

УДК 581.1.035.2:526

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОТИПОВ *Ppd-1* СОРТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ МЕТОДАМИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО И STS-ПЦР АНАЛИЗА

В.И. ФАЙТ, И.А. БАЛАШОВА, В.Р. ФЕДОРОВА, М.С. БАЛЬВИНСКАЯ

Селекционно-генетический институт—Национальный центр семеноведения и сортоизучения Национальной академии аграрных наук Украины
65036 Одесса, Овидиопольская дорога, 3
e-mail: faygen@ukr.net

Идентифицированы *Ppd*-генотипы 187 сортов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) методами гибридологического и маркерного анализа, показаны частоты различных *Ppd*-генотипов и аллелей гена *Ppd-D1*. Выявлено преимущественное распространение мутантного *Ppd-D1a* в наборе исследованных сортов озимой пшеницы (77,5—79,6 %). Установлены достоверные различия по частоте встречаемости аллеля *Ppd-D1a* у озимых сортов, что свидетельствует о селекционной или адаптивной ценности данного гена в определенных условиях выращивания.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., фотопериод, гены *Ppd*, генотип.

Многие виды злаков, в том числе мягкая пшеница, реагируют на изменение продолжительности светового дня ускорением или замедлением развития. Степень такой реакции в основном обусловлена влиянием трех генов ортологичной серии *Ppd-1*: *Ppd-A1*, *Ppd-B1* и *Ppd-D1*, локализованных в хромосомах второй гомеологичной группы [19, 23]. Снижение фотопериодической чувствительности обусловлено доминантными аллелями генов *Ppd*, а сильная реакция на фотопериод характерна для генотипов с рецессивными аллелями всех трех генов [3]. Ген *Ppd-D1a* более сильный ингибитор фотопериодической чувствительности, чем *Ppd-B1a* и *Ppd-A1a* [11, 13].

Сведения о *Ppd*-генотипах сортов пшеницы до недавнего времени были весьма ограничены [20, 24, 27], а геногеография генов ортологичной серии *Ppd-1* практически не изучена. Трудоемкость генетических методов анализа, отсутствие генетически идентифицированного исходного материала, специфичность условий проведения исследований (укороченный день, предварительная 60-суточная яровизация) в значительной мере ограничивали возможность массовой идентификации генотипов *Ppd-1* классическими методами. Наиболее сильный ген *Ppd-D1a* получил широкое распространение у сортов пшеницы в период «зеленой революции». Слабая чувствительность к фотопериоду европейских сортов также обусловлена только геном *Ppd-D1a* [14], интродуцированным от японского сорта Акакомуги [26], соответствующий участок хромосомы 2DL которого детектируется у многих современных европейских и украинских сортов по наличию микросателитного локуса *Xgwm261*, сцепленного с геном *Rht8* [22].

В результате исследований, направленных на изучение особенностей структурной организации локусов *Ppd-1*, выявлена делеция в промо-

торе доминантного гена *Ppd-D1*, что способствовало разработке аллель-специфических ПЦР-тестов, предназначенных для идентификации *Ppd-D1a* и *Ppd-D1b* генотипов [12]. Данные ПЦР-маркеры широко используются для определения частот распространения альтернативных аллелей *Ppd-D1* у сортов различных регионов [16—18, 25, 28]. В то же время генфонд мягкой озимой пшеницы Украины практически не идентифицирован по системе генов *Ppd-1* как классическими методами, так и методами ДНК-анализа.

Цель настоящей работы — идентифицировать *Ppd-1* генотипы набора сортов мягкой пшеницы гибридологическим и ДНК-анализом, сопоставить частоты аллелей гена *Ppd-D1* в различных регионах.

Методика

В качестве исходного материала использовали 187 сортов и линий мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. (157 образцов озимого типа развития, 21 — ярового и 9 — двуручки), полный перечень которых представлен в таблицах.

Гибридологический анализ по системе генов *Ppd* проводили по методике [11]. При этом почти изогенную линию Мироновская 808-*Ppd-A1a* использовали в качестве тестера доминантного аллеля *Ppd-A1a*, линию Мироновская 808-*Ppd-B1a* и рекомбинантно-замещенную по 2В хромосоме линию сорта Cappelle Desprez — аллеля *Ppd-B1a*, замещенную линию Avalon^{*6}/Ciano F-67 2D — аллеля *Ppd-D1a*. Озимые сорта пшеницы Мироновская 808, Одесская 16, Ульяновка и Avalon — носители только рецессивных аллелей *Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-1b* — использовали в качестве рецессивного тестера. Для генетического анализа семена популяций F_2 и их родителей проращивали при комнатной температуре в песке, пятисуточные проростки подвергали 60-суточной яровизации при +2 °С и круглосуточном освещении. После окончания яровизации проростки высаживали в оранжерею фитотрона в пятилитровые сосуды по 10 растений на сосуд и выращивали при 12-часовом фотопериоде при температуре 20—23 °С днем и 15—17 °С ночью. Во время вегетации отмечали колошение индивидуальных растений. Разделение F_2 популяций на фенотипические классы рано и поздно колосящихся растений в условиях укороченного дня (12 ч) осуществляли по дате колошения первого растения сорта Мироновская 808 [11]. Статистическую обработку полученных результатов проводили по общепринятым методикам [5].

Экстракцию ДНК из сухого зерна или пятисуточных проростков осуществляли СТАВ-методом [2]. Аллельспецифическую мультиплексную STS-ПЦР проводили согласно рекомендациям Белс и др. [12]. При использовании трех праймеров (одного прямого *Ppd-D1_F* и двух обратных) гибридизация праймеров с комплементарными участками ДНК-матрицы происходила в зависимости от наличия определенного аллеля маркируемого гена. При наличии мутантного аллеля *Ppd-D1a* продуктом реакции был фрагмент ДНК 288 пн. Аллель *Ppd-D1b* (рецессивный) детектируется по наличию маркерного ампликона 414 пн.

| Праймер | Нуклеотидная последовательность праймера | Размер маркерного ампликона, пн |
|--------------------------|--|---------------------------------|
| <i>Ppd-D1_F</i> (прямой) | 5'-ACGCCTCCCACTACACTG-3' | — |
| <i>Ppd-D1_R1</i> | 5'-TGTTGGTTCAAACAGAