерігаються всі три гени кластера. Цей варіант структури локусу може розглядатися як «озимий», тобто функціональний алель *Vrn-H2*, в той же час повна відсутність генів кластера *ZCCT-H* зумовлює формування структури локусу «ярого типу» та появу неактивного алелю, який несуть близько 86 % сортів ярого ячменю [10; 14; 22; 25].

Ген-кандидат *HvFT1* (*Vrn-H3*) є гомологом гена *FT* (FLOWERING LOCUS T), що сприяє цвітінню квіткової рослини *Arabidopsis thaliana*. При вирощуванні рослин на довгому дні *Vrn-H3* звичайно пригнічений *Vrn-H2*, але репресія його знімається, коли підвищена експресія

Vrn-H2 знижується підвищенням експресії *Vrn-H1* під час яровизації [2; 6; 20; 28; 32]. Наразі ідентифіковано дуже мало варіацій *Vrn-H3*. Отже, чутливість до яровизації в ячменю в основному визначається взаємодією між генами *Vrn-H2* і *Vrn-H1*, які є найбільш різноманітні. В той же час наявність рецесивного алелю *Vrn-H3* має певне значення при регулюванні транскрипції гена *Vrn-H1* та подальшого процесу розвитку рослин ячменю [7; 12; 13; 21; 23; 25].

Функціональний (домінантний) алель *Ppd-H1* у рослин ячменю зумовлює швидку реакцію на довгий світловий день, як наслідок — раннє колосіння та зниження зимостійкості й морозостійкості, в той час як рецесивний алель, поява якого зумовлена рецесивною мутацією в домені ССТ *HvPRR*, в тих же умовах затримує початок цієї фази, що дозволяє продовжити тривалість періоду до колосіння, наприклад, у озимих сортів, для кліматичних зон з тривалим терміном вегетації. В умовах короткого дня час переходу до колосіння в ячменю контролюється локусом *Ppd-H2*. Генотипи-носії домінантного алеля *Ppd-H2* в таких умовах переходять до колосіння раніше, ніж генотипи з альтернативним алелем [1; 4; 5; 11]. З використанням аналізу поліморфізму генів-кандидатів *HvPRR* та *HvFT3* можуть бути визначенні алелі генів *Ppd-H1* та *Ppd-H2* відповідно.

1. ОПИС МЕТОДУ

Метод заснований на ПЛР-ампліфікації індивідуальних алелів в одному раунді ПЛР з використанням алель-специфічних або ген-специфічних праймерів до відповідних ділянок генів-кандидатів (*HvBM5A*, *HvZCCT*, *HvFT1* та *HvPRR*, *HvFT3*) та одержанні ПЛР-маркерів (певних ПЛР-продуктів) для характеристики генотипів ячменю (*Hordeum vulgare* L.) за визначеними *Vrn*- та *Ppd*-алелями.

Визначення ПЛР-маркерів здійснюється за допомогою швидкої детекції за візуальною оцінкою наявності/відсутності відповідних ПЛР-продуктів певного розміру в аналізованих зразках ДНК ячменю шляхом електрофорезу у 1–1,5 % агарозному гелі.

2. ЕТАПИ АНАЛІЗУ

Матеріалом досліджень можуть слугувати будь-які органи, частини, тканини рослини ячменю на будь-якій стадії онтогенезу, зокрема насіння, паростки, листя, коріння.

2.1. Виділення ДНК

Рослинні зразки ретельно подрібнити з 0,5 мл лізуючого буферного розчину (1,4М NaCl; 20 mM Трилон Б; 100 mM Трис-НСІ рН 8,0; 2 % ЦТАБ) [3]. Гомогенізацію рослинного матеріалу проводити безпосередньо у мікропробірці типу Eppendorf (далі — епендорф), об'ємом 1,5 мл, використовуючи скляну паличку, або у відповідного розміру порцеляновій ступці — порцеляновим товкачем, після чого гомогенат перенести в епендорф об'ємом 1,5 мл. Епендорфи з гомогенатами інкубувати на водяній бані або в твердотільному термостаті протягом 1 год за 60 °С. Лізати відразу після інкубації обробити рівним об'ємом суміші хлороформ-ізоміловий спирт (24:1), ретельно перемішати на вортексі протягом 1 хв до утворення білої емульсії. Центрифугувати протягом 6 хв у мікроцентрифузі (Eppendorf або аналог) за 13000 об./хв для розподілу фаз. Відібрати верхній шар, не зачіпаючи інтерфази, і перенести його у новий епендорф. Додати рівний об'єм ізопропилового спирту, обережно перемішати і залишити на 20 хв за кімнатної температури. Центрифугувати 15 хв за 13000 об./хв. Злити надосадову рідину, осад промити 1 мл розчину етилового спирту з об'ємною часткою 70 %. Центрифугувати протягом 1 хв за 13000 об./хв, спирт злити. Підсушити осад, залишивши епендорфи відкритими за кімнатної температури протягом 15 хв. До осадів додати по 0,1 мл ТЕ-буферу (10 mM Трис-НСІ рН 8,0, 1 mM Трилон Б), який містить РНКазу А з кінцевою концентрацією 1 мкг/мл. Розчини інкубувати на водяній бані або у термостаті протягом 15 хв за 55 °С або 30 хв за 37 °С.

Розчини ДНК зберігати в холодильнику за 4 °С протягом дослідження.

Концентрацію виділеної ДНК визначити на флуорометрі «ТКО 100 Dedicated mini Fluorometer» («Hoefer Scientific Instruments», США) з використанням ТНЕ-буферу (0,01 М Трис-НСІ рН 7,4; 0,2 М NaCl; 0,001 М Трилон Б) у присутності 0,1 мкг/мл флуоресцентного барвника Hoechst 33258 згідно з інструкцією до приладу. Розчини ДНК розбавити ТЕ-буфером до концентрації 10 нг/мкл.

2.2. ПЛР-ампліфікація

Ампліфікацію ДНК проводити методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Реакційна суміш об'ємом 20 мкл для проведення ПЛР-ампліфікації 1 зразка містить: 2,0 мкл ПЛР-буферу для *Taq*-полімерази (50 мМ КСІ, 20 мМ Трис-НСІ, рН 8,4 (25 °С), 2 мМ MgCl₂, 0,01 % Tween-20), 0,5 мкл 10 мМ суміші дНТФ, 0,1 мкМ кожного праймера, 1 од. *Taq*-полімерази, 20 нг ДНК-матриці.

ПЛР-ампліфікацію проводити в епендорфах 0,2 мл на приладі «BioRad» (США) або іншому термоциклері. Для аналізу однієї ділянки ДНК використати два фланкуючих праймери, послідовності яких наведені нижче (табл. 1–3).

Таблиця 1

ПЛР-тести для визначення алелів *HvVRN1* у озимих генотипів

ПЛР-тест	Послідовності (5'-3') праймерів	ПЛР-продукт, п.н.	Алель (гаплотип)
1А-5С w/s*	cttgcattgtgttcggtct gctgggacaagactctacgg	830 344	<i>HvVRN1</i> (1А) <i>HvVRN1-6</i> (5С)
5В w/s*	gctccagctgatgaaactcc cttcattggtttgcaagctcc	1552	<i>HvVRN1-4</i> (5В)

Примітка. * — Праймери 1А-5С w/s та 5В w/s можуть використовуватися як окремо, так і разом в одному тесті.

Умови реакції уніфіковані: при використанні однієї пари праймерів: 35 циклів: денатурація — 94 °С, 3 хв (початкова), далі 50 с; відпал — 58 °С протягом 50 с; синтез — 72 °С, 50 с, заключна елонгація — 5 хв при 72 °С. При використанні кількох пар праймерів одночасно в одному тесті: денатурація — 94 °С, 3 хв (початкова), далі денатурація — 94 °С 50 с; відпал — 64 °С протягом 50 с — 34 цикли та 58 °С протягом 50 с — 3 цикли; синтез — 72 °С, 50 с, заключна елонгація — 5 хв при 72 °С.

