

УДК 577.2:633.1

ПЦР-АНАЛИЗ ГЕНОВ ФОТОПЕРИОДИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ У СОРТОВ МЯГКОЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ СЕЛЕКЦИИ БЕЛОЦЕРКОВСКОЙ ОПЫТНО-СЕЛЕКЦИОННОЙ СТАНЦИИ

В. М. ФИЛИМОНОВ¹, А. А. БАКУМА¹, Г. А. ЧЕБОТАРЬ¹, Л. А. БУРДЕНЮК-ТАРАСЕВИЧ²,
С. В. ЧЕБОТАРЬ^{1,3}

¹ Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова
Украина, 65082, Одесса, ул. Дворянская, 2

² Белоцерковская опытно-селекционная станция
Украина, 09176, Киевская обл., Белоцерковский р-н, с. Малая Ольшанка, ул. Советская, 1

³ Селекционно-генетический институт —
Национальный центр семеноведения и сортоизучения НААН Украины
Украина, 65036, Одесса, ул. Овидиопольская дорога, 3
e-mail: s.v.chebotar@gmail.com

Цель. Определение аллельного состояния генов чувствительности к фотопериоду *Ppd-1* у 16 сортов мягкой озимой пшеницы селекции Белоцерковской опытно-селекционной станции и детекция гаплотипов по гену *Ppd-D1* согласно принятой классификации. **Методы.** Выделение ДНК, аллель-специфическая и гнездовая ПЦР, электрофорез в агарозных и полиакриламидных гелях, определение достоверности различий по срокам колошения. **Результаты.** Растения сортов Водограй белоцеркивський, Белоцеркивська напівкарлықова, Олесь, Перлина лисостепу, Элэгия, Ясочка, Лыбидь, Царивна, Лисова писня, Романтика, Видрада, Щедра ныва, Чародийка белоцеркивська, Русса, Дриада-1 имеют генотип *Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1a* и относятся к VII гаплотипу по гену *Ppd-D1*. Генотип сорта Лээнда белоцеркивська характеризуется наличием аллелей *Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1b* и относится к IV гаплотипу по гену *Ppd-D1*. Достоверная разница ($P = 0,01$) по срокам колошения обнаружена только между сортами Русса и Лээнда белоцеркивська и составляет 12,4 суток. **Выводы.** Большинство сортов БОСС имеют генотип — *Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1a*, в котором аллель *Ppd-D1a* детерминирует нечувствительность к фотопериоду и способствует более раннему колошению. Только сорт Лээнда белоцеркивська является носителем рецессивного аллеля *Ppd-D1b*, относится к IV гаплотипу и имеет более поздние сроки колошения.

Ключевые слова: Гены *Ppd-A1*, *Ppd-B1*, *Ppd-D1*, озимая пшеница, ПЦР-анализ, фотопериодическая чувствительность.

Введение. Пшеница занимает первое место в мире по количеству занимаемых посевных площадей и является самым культивируемым в мире злаком (FAO, 2014).

Свет является важнейшим для жизни растений фактором окружающей среды. Пшеница произрастает в большом широтном диапазоне, что свидетельствует о широкой адаптации к различным условиям среды и длине светового дня. Такой пластичности благоприятствует в том числе полиморфизм генов фотопериодической чувствительности. Механизм, обуславливающий рост и развитие растений пшеницы в условиях, отличающихся длиной светового дня, относится к важным агрономическим признакам.

Реакция растений на продолжительность светового дня — фотопериодизм — проявляется в ускорении или замедлении развития в зависимости от комплекса климатических условий конкретного региона (Скрипчинский, 1975). Фотопериодизм у мягкой гексаплоидной пшеницы *T. aestivum* L. ($2n = 42$) обусловлен генами *Ppd-1*, расположенными в коротких плечах хромосом второй ортологической группы: *Ppd-A1-2A*, *Ppd-B1-2B*, *Ppd-D1-2D* (Law et al., 1978; McIntosh et al., 2003).

Мягкая пшеница относится к растениям длинного светового дня с ярко выраженной фотопериодической чувствительностью (ФПЧ). Растения, у которых удовлетворена яровизационная потребность, при выращивании в условиях освещенности менее 10 часов, задерживают сроки цветения относительно растений с теми же генотипами, выращиваемыми при продолжительности светового дня 14 часов (Beales et al., 2007).

Дикий тип — растения пшеницы носители рецессивного аллеля *b* характеризуются выраженной чувствительностью к изменению продолжительности дня, которая наиболее сильно проявляется у носителей всех трёх рецессивных аллелей.

Современным сортам пшеницы, выращиваемым на юге Украины, присуще наличие доминантного аллеля *a* гена *Ppd-D1*, определяющего снижение чувствительности к фотопериоду. Вклад генов в снижение чувствительности к фотопериоду у растений пшеницы мягкой озимой неравнозначен и возрастает от *Ppd-A1*, *Ppd-B1* к *Ppd-D1*, и наиболее сильно проявляется у растений с аллелем *Ppd-D1a*.

Растениям-носителям одного или нескольких доминантных аллелей генов *Ppd* присущи более ранние сроки колошения и созревания, что благоприятно сказывается при выращивании в степных и лесостепных регионах Украины, позволяя избегать засухи и высоких температур при наливе зерна и эпифитотий бурой и стеблевой ржавчины (Федорова, 2004). В тоже время растения носители рецессивных аллелей и имеющие высокую яровизационную потребность являются наиболее приспособленными к суровым зимним условиям (Prasil et al., 2005; Мокану et al., 2008), однако продуктивность их снижена ввиду более медленного развития весной (Бакума и др., 2016).

Выраженность фотопериодической чувствительности (ФПЧ) различна у культивируемых сортов пшеницы мягкой озимой. Сорта варьируют по уровню ФПЧ от сильно чувствительных до абсолютно нечувствительных, способных к колошению даже в условиях 8-часового дня (Worland et al., 1994).

Изучение генотипов культивируемых сортов необходимо в работе селекционеров для получения современных высоко-адаптивных и продуктивных сортов пшеницы. Ввиду важности, данный признак является объектом интенсивных исследований аллельного разнообразия генов *Ppd*, представленных в генофонде *T. aestivum* L.