Для підтвердження проходження ПЛР-ампліфікації у тестах, де передбачена наявність нуль-алелю, може бути застосований «внутрішній контроль». Для цього можна використати праймери до ділянок ДНК ячменю (наприклад, з генів *HvAct* чи *HvSnf2P*), за якими у дослідженого генотипу завжди генерується ПЛР-продукт певного розміру.

Наявність ПЛР-продукту за «внутрішнім контролем» підтверджує успішну ПЛР і свідчить про присутність у зразка ДНК нуль-алеля.

Таблиця 2

ПЛР-тести для визначення алелів *HvVRN1* у ярих генотипів

ПЛР-тест	Послідовності (5'-3') праймерів	ПЛР-продукт, п.н.	Алель (гаплотип)
1А-5С w/s – 1В/s	cttgcattgtgttcggtct gctgggacaagactctacgg tcccaagaaaacttgaacaacaccag attaggttacatcattcgacca	830, 616 344, 574 616 574	<i>HvVRN1</i> (1А) <i>HvVRN1-6</i> (5С) <i>HvVRN1-5</i> (1В) Інші*
2 TE/s	gttctccaccgagtcattggt agagatggaggcatggagca	488	<i>HvVRN1-7</i> (2)**
5В w/s	gctccagctgatgaaactcc cttcattggtttgcaagctcc	1552	<i>HvVRN1-4</i> (5В)
5А/s	gctccagctgatgaaactcc cttcattggtttgcaagctcc	477	<i>HvVRN1-1</i> (5А)
4А/s	ttaaccaaccactgacagcc ctctccgtctcagccac	1181	<i>HvVRN1-3</i> (4А)

Примітки: * — груповий маркер, визначає загалом, але не диференціює *HvVRN1*-алелі (гаплотипи): *HvVRN1-2* (3), *HvVRN1-3* (4А), *HvVRN1-1* (5А), *HvVRN1-4* (5В) у ярих.

** Праймери 2 TE/s можуть використовуватися як окремо, так і разом в одному ПЛР-тесті з 1А-5С w/s*.

Таблиця 3

ПЛР-тести для визначення функціональних та неактивних алелів *Vrn-H2*, *Vrn-H3*, *Ppd-H1*, *Ppd-H2* у генотипів ячменю

ПЛР-тест	Послідовності (5'-3') праймерів	ПЛР-продукт, п.н.	Алель
06F-07R <i>HvZCCTa/b</i>	cctagttaaacaatataccata- gagc gatcgttgctgtaaatagtg	307+273/ — *	<i>HvZCCTa/</i> <i>b+(VRN-H2)/</i> <i>(HvZCCTa/b-</i> <i>(vrn-H2)</i>
FT1.654F/ 1423R	ccattaccacctctcagtc cgctaggacttgagcatct	770 / -	<i>HvFT1(vrn-H3)/</i> <i>HvFT1(VRN-H3)</i>
PP09.1- PRR9.1	ggtttcgccatcaacggc tgta- caatgcacctcgacc	860/ -	ppd-H1/ Ppd-H1
FT3.1F/2R	atccattggtgtgtggctca atctgtcaccacactgcaca	431**	Ppd-H2
FT3.4F/1R	ggatggatcggattattattgtatg ctgcacattattgtgatgcaa	1500	ppd-H2

Примітки: * «—» — відсутність цільового ПЛР-продукту.

** Праймери FT3.1F/2R можуть використовуватися як окремо, так і разом в одному ПЛР-тесті з FT3.4F/1R та 1А-5С w/s*.

2.3. Електрофорез, візуалізація і документування даних

Після закінчення процесу ПЛР-ампліфікації провести електрофорез ПЛР-продуктів у 1–1,5 % агарозному гелі з додаванням розчину інтеркалюючого барвника (етидій бромід або аналог) згідно з анотацією виробника. Для оцінки продуктів ПЛР використати 10 мкл-аліквоту ПЛР-суміші, яку, для контролю за просуванням у гелі ПЛР-фрагментів, змішати з розчином для нанесення зразків в агарозний гель, що містить відповідний барвник — бромфеноловий синій (0,2 % (w/v) або інший доступний аналог).

Для визначення розмірів ПЛР-продуктів застосувати відповідний маркер молекулярної маси (наприклад, 100 bp DNA Ladder, 1 kb DNA Ladder, «Fermentas»).

Електрофорез проводить у 1 x TBE-буфері (89 mM Трис-НСl рН 8,2; 89 mM борна кислота; 2 mM Трилон Б) за постійної напруги 80 В та кімнатної температури протягом 1 год.

Для візуалізації і оцінки результатів розподілу продуктів ампліфікації ДНК в агарозному гелі застосувати УФ-транслюмінатор.

Документування даних — фотографуванням гелів цифровою фотокамерою з використанням УФ-опроміювання.

3. ОПРАЦЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Після електрофорезу на доріжках гелю мають чітко детектуватися фрагменти ДНК відповідного розміру або виявитись відсутність зазначених ампліконів (табл. 1–3). Визначають розміри фрагментів ампліфікації у парах нуклеотидів (п.н.) на підставі візуального порівняння їх із розмірами фрагментів маркера молекулярної маси або з застосуванням відповідних комп'ютерних програм (наприклад, GelAnalyzer2010a).

3.1. Визначення *HvVRN1*-алелів (гаплотипів)

З використанням ПЛР-тесту 1A-5C w/s, який містить праймери до LTR-ділянки інтрону I *HvVM5A*, проведено аналіз ДНК сортів озимого ячменю. За ПЛР-аналізом детектовано ПЛР-продукти 830 та 344 п.н. Це відповідає двом алелям: алелю дикого типу *HvVRN1* та алелю *HvVRN1-6*, які також визначені як гаплотипи 1A та 5C (рис. 1).

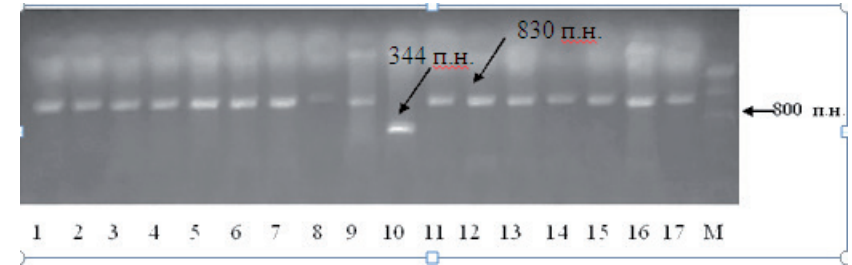


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК з використанням ПЛР-тесту 1A-5C w/s. 1–9, 11–17 — ПЛР-продукт 830 п.н., алель дикого типу *HvVRN1* (гаплотип 1A), 10 — ПЛР-продукт 344 п.н., алель *HvVRN1-6* (гаплотип 5C) — ампліфікована ДНК сорту Каріока: делеція 486 п.н.; М — маркер молекулярної маси 100 bp DNA ladder

ПЛР-продукт 830 п.н. визначає неделітовану LTR-ділянку інтрону I гена *HvVM5A* (*Vrn-HI*) в області («vernalization critical» region), в той час як ПЛР-продукт 344 п.н. свідчить про наявність делеції 486 п.н. в даному регіоні. За ПЛР-аналізом 57 досліджених сортів озимого ячменю, 55 — мали алель дикого типу *HvVRN1* (гаплотип 1A), що складає 96 % від загальної вибірки. У двох озимих сортів французького походження Каріока та Анжеліка виявлено делецію в зоні LTR.

Серед досліджених сортів ярого ячменю виявлено генотипи, які за результатами ПЛР-тестування (ПЛР-тест 5A/s) мали ПЛР-продукт 477 п.н. (рис. 2).

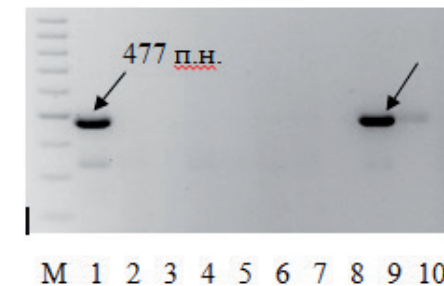


Рис. 2. Електрофореграми ПЛР-продуктів ДНК ярого ячменю за ПЛР-тестом 5A/s. 1–10 — сорти ярого ячменю; М — маркер молекулярної маси DNA ladder 100 bp. Стрілками позначено ПЛР-продукт 477 п.н., який відповідає алелю *HvVRN1-1* (гаплотип 5A)

Одержаний ПЛР-продукт 477 п.н. відповідає поширеному серед європейських ярих сортів алелю *HvVRN1-1* (гаплотип 5A), який був виявлений, зокрема, серед досліджених сортів Gitane (Нідерланди), Chevalier (Британія), Triumph (Німеччина).