Целью данной работы была идентификация аллельного состояния генов фотопериодической чувствительности у сортов мягкой озимой пшеницы селекции Белоцерковской опытно-селекционной станции (БОСС), определение гаплотипов по гену *Ppd-D1* и сравнение полученных результатов с данными полевых наблюдений.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили 16 сортов мягкой озимой пшеницы селекции БОСС: Водограй билоцеркивський (2014), Билоцеркивська напівкарлықова (1999), Олесья (2001), Перлына лисостепу (2001), Элэгия (2003), Ясочка (2006), Лыбидь (2006), Царивна (2008), Лисова писня (2009), Романтика (2009), Видрада (2010), Щедра ныва (2011), Чародийка билоцеркивська (2011), Русса, Дриада-1, Лэгэнда билоцеркивська (2017) (Каталог сортов БОСС, 2017).

Для определения аллельного состояния генов системы *Ppd-1* использовали праймеры, представленные в таблице 1.

Таблица 1. Нуклеотидная последовательность праймеров к генам *Ppd-D1*, *Ppd-B1*, *Ppd-A1* и размеры ожидаемых продуктов амплификации

Праймер	Аллель	Нуклеотидная последовательность праймеров	Размер продуктов амплификации, п. н.
<i>Ppd-D1-F</i> <i>Ppd-D1-R1</i>	<i>Ppd-D1b</i> *	5'-ACGCCTCACTACACTG-3' 5'-GTTGGTTCACAGAGAGC-3'	414
<i>Ppd-D1-F</i> <i>Ppd-D1-R2</i>	<i>Ppd-D1a</i> *	5'-ACGCCTCACTACACTG-3' 5'-CACTGGTGGTAGCTGAGAT-3'	288 2 377
<i>Ppd-B1-F1</i> <i>Ppd-B1-R1</i>	<i>Ppd-B1b</i> ** <i>Ppd-B1a</i>	5'-ACACTAGGGCTGGTTCGAAGA-3' 5'-CCGAGCCAGTGCATAAC-3'	1 292 1 600
<i>Ppd-A1-F1</i> <i>Ppd-A1-R2</i>	<i>Ppd-A1b</i> **	5'-CGTACTCTCGTTCT-3' 5'-GTTGGGGTTCGTTGGTGGTG-3'	299
<i>Ppd-A1-F1</i> <i>Ppd-A1-R3</i>	<i>Ppd-A1a</i> **	5'-CGTACTCTCGTTCT-3' 5'-AATACGGGGACATACC-3'	338

Примечания: * — праймеры разработаны Beales et al. [2007], ** — праймеры разработаны Nishida et al. [2013].

Также изучали наличие полиморфизмов в структуре гена *Ppd-D1*, праймеры приведены в таблице 2.

Таблица 2. Нуклеотидная последовательность праймеров к мутациям внутри гена *Ppd-D1* и размеры ожидаемых продуктов амплификации

Аллель	Мутация	Нуклеотидная последовательность праймеров	Размер продуктов амплификации, п.н.
<i>Ppd-P3</i>	16 п.н. инсерция в 8 экзоне	5'-GATGAACATGAAACGGG-3' 5'-GTCTAAATAGTAGGTAAGG-3	320 или 336
<i>Ppd-P4</i>	ТЭ в интроне 1	5'-AGGTCCTTACTCATACTCAATCTCA-3' 5'-CTCCCATTTGTTGGTGTGTTA-3	2612
<i>Ppd-P5</i>	отсутствие делеции 2 т.п.н. и ТЭ инсерции в интроне 1	5'-CCATTTCGAGGAGACGATTCAT-3' 5'-CTGAGAAAGAACAGAGTCAA-3	1005
<i>Ppd-P6</i>	5 п.н. делеция в 7 экзоне	5'-GAATGGCTTCTCCTGGTC-3' 5'-GATGGGCGAAACCTTATT-3'	1032 или 1027
<i>Ppd-P7</i>	5 п.н. делеция в 7 экзоне	5'-GTGTCCTTTGCGAATCCTT-3' 5'-TTGGAGCCTTGCTTCATCT-3'	184 или 179

Фракционирование продуктов амплификации проводилось методами горизонтального электрофореза в 2 % агарозном геле и вертикального электрофореза в 7 % ПААГ. Размер фрагментов определяли с помощью программы GelAnalyzer (2010) относительно маркеров молекулярного веса *pUC19/Msp I* и *GeneRuler DNA Ladder Mix*.

Достоверность различий по срокам колошения за три года определяли по наименьшей существенной разности (НСР).

Результаты и их обсуждение

При проведении ПЦР с аллель-специфическими праймерами к гену *Ppd-A1*, были получены фрагменты размером 299 п.н. (рис. 1) у всех 16 сортов. Согласно данным литературы (Wilhelm et al., 2009; Nishida et al., 2013), наличие фрагмента 299 п.н. свидетельствует об отсутствии делеции в области промотора, что соответствует рецессивному состоянию аллеля гена *Ppd-A1*.

При проведении ПЦР с аллель-специфическими праймерами к гену *Ppd-B1* у всех сортов получены одинаковые фрагменты размером 1292 п.н. (рис. 2). Согласно исследованиям Секи и соавторов (Seki et al., 2011), такой размер продуктов амплификации характерен для сортов с рецессивным аллелем *b* гена *Ppd-B1*.

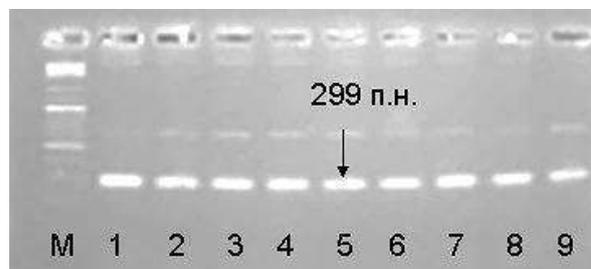


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации в 2 % агарозном геле, полученных с помощью ПЦР с ДНК сортов пшеницы и аллель-специфическими праймерами к аллелю *Ppd-A1b*: 1 — Водограй билоцеркивський, 2 — Билоцеркивська напівкарлыккова 3 — Олесь, 4 — Перлына лисостепу, 5 — Элэгия, 6 — Ясочка, 7 — Лыбидь, 8 — Царивна, 9 — Лисова пiсня, М — маркер молекулярной массы *GeneRuler DNA Ladder Mix*.