Отже, ПЛР-тести зі специфічними праймерами дають можливість визначити алельні відмінності серед генотипів ячменю за локусом *Vrn-H1* та ідентифікувати генотипи — носії певних алелів.

3.2. Детекція алелів *Vrn-H2*, *Vrn-H3*, *Ppd-H1* та *Ppd-H2*

З використанням ПЛР-тесту 06F-07R *HvZCCTa/b*, до якого включена пара праймерів, що охоплюють ділянки двох генів кластера *HvZCCT*, дозволяє ампліфікувати з цих двох генів одночасно два ПЛР-фрагменти: 307 п.н. — за ділянкою *ZCCT-Ha* та 273 п.н. за *ZCCT-Hb* (рис. 3) та відповідає структурі локусу «озимого типу».

Відсутність фрагментів свідчить про наявність у генотипі ячменю структури *Vrn-H2*-локусу «ярого типу» та нефункціонального алеля *VRNH2*.

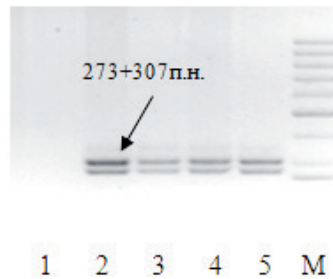


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ПЛР-ампліфікації ДНК сортів ячменю за ПЛР-тестом 06F-07R *HvZCCTa/b*. 1 — ярий сорт Века (відсутність ПЛР-продукту — відповідає структурі *Vrn-H2*-локусу «ярого типу»), 2–5 сорти озимого ячменю зі структурою локусу *Vrn-H2* «озимого типу»; М — маркер молекулярної маси 100 kb DNA ladder. Стрілками позначено ПЛР-продукти 273+307 п.н., що відповідає активному алелю *Vrn-H2* (гаплотип 5A)

Для аналізу алельного стану локусу *Vrn-H3* використано пару специфічних праймерів, що фланкують ділянку ДНК у кінцевій частині промотору *HvFT1*, на межі екзону 1 та інтрону 1. У 17 досліджених сортів виявлений ПЛР-продукт 770 п.н., який свідчить про наявність рецесивного алеля (*Vrn-H3*).

Для визначення *Ppd-H1*-алелів застосований ПЛР-тест з розробленою на основі сиквенсу AY943294.1 (GenBank) парою алель-специфічних праймерів PP09.1 F/ PRR9.1 R (рис. 4 А). Детектований ПЛР-продукт 860 п.н. відповідає наявності рецесивного алеля, який виявлений в електрофоретичному спектрі референтного сорту Века (*ppd-H1*). Відсутність ПЛР-фрагмента 860 п.н. відповідає альтернативному алельному варіанту — *Ppd-H1*.

За результатами ПЛР-аналізу щодо визначення *Ppd-H2*-алелів з ПЛР-тестом FT3-F4/R1, в зразках ампліфікованої ДНК сортів озимого ячменю детектовано ПЛР-продукт 1500 н.п. (рис. 4 Б), що, відповідно до картини електрофоретичного спектру референтного сорту Plaisant (*ppd-H2*), свідчить про наявність в них рецесивного алеля. Відсутність ПЛР-фрагмента 1500 п.н., що виявлено в електрофоретичному спектрі референтного сорту Века (*Ppd-H2*), відповідає наявності домінантного *Ppd-H2*.

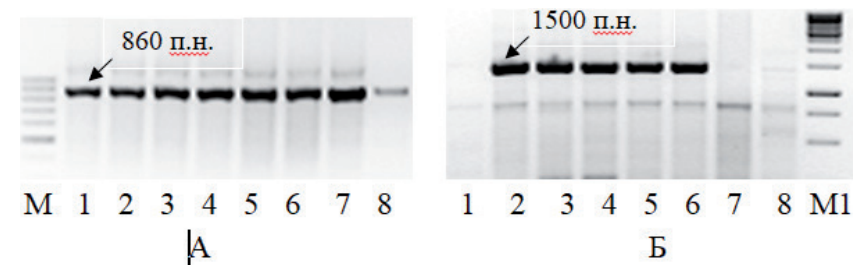


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК сортів ячменю з ПЛР-тестами, що визначають алелі *PPDH1* (А) та *PPDH2* (Б). А — 1 — референтний зразок ампліфікованої ДНК сорту Века (*ppd-H1*), 2–8 — сорти озимого ячменю. М — 100 bp DNA ladder. Б — 1 — Века (*Ppd-H2*), 2 — Plaisant (*ppd-H2*), 3–8 — сорти ячменю; М — маркер молекулярної маси 100 bp DNA ladder, М1 — маркер молекулярної маси 1 kb DNA ladder

ПЛР-тест FT3.4F/1R містить пару алель-специфічних праймерів, з якою детектується ПЛР-продукт 431 п.н., який відповідає алелю, що притаманний референтному сорту Века (*Ppd-H2*), та виявляється в нього ПЛР-аналізом і відсутній у референтного сорту Plaisant (*ppd-H2*) [15], тобто є специфічним щодо виявлення в даному випадку домінантного алеля. ПЛР-продукт 431 п.н., окрім референтного сорту Века (*Ppd-H2*), детектовано у сортів сирійського походження CWB-117-77-97, РОНО, Bulk Hire/ZiGNa 131, Pamir013/Sonata.

Шляхом дуплексної ПЛР-ампліфікації апробовано тестування у сортів озимого ячменю одночасно алелів *Vrn-H1* та *Ppd-H2*.

Можливість ідентифікувати алельні варіанти *Vrn-* та *Ppd-*локусів дозволяє швидко визначати їх в лабораторних умовах.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено систему ПЛР-тестування *Vrn-* та *Ppd-*алелів у генотипів ячменю.
2. Показана можливість використання поліморфізму генів-кандидатів для ідентифікації *Vrn-* та *Ppd-*генотипів, визначення розповсюджених *Vrn-H1*-алелів (гаплотипів), виявлення особливостей структури локусу *Vrn-H2*, детекції алелів *Vrn-H3*, *Ppd-H1* та *Ppd-H2*.
3. ДНК-поліморфізм інтрону I гена *HvVM5A (Vrn-H1)*, виявлений ПЛР-аналізом, дає можливість визначати певні *Vrn-H1*-гаплотипи в озимого та ярого ячменю.

СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ

1. Злотина М. М., Ковалёва О. Н., Лоскутов И. Г., Потокина Е. К. Использование аллель-специфичных маркеров генов *Ppd* и *Vrn* для прогнозирования продолжительности вегетационного периода сортов ячменя. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013. Т. 17, № 1. С. 50–62.
2. Степаненко И. Л., Смирнова О. Г., Титов И. И. Модель генной сети регуляции времени цветения у озимой пшеницы и ячменя. *ВЖТС*. 2012. Том 16, № 1. С. 99–106.
3. Akar T., Francia E., Tondelli A., Rizza F., Stanca A. M., Pecchioni N. Marker-assisted characterization of frost tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Breeding*. 2009. Vol.128. P. 381–386.
4. Casao M. C., Karsai I., Igartua E., Gracia M. P., Casas A., Veisz O. Adaptation of barley to mild winters: A role for *PPDH2*. *BMC Plant Biol*. 2011. Vol. 11. P. 164–176.
5. Casao M. C., Igartua E., Karsai I., Lasa J. M., Gracia M. P., Casas A. M. Expression analysis of vernalization and day-length response genes in barley (*Hordeum vulgare* L.) indicates that *VRNH2* is a repressor

of *PPDH2 (HvFT3)* under long days. *Journal of Experimental Botany*. 2011. Vol. 62, No. 6. P. 1939–1949.