Рецессивное состояние аллеля *Ppd-B1b* определяется однокопийным геном с отсутствием мутаций (Beales et al., 2007; Diaz et al., 2012). Синтез белка у сортов-носителей аллелей дикого типа является циркадно-зависимым, с пиком транскрипционной активности через 3–6 часов после рассвета и последующим снижением экспрессии до минимального уровня в темное время суток. Доминантные аллели, напротив, характеризуются высокой экспрессией на протяжении всего дня с пиком транскрипционной активности в темное время суток и на рассвете (Beales et al., 2007; Wilhelm et al., 2009).

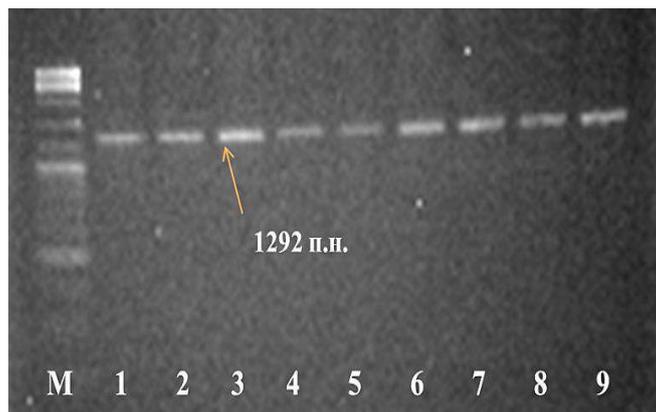


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации в 2 % агарозном геле, полученных с помощью ПЦР с ДНК сортов пшеницы и аллель-специфическими праймерами к аллелю *Ppd-B1b*: 1 — Водограй билоцеркивський, 2 — Билоцеркивська напівкарлькова, 3 — Олесь, 4 — Перлина лисостепу, 5 — Элэгия, 6 — Ясочка, 7 — Лыбидь, 8 — Царивна, 9 — Лисова писня, М — маркер молекулярной массы *GeneRuler DNA Ladder Mix*.

При проведении ПЦР с праймерами для определения аллельного состояния гена *Ppd-D1* в 15 сортах пшеницы, были получены фрагменты размером 288 п.н. (рис. 3). Это свиде-

тельствует о наличии мутации перед кодирующей областью гена — делеции размером 2089 п. н., которая характерна для *Ppd-D1a* аллеля.

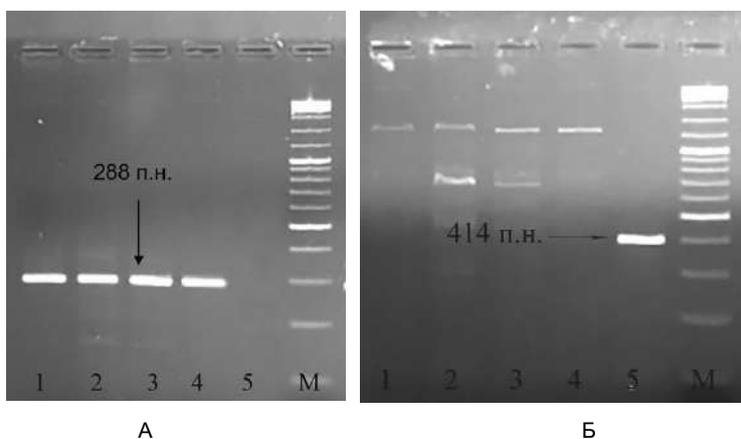


Рис. 3. Электрофорез в 2 % агарозном геле продуктов амплификации ДНК сортов пшеницы с аллель-специфическими праймерами к аллелю *Ppd-D1a* (А): 1 — Билоцеркивська напівкарлькова, 2 — Видрада, 3 — Русса, 4 — Дриада-1, и *Ppd-D1b* (Б): 5 — Лэганда билоцеркивська, М — маркер молекулярной массы *GeneRuler DNA Ladder Mix*.

Растения моногенно доминантные по гену *Ppd-D1a* нечувствительны к фотопериоду. Beales et al. (2007) считают, что это происходит из-за делеции 2089 п.н. в регуляторной части гена, что сказывается на его транскрипции. Ранее предполагалось, что экспрессия блокирована, но позже выяснилось, что экспрессия все же осуществляется, возможно с альтернативного промотора, и продукты экспрессии накапливаются, однако пики максимальной их концентрации меняются — происходит смеще-

ние на полупериод (Тоцький та ін., 2012). Белки-PRR накапливаются в течение всего дня и ночи. Максимальная концентрация наблюдается в конце темного периода суток, а в начале светового дня высокая концентрация PRR-белков индуцирует экспрессию гена *FT*. Его продукты достигают пика концентрации в середине дня, а затем концентрация постепенно снижается (Тоцький та ін., 2012). При этом концентрация PRR-белков возрастает, достигая

максимума в конце темновой фазы и замыкает цикл (Beales et al., 2007).

Согласно данным полевых наблюдений, все сорта кроме сорта Лэгэнда билоцеркивська, относят к ранним и средне-ранним. Размер продукта амплификации, полученного при проведении ПЦР с ДНК, выделенной из растений сорта Лэгэнда билоцеркивська, составил 414 п.н., что соответствует рецессивному аллелю *b* гена *Ppd-D1*. Растения с интактным геном *Ppd-D1* синтезируют PRR белки с собственного промотора гена *FT*, следствием этого является четкая регуляция экспрессии этого локуса, а растения характеризуются чувствительностью к фотопериоду (Beales et al., 2007).

Сорт Лэгэнда билоцеркивська относится к среднепоздним сортам и среди всех исследованных сортов имеет наиболее поздние сроки цветения по данным наблюдений за 3 года.

Продуктами генов *Ppd-1*, в том числе *Ppd-D1*, являются белки, индуцирующие локус *Vrn3*, который контролирует время цветения. Вместе с тем наличие инсерции транспозона в интроне 1 (гаплотип III или аллель *Ppd-D1c*) или делеции 5 п.н. в экзоне 7 гена (гаплотип IV или аллель *Ppd-D1d*) приводит к синтезу нефункциональных белков (Guo et al., 2010).

Также с помощью ПЦР-анализа с использованием праймеров, разработанных (Guo et al., 2010), анализировали наличие полиморфизмов нуклеотидных последовательностей гена *Ppd-D1* и определяли гаплотипы сортов по данному гену. Положение описанных мутаций в структуре гена *Ppd-D1* представлено на рис. 4.

При проведении ПЦР с праймерами *Ppd-P3*, были получены продукты амплификации размером 320 п. н. (рис. 5), что свидетельствует о делеции 16 п.н. в восьмом экзоне.

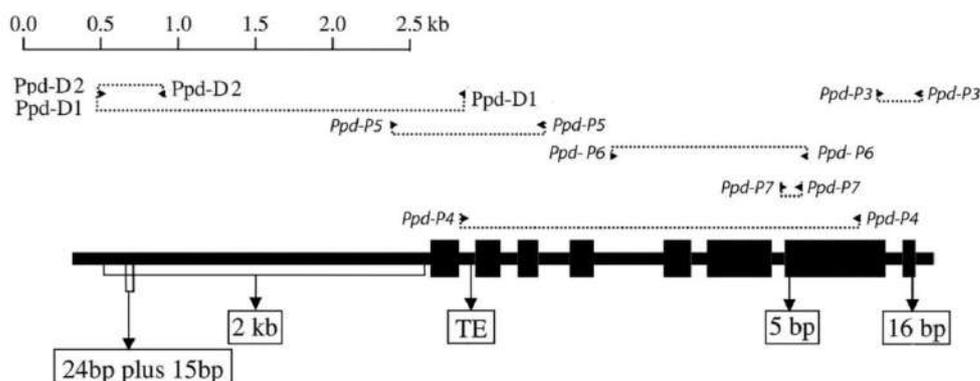


Рис. 4. Схематическая структура гена *Ppd-D1* (цит по Guo et al., 2010). Высокие прямоугольники представляют кодирующие регионы, низкие прямоугольники представляют интроны, 5'НТР и 3'НТР регионы. Вставки и делеции обозначаются соответственно + и -.

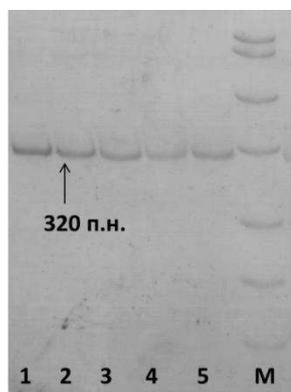


Рис. 5. Электрофорез продуктов амплификации в 7% ПААГ ДНК сортов пшеницы и праймерами *Ppd-P3* к гену *Ppd-D1*: 1 — Билоцеркивська напикварлыкова, 2 — Видрада, 3 — Русса, 4 — Дриада-1, 5 — Лэгэнда билоцеркивська, М — маркер молекулярной массы *pUC19/Msp I*.

Праймеры *Ppd-P4* и *Ppd-P5* созданы для обнаружения транспозонного элемента (ТЭ) в первом интроне гена *Ppd-D1*. Если в интроне 1 гена *Ppd-D1* нет ТЭ, в результате ПЦР с праймерами *Ppd-P4* образуется фрагмент размером 2612 п.н., при наличии ТЭ продукты амплификации не наблюдаются. В нашем исследовании у всех сортов кроме сорта Лэгэнда билоцеркивська не было получено продуктов амплификации. Однако, если регион перед кодирующей областью гена является интактным (нет делеции размером 2089 п.н. перед кодирующим регионом, в нашем исследовании характерно только для сорта Лэгэнда билоцеркивська) и ТЭ отсутствует, то с праймерами *Ppd-P5* можно детектировать фрагмент размером 1005 п.н. Фрагмент размером 1005 п.н. детектирован только у сорта Лэгэнда билоцеркивська (рис. 6),

что свидетельствует об отсутствии транспозонного элемента у этого сорта. В качестве контроля прохождения реакции был использован сорт Зимоярка селекции Мироновского институ-

та пшениц имени В. М. Ремесла, у которого ранее был детектирован продукт амплификации с праймером к аллелю *Ppd-P5*.

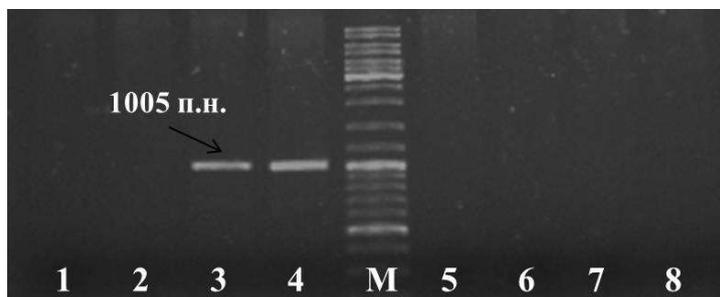


Рис. 6. Электрофорез в 2 % агарозном геле продуктов амплификации ДНК сортов пшеницы с аллель-специфическими праймерами *Ppd-P5* к гену *Ppd-D1*: 1 — Водограй билоцеркивський, 2 — Билоцеркивська напівкарлықова, 3 — Лэгэнда билоцеркивська, 4 — Зимоярка (положительный контроль), 5 — Перлына лисостэпу, 6 — Элэгия, 7 — Ясочка, 8 — Лыбидь, М — маркер молекулярной массы *GeneRuler DNA Ladder Mix*.

В результате проведения ПЦР с праймером *Ppd-P6* были получены продукты амплификации размером около 1000 п.н. (рис. 7). Полученные фрагменты были использованы в качестве матрицы для следующего раунда ПЦР с праймерами *Ppd-P7*.