6. Casas A., Djemel A., Ciudad F., Yahiaoui S., Ponce L., Contreras-Moreira B., Gracia M., Lasa J., Igartua E. *HvFT1 (VrnH3)* drives latitudinal adaptation in Spanish barleys. *Theor. Appl. Genet*. 2011. Vol. 112. P. 1293–1304.
7. Cockram J., Chiapparino E., Taylor S., Stamati K., Donini P., Laurie D., O'Sullivan D. Haplotype analysis of vernalization loci in European barley germplasm reveals novel *VRN-H1* alleles and a predominant winter *VRN-H1/VRN-H2* multi-locus haplotype. *Theor. Appl. Genet*. 2007. Vol. 115. P. 993–1001.
8. 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.
9. Cockram J., Horsnell R., Soh E., Norris C., O'Sullivan D. M. Molecular and phenotypic characterization of the alternative seasonal growth habit and flowering time in barley (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* L.). *Mol. Breed*. 2015. Vol. 35. P. 165–175.
10. Dubcovsky J., Chen C. L., Yan L. Molecular characterization of the allelic variation at the *VRN-H2* vernalization locus in barley. *Molecular Breeding*. 2005. Vol. 15. P. 395–407.
11. Faure S., Higgins J., Turner A., Laurie D. The *FLOWERING LOCUS T*-like gene family in barley *Hordeum vulgare*. *Genetics*. 2007. Vol. 176. P. 599–609.
12. Fu D., Szucs P., Yan L., Helguera M., Skinner J. S., Zitzewitz J., 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. Vol. 273. P. 54–65.
13. Hemming M., Fieg S., Peacock W., Dennis E., Trevaskis B. Regions associated with repression of the barley *Hordeum vulgare* L. *VERNALIZATION1* gene are not required for cold induction. *Molecular Genetics and Genomics*. 2009. Vol. 282. P. 107–117.
14. Karsai I., Szücs P., Mészáros K., Filichkina T., Hayes P. M., Skinner J. S., Láng L., Bedő Z. 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. Vol. 110. 1458–1466.
15. Karsai I., Szücs P., Kőszegi B., Hayes P., Casas A., Bedő Z., Veisz O. Effects of photo and thermo cycles on flowering time in barley: a genetical phenomics approach. *J. of Exp. Bot*. 2008. Vol. 59. P. 2707–2715.