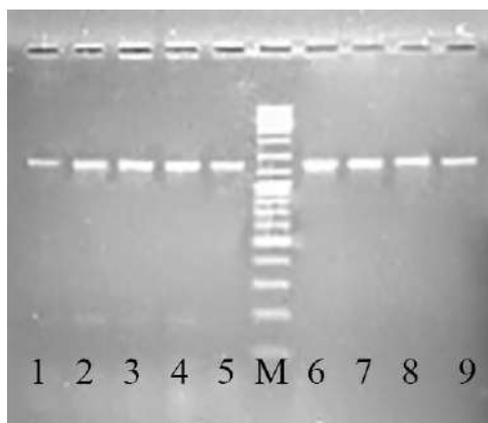


Рис. 7. Электрофорез в 2 % агарозном геле продуктов амплификации ДНК сортов пшеницы с праймерами *Ppd-P6* к аллелю *Ppd-D1*: 1 — Водограй билоцеркивський, 2 — Билоцеркивська напівкарлықова, 3 — Олэся, 4 — Перлына лисостэпу, 5 — Элэгия, 6 — Ясочка, 7 — Лыбидь, 8 — Царивна, 9 — Лисова писня, 10 — Романтика, 11 — Видрада, 12 — Щедра ныва, 13 — Чародийка билоцеркивська, М — маркер молекулярной массы *GeneRuler DNA Ladder Mix*.

В результате, у всех сортов кроме сорта Лэгэнда билоцеркивська обнаруживали продукты амплификации размером — 184 п.н., что свидетельствует об отсутствии делеции размером 5 п.н. в 7 экзоне гена *Ppd-D1*. У сорта Лэгэ-

нда билоцеркивська с праймером *Ppd-P7* амплифицирован фрагмент размером 179 п.н. (рис. 8). Присутствие такого фрагмента свидетельствует о наличии делеции 5 п.н. в седьмом экзоне кодирующей части гена *Ppd-D1*.

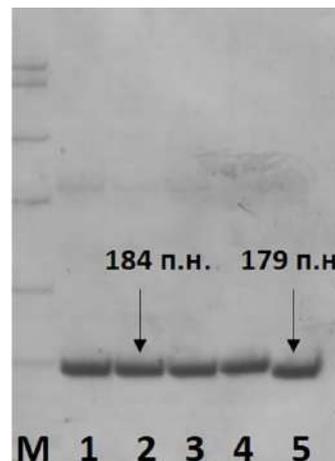


Рис. 8. Электрофорез в 7 % ПААГ продуктов амплификации ДНК сортов пшеницы с праймерами *Ppd-P7*: 1 — Билоцеркивська напівкарлықова, 2 — Видрада, 3 — Русса, 4 — Дриада-1, 5 — Лэгэнда билоцеркивська, М — маркер молекулярной массы *pUC19/Msp I*.

Таким образом, на основе данных ПЦР-анализа сорта, исследованные в работе, были отнесены к гаплотипам, выделенным и описанным Guo et al. (2010) и Chen et al. (2013). 15 сортов мягкой озимой пшеницы селекции БОСС, были отнесены к VII гаплотипу по гену *Ppd-D1* (табл. 3), для которого характерно на-

личие ТЭ и отсутствие делеции 5 п.н. в 7 экзоне, отсутствие 16 п.н. в 8 экзоне, и делеция 2089 п.н. перед кодирующим регионом. Этот гаплотип был ранее обнаружен среди сортов мягкой пшеницы китайской селекции (Chen et

al., 2013). Для сорта Лэгэнда билоцеркивська характерно отсутствие 16 п.н. в 8 экзоне, отсутствие ТЭ инсерции и делеция 5 п.н. в 7 экзоне гена *Ppd-D1*, что позволило отнести данный сорт к IV гаплотипу.

Таблица 3. Гаплотипы гена *Ppd-D1*, идентифицированные у сортов мягкой пшеницы БОСС

Сорта пшеницы	<i>Ppd-D1</i> гаплотип	Мутации в последовательности гена <i>Ppd-D1</i>				
		24 п.н. + 15 п.н.	2 т.п.н.	Инсерция ТЭ	5 п. н. в экзоне 7	16 п. н. в экзоне 8
Лэгэнда билоцеркивська	IV	-	+	-	-	-
15 сортов БОСС	VII	-	-	+	+	-

Примечание: инсерции и делеции обозначены соответственно + и - .

По результатам выращивания исследуемых сортов в течение 3 лет (2015, 2016 и 2017 годы) обнаружены различия ($P = 0,01$) по вре-

мени колошения между наиболее ранним сортом Русса и наиболее поздним — Лэгэнда билоцеркивська (табл. 4).

Таблица 4. Генотипы по генам *Ppd-1* и сроки колошения сортов БОСС

Сорт	Генотип	Время колошения, дни с начала мая
Билоцеркивська напикварликова	<i>Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1a</i>	20,0
Олесья	<i>Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1a</i>	20,0
Перлына лисостэпу	<i>Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1a</i>	24,0
Элэгия	<i>Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1a</i>	25,3
Ясочка	<i>Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1a</i>	23,0
Лыбидь	<i>Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1a</i>	24,3
Царивна	<i>Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1a</i>	22,0
Лисова писня	<i>Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1a</i>	21,7
Романтыка	<i>Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1a</i>	22,0
Видрада	<i>Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1a</i>	23,7
Щедра нива	<i>Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1a</i>	24,0
Чародийка билоцеркивська	<i>Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1a</i>	24,3
Водограй билоцеркивський	<i>Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1a</i>	25,0
Русса	<i>Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1a</i>	15,3
Дриада-1	<i>Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1a</i>	20,0
Лэгэнда билоцеркивська	<i>Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1b</i>	27,7
НСР _{0,01}		11,0

Статистические отличия по времени колошения были достоверными ($P = 0,01$) только для двух указанных сортов. Все остальные исследованные в работе сорта достоверно друг от друга не отличались.

Генотип *Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1a* по данным исследователей (Бакума и др., 2016; Чеботарь и др., 2017) наиболее распространен среди украинских сортов мягкой озимой пшеницы. Такая комбинация аллелей выявлена у 13 сор-

тов озимой пшеницы селекции Полтавской государственной аграрной академии (Чеботарь и др., 2017), 10 из 14 сортов Мироновского института пшеницы имени В. М. Ремесла (Бакума и др., 2016). Из 16 исследованных сортов Белоцерковской опытно-селекционной станции 15 относятся к VII гаплотипу, который тоже наиболее часто встречается среди украинских сортов

В сортах мягких озимых пшениц отечественной селекции достаточно редко встречается

полиморфизм по копияности гена *Ppd-B1* (Файт и др., 2014) Ген *Ppd-B1a* обнаруживается в некоторых эндемичных сортах Японии, и пока не был выявлен в других зонах культивирования (Seki et al., 2011)

Возникновение доминантных аллелей *Ppd-A1* у гексаплоидных пшениц связано с мутациями, вызванными несколькими делециями в промоторе на участке, регулирующем транскрипцию в условиях укороченного дня (Wilhelm et al., 2009). По данным исследований Файта и др., (2014) выборки озимых и яровых сортов видов *Triticum aestivum* украинской и российской селекции, доминантный аллель с делецией 303 п.н. в гене *Ppd-A1* выявлен у сортов озимой пшеницы Знахидка одеська, Повага, Никония в сочетании с доминантным аллелем *Ppd-D1a*, у сорта Южная заря идентифицирован генотип *Ppd-A1a Ppd-B1b Ppd-D1b* (Файт и др., 2014)

Выводы

Все исследованные в работе сорта мягкой озимой пшеницы селекции БОСС, являются носителями рецессивных аллелей *Ppd-A1b* и *Ppd-B1b*. По гену *Ppd-D1* все сорта кроме сорта Лэгэнда билоцеркивська, являются носителями доминантного аллеля *a*, а вышеуказанный сорт носитель рецессивного аллеля *b*.

В структуре гена *Ppd-D1*, нами было детектировано три полиморфизма из пяти известных: делеция размером 2089 п.н. перед кодирующим регионом, инсерция ТЭ и делеция 5 п.н. в 7 экзоне. Согласно данным ПЦР-анализа гена *Ppd-D1* растения сорта Водограй билоцеркивський, Билоцеркивська напівкарлықова, Олэся, Перлына лисостэпу, Элэгия, Ясочка, Лыбидь, Царивна, Лисова писня, Романтыка, Видрада, Щедра ныва, Чародийка билоцеркивська, Русса, Дриада-1, соответствовали VII гаплотипу. Сорт Лэгэнда билоцеркивська несёт рецессивный аллель *b* гена *Ppd-D1*, соответственно не имеет делеции перед кодирующим регионом, что позволяет отнести его к IV гаплотипу.

По срокам колошения достоверно ($P = 0,01$) отличались сорта Лэгэнда билоцеркивська и Русса.

Исследование проводилось в рамках государственной темы МОН № 569 «Полиморфизм локусов фотопериодической чувствительности сортов пшеницы и сои, и развития растений от их аллельного состояния, по данным ПЦР-анализа».

Список литературы

1. Бакума А. О., Булавка Н. В., Чеботарь С. В. Генотипы современных миронівських сортов озимой мягкой пшеницы за *Ppd-A1*-, *Ppd-B1*-, *Ppd-D1*-генами, та їх чутливість до фотоперіоду. *Вісник ОНУ. Біологія*. 2016. Т. 21, вип. 1 (38). С. 75–78.
2. Мокану Н. В., Файт В. І. Відмінності ефектів алелю генів *Vrd1* та *Ppd D1* за зимостійкістю і врожаєм в озимій пшениці. *Цитологія і генетика*. 2008. № 6. С. 26–33.
3. Файт В. І., Балашова І. А., Федорова В. Р., Бальвинская М. С. Идентификация генотипов *Ppd-1* сортов мягкой пшеницы методами генетического и STS-ПЦР анализа. *Физиология растений и генетика*. 2014. Т. 46, № 4. С. 325–336.
4. Федорова В. Р. Відмінності ефектів генів фотоперіодичної реакції в озимій м'якій пшениці: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.15 «Генетика» / В. Р. Федорова. Одеса, 2004. 19 с.
5. Чеботарь Г. О., Чеботарь С. В., Топораш М. К., Бакума А. О., Тищенко В. М. Характеристика сортов пшеницы селекции ПДАА за допомогою маркерів до генів, що визначають важливі господарсько-агрономічні ознаки // *Вісник УТГІС*. 2017. Т 15, № 2. С. 188–196.
6. Каталог сортів м'якої пшениці Білоцерківської ДСС 2017. Доступ до електронного ресурсу: <http://bc-selecstation.com.ua/ru/wheat%20cultivar>
7. 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. Vol. 115. P. 721–723. doi: 10.1007/s00122-007-0603-4.
8. Тоцький В. М., Дьяченко Л. Ф., Мутерко О. Ф., Балашова І. А., Топтіков В. А. Генетична детермінація та функція RRбілків — регуляторів фотоперіодичних реакцій і циркадних ритмів у рослин. *Цитологія і генетика*. 2012. Том 46, № 5. С. 72–91.
9. Chen F., Gao M., Zhang J. et al. Molecular characterization of vernalization and response genes in bread wheat from the Yellow and Huai Valley of China. *BMC Plant Biol.* 2013. Vol. 13. P. 199. — Доступ до інтернет ресурсу: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-199>.
10. Díaz A., Zikhali M., Turner A. et al. Copy number variation affecting the *Photoperiod-B1* and *Vernalization-A1* genes is associated with altered flowering time in wheat (*Triticum aestivum*) *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 3. P. e33234. doi.org/10.1371/journal.pone.0033234.
11. Guo Z., Song Y., Zhou R., Ren Z., Jia J. Discovery, evaluation and distribution of haplotypes of the wheat *Ppd-D1* gene. *New Phytol.* 2010. Vol. 185, № 3. P. 841–851. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.03099.x.