16. Kikuchi R., Kawahigashi H., Ando T., Tonooka T., Handa H. Molecular and functional characterization of PEBP genes in barley reveal the diversification of their roles in flowering. *Plant Physiology*. 2009. Vol. 149. P. 1341–1353.
17. Kosova K., Prasil I., Vitamvas P. The relationship between vernalization- and photoperiodically-regulated genes and the development of frost tolerance in wheat and barley. *Biologia Plantarum*. 2008. Vol. 52, N 4. P. 601–615.
18. Limin A., Corey A., Hayes P., Fowler D. Low-temperature acclimation of barley cultivars used as parents in mapping populations: response to photoperiod, vernalization and phenological development. *Planta*. 2007. Vol. 226. P. 139–146.
19. Lister D. L., Bower M. A., Howe C. J., Jones M. K. Latitudinal variation in a photoperiod response gene in European barley: insight into the dynamics of agricultural spread from 'historic' specimens. *Journ. of Arch. Sci.* 2009. Vol. 36. P. 1092–1098.
20. Loscos J., Igartua E., Contreras-Moreira B., Gracia M., Casas A. *HvFT1* polymorphism and effect—survey of barley germplasm and expression analysis. *Front. Plant. Sci.* 2014. Vol. 5, 251. P. 1–15.
21. Mohammadi M., Torkamaneh D., Nikkhah H. Correlation of vernalization loci *VRN-H1* and *VRN-H2* and growth habit in barley germplasm. *International Journal of Plant Genomics*. 2013. P. 1–9.
22. Mulki M., Korff M. CONSTANS Controls floral repression by up-regulating VERNALIZATION2 (*VRN-H2*) in barley. *Plant Physiol.* 2016. Vol. 170(1). P. 325–337.
23. Muterko A., Balashova I., Cockram J., Kalendar R., Sivolap Y. The wheat vernalization response allele *Vrn-D1s* is caused by DNA transposon insertion in the first intron. *Plant Mol Biol Rep.* 2015. Vol. 33. P. 294–303.
24. Nowak M. Identification of *Vrn* genes in barley varieties (*Hordeum vulgare* L.) registered in Poland. *Bulletin of the plant breeding and acclimatization institute*. 2009. № 252. P. 179–185.
25. Szucs P., Skinner J. S., Karsai I., Cuesta-Marcos A., Haggard K. G., Corey A. E., Chen T. H., Hayes P. M. Validation of the *VRN-H2/VRN-H1* epistatic model in barley reveals that intron length variation in *VRN-H1* may account for a continuum of vernalization sensitivity. *Mol. Genet. Genomics*. 2007. Vol. 277. P. 249–261.
26. 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.
27. Trevaskis B., Hemming M., Peacock W., Dennis E. *Vrn-H2* responds to day length, whereas *HvVRN1* is regulated by vernalization and developmental status. *Plant Physiology*. 2006. Vol. 140. P. 1397–1405.
28. Trevaskis B., Hemming M., Dennis E., Peacock W. The molecular basis of vernalization-induced flowering in cereals. *Trends Plant Sci.* 2007. Vol. 12. P. 352–357.
29. Trevaskis B. The central role of the VERNALIZATION1 gene in the vernalization response of cereals. *Funct. Plant. Biol.* 2010. Vol. 37. P. 479–487.
30. Turner A., Beales J., Faure S., Dunford R., Laurie D. The pseudo-response regulator *Ppd-H1* provides adaptation to photoperiod in barley. *Science*. 2005. Vol. 310. P. 1031–1034.
31. Wang G., Schmalenbach I., von Korff M., Léon J., Kilian B., Rode J., Pillen K. Association of barley photoperiod and vernalization genes with QTLs for flowering time and agronomic traits in a BC2DH population and a set of wild barley introgression lines. *Theor. Appl. Genet.* 2010. Vol. 120(8). P. 1559–1574.
32. Yan L., Fu D., Li C., Blechl A., Tranquilli G., Bonafede M., Sanchez A., Valarik M., Dubcovsky J. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of FT. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2006. Vol. 103. P. 19581–19586.

Ідентифікація *Vrn*- та *Ppd*-генотипів ячменю (*Hordeum vulgare* L.) за ПЛР-аналізом: методичні рекомендації / авт.: М. С. Бальвінська, В. І. Файт. СГІ –НЦНС. — Одеса : Екологія, 2021. — 20 с.

На основі експериментальних досліджень та аналізу отриманих даних розроблено методику виявлення в ячменю доволі поширених *VRNH1*-алелів (гаплотипів), ідентифікації у генотипів функціональних та неактивних алелів *VRNH2*, *VRNH3*, *PPDH1* та *PPDH2* на основі ПЛР-аналізу поліморфізму відповідних генів-кандидатів. Запропоновано ПЛР-тести для швидкого визначення *Vrn*- та *Ppd*-генотипів ячменю.

Методичні рекомендації можуть застосовуватися в генетико-селекційних дослідженнях для науково-практичних цілей при скринінгу сортів ячменю та оцінки селекційного матеріалу щодо визначення *Vrn*- та *Ppd*-генотипів.

УДК 575.11.113:663.16

Науково-методичне видання

ІДЕНТИФІКАЦІЯ *VRN*- ТА *PPD*- ГЕНОТИПІВ ЯЧМЕНЮ (*HORDEUM VULGARE* L.) ЗА ПЛР-АНАЛІЗОМ

Методичні рекомендації

Автори:
Бальвінська М. С., Файт В. І.

Завідувачка редакції *Т. М. Забанова*
Редактор *В. Я. Крижанівський*

Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 1,16.
Тираж 100 прим. Зам. № 101.

Видавництво і друкарня «Екологія»
65091, м. Одеса, вул. Разумовська, 23/1
Тел.: (0482) 33-07-18, 37-14-25, 7-855-855

e-mail: astro_print@ukr.net; www.astroprint.ua; www.stranichka.in.ua
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК No1873 від 20.07.2004 р.