12. Law C.N., Sutka J., Worland A. J. A genetic study of day-length response in wheat. *Heredity*. 1978. Vol. 41, № 2. P. 185–191.
 13. McIntosh R. A., Yamazaki Y., Devos K. M. et al. Catalogue of gene symbols for wheat. *Proc. 10th Inter. Wheat Genet. Symp.* Paestum (Italy). 2003. <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/top/top.jsp>.
 14. 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. *Molecular Breeding*. 2013. Vol. 31, № 1. P. 27–37. doi: 10.1007/s11032-012-9765-0.
 15. Prasil I. T., Prasilova P., Pankova K. The relationship between vernalization requirement and frost tolerance in substitution lines of wheat. *Biologia plantarum*. 2005. № 49 (2). P. 95–200.
 16. Seki M., Chono M., Matsunaka H., Fujita M., Oda S., Kubo K., Kiribuchi Otobe C., Kojima H., Nishida H., Kato K. Distribution of photoperiod-insensitive alleles *Ppd-B1a* and *Ppd-D1a* and their effect on heading time in Japanese wheat cultivars. *Breeding Sci.* 2011. Vol. 61. P. 405–412. doi: 10.1270/jsbbs.61.405.
 17. Wilhelm E. P., Turner A. S., Laurie D. A. Photoperiod insensitive *Ppd-A1a* mutations in tetraploid wheat (*Triticum durum* Desf.). *Theoretical and Applied Genetics*. 2009. Vol. 118. P. 285–294. doi: 10.1007/s00122-008-0898-9
 18. Worland A. J., Appendino M., Sayers E. The distribution, in European winter wheats, of genes that influence ecoclimatic adaptability whilst determining photoperiodic insensitivity and plant height. *Euphytica*. 1994. Vol. 80, № 3. P. 219–228.
- References**
1. Bakuma A. O., Bulavka N. V., Chebotar S. V. The genotypes of modern myronivsky varieties of winter wheat for *Ppd-A1*, *Ppd-B1*, *Ppd-D1* genes and their sensitivity to photoperiod. *Bulletin of ONU. Biology*. 2016. Vol. 21, 1(38). P. 75–78.
 2. Mokanu N. V., Fait V. I. Differences in the effects of alleles of the genes *Vrd1* and *Ppd-D1* with respect to winter hardiness, frost tolerance and yield in winter wheat. *Cytology and genetics*. 2008, Vol. 42, No. 6. P. 28–35.
 3. Fayt V. I., Balashova I. A., Fedorova V. R., Balinskaja M. S. Identification of genotypes *Ppd-1* varieties of wheat genetic methods and STS-PCR analysis. *Plant Physiology and Genetics*. 2014. Vol. 46, No. 4. P. 325–336.
 4. Fedorova V. R. Differences between the effects of genes of the photoperiodic reaction in soft winter wheat: author. dis. for the Sciences. the degree candidate. Biol. Sciences: special. 03.00.15 «Genetics». Odessa, 2004. 19 p.
 5. Chebotar G. O., Chebotar S. V., Toporash M. K., Bakuma A. O., Tytschenko V. M. Characteristics of wheat varieties of Poltava State Agrarian Academy breeding with gene markers that determine important agronomical traits *Visnik ukrains'kogo tovaristva genetikiv i selekcioneriv*. 2017. V 15, № 2. P. 188–196.
 6. Catalogue of varieties of soft wheat of Belotserkovskaya EBS 2017. Access to the electronic resource: <http://bc-selecstation.com.ua/ru/wheat%20cultivar>.
 7. Totskii V. M., Dyachenko L. F., Muterko O. F., Balashova I. A., Toptikov V. A. Genetic determination and function of RR proteins, regulators of photoperiodic reactions, and circadian rhythms in plants. *Cytol Genet*. 2012. Vol. 46, № 5. P. 319–334. doi: 10.3103/S009545271205009X.
 8. Beales J., Turner A., Griffiths S. et al. A Pseudo-Response Regulator is misexpressed in the photoperiod intensive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) *Theor. Appl. Genet*. 2007. Vol. 115. P. 721–723. doi: 10.1007/s00122-007-0603-4.
 9. Chen F., Gao M., Zhang J. et al. Molecular characterization of vernalization and response genes in bread wheat from the Yellow and Huai Valley of China. *BMC Plant Biol*. 2013. Vol. 13. P. 199. — Доступ до інтернет pecyrcy: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-199>.
 10. Díaz A., Zikhali M., Turner A. et al. Copy number variation affecting the *Photoperiod-B1* and *Vernalization-A1* genes is associated with altered flowering time in wheat (*Triticum aestivum*) *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 3. P. e33234. doi.org/10.1371/journal.pone.0033234.
 11. Guo Z., Song Y., Zhou R., Ren Z., Jia J. Discovery, evaluation and distribution of haplotypes of the wheat *Ppd-D1* gene. *New Phytol*. 2010. Vol. 185, № 3. P. 841–851. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03099.x.
 12. Law C. N., Sutka J., Worland A. J. A genetic study of day-length response in wheat. *Heredity*. 1978. Vol. 41, № 2. P. 185–191.
 13. McIntosh R. A., Yamazaki Y., Devos K. M. et al. Catalogue of gene symbols for wheat. *Proc. 10th Inter. Wheat Genet. Symp.* Paestum (Italy). 2003. <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/top/top.jsp>.
 14. 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. *Molecular Breeding*. 2013. Vol. 31, № 1. P. 27–37. doi: 10.1007/s11032-012-9765-0.
 15. Prasil I. T., Prasilova P., Pankova K. The relationship between vernalization requirement and frost tolerance in substitution lines of wheat. *Biologia plantarum*. 2005. № 49 (2). P. 95–200.
 16. Seki M., Chono M., Matsunaka H., Fujita M., Oda S., Kubo K., Kiribuchi Otobe C., Kojima H., Nishida H., Kato K. Distribution of photoperiod-insensitive alleles *Ppd-B1a* and *Ppd-D1a* and their effect on heading time in Japanese wheat cultivars. *Breeding Sci.* 2011. Vol. 61. P. 405–412. doi: 10.1270/jsbbs.61.405.

17. Wilhelm E. P., Turner A. S., Laurie D. A. Photo-period insensitive *Ppd-A1a* mutations in tetraploid wheat (*Triticum durum* Desf.). *Theoretical and Applied Genetics*. 2009. Vol. 118. P 285–294. doi: 10.1007/s00122-008-0898-9.
18. Worland A. J., Appendino M., Sayers E. The distribution, in European winter wheats, of genes that influence ecoclimatic adaptability whilst determining photoperiodic insensitivity and plant height. *Euphytica*. 1994. Vol. 80, № 3. P. 219–228.

Представлено І. О. Андрєєвим
Надійшла 14.12.2018

ПЛР-АНАЛІЗ ГЕНІВ ФОТОПЕРІОДИЧНОЇ ЧУТЛИВОСТІ У СОРТІВ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ СЕЛЕКЦІЇ БІЛОЦЕРКІВСЬКОЇ ДОСЛІДНО-СЕЛЕКЦІЙНОЇ СТАНЦІЇ

В. М. Філімонов¹, А. О. Бакума¹, Г. О. Чеботарь¹,
Л. А. Бурденюк-Тарасевич², С. В. Чеботарь^{1,3}

¹ Одеський національний університет
імені І. І. Мечникова
Україна, 65082, Одеса, вул. Дворянська, 2

² Білоцерківська дослідно-селекційна станція
Україна, 09176, Київська обл., Білоцерківський р-н
с. Мала Вільшанка, вул. Радянська, 1

³ Селекційно-генетичний інститут —
Національний центр насіннезнавства
та сортовивчення НААН України
Україна, 65036, Одеса, вул. Овідіопільська дорога, 3
e-mail: s.v.chebotar@gmail.com

Мета. Визначення алельного стану генів чутливості до фотоперіоду *Ppd-1* у 16 сортів м'якої озимої пшениці селекції Білоцерківської дослідно-селекційної станції і детекція гаплотипів за геном *Ppd-D1*, згідно з прийнятою класифікацією. **Методи.** Виділення ДНК, алель-специфічна і гніздова ПЛР, електрофорез в агарозних і поліакриламідних гелях, визначення достовірності відмінностей за термінами колосіння. **Результати.** Рослини сортів Водограй білоцерківський, Білоцерківська напівкарликова, Олеся, Перлина лісо-степу, Елегія, Ясочка, Либідь, Царівна, Лісова пісня, Романтика, Відрода, Щедра Нива, Чародійка білоцерківська, Русса, Дріада-1 мають генотип *Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1a*, і відносяться до VII гаплотипу за геном *Ppd-D1*. Генотип сорта Легенда білоцерківська характеризується наявністю алелів *Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1b* і відноситься до IV гаплотипу за геном *Ppd-D1*. Достовірна різниця ($P = 0,01$) за термінами колосіння виявлена тільки між сортами Русса і Легенда білоцерківська і становить 12,4 доби. **Висновки.** Більшість сортів БДСС має генотип — *Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1a*, у якому алель *Ppd-D1a* детермінує нечутливість до фотоперіоду і призводить до більш раннього колосіння. Тільки сорт Легенда білоцерків-

ська є носієм рецесивного алеля гена *Ppd-D1b*, відноситься до IV гаплотипу має найбільш пізні строки колосіння.

Ключові слова: гени *Ppd-A1*, *Ppd-B1*, *Ppd-D1*, озима пшениця, ПЛР-аналіз, фотоперіодична чутливість.

PCR-ANALYSIS OF PHOTOPERIODIC SENSITIVITY GENES IN BREAD WHEAT VARIETIES FROM BILATSEKOVSKA EXPERIMENTAL BREEDING STATION

V. M. Filimonov¹, A. A. Bakuma¹, G. A. Chebotar¹,
L. A. Burdenyuk-Tarasevich², S. V. Chebotar^{1,3}

¹ Odesa I. I. Mechnikov National University
Department of Genetics and Molecular Biology
Ukraine, 65082, Odesa, Dvoryanska str, 2

² Bilotsekivs'ka Experimental Breeding Station
Ukraine, 09176, Kiev region, Belotserkovsky district
Malaya Olshanka, st. Sovetskaya, 1

³ Plant Breeding and Genetics Institute —
National Center of Seed and Cultivar Investigation
National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine
Ukraine, 65036, Odesa, Ovidiopolska doroga str., 3
e-mail: s.v.chebotar@gmail.com

The aim. Determination of alleles of the photoperiod sensitivity genes *Ppd-1* in 16 winter wheat varieties of the Bilatserkovska Experimental Breeding Station and identification of the haplotypes of *Ppd-D1* gene according to the accepted classification. **Methods.** DNA isolation, allele-specific and nested PCR, electrophoresis in agarose and polyacrylamide gels, determination of the significant differences in the time of heading. **Results.** Plants of the varieties Vodohrai bilotsekivs'kiy; Bilotsekivs'ka napivkarlykova, Olesia, Perlyna lisostepu, Elehiia, Yasochka, Lybid', Tsarivna, Lisova pisnia, Romantyka, Vidrada, Schedra nyva, Charodiika bilotsekivs'ka, Russa, Driada 1 have the genotype *Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1a* and belong to the VII haplotype of the *Ppd-D1* gene. The genotype of the variety Legenda bilotsekivs'ka is characterized by the presence of the alleles *Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1b* and belongs to the IV haplotype of the *Ppd-D1* gene. The significant differences ($P = 0.01$) in the time of heading was detected only between the varieties Russa and Legenda bilotsekivs'ka and was 12.4 days. **Conclusions.** Most BEBS varieties are characterized by genotype — *Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1a*, in which the allele *Ppd-D1a* determines insensitivity to the photoperiod and leads to early heading. Only variety Legenda bilotsekivs'ka is the carrier of the recessive allele of *Ppd-D1* gene, belongs to the IV haplotype, has the latest time of heading.

Keywords: *Ppd-A1*, *Ppd-B1*, *Ppd-D1* genes, winter wheat, PCR analysis, photoperiod sensitivity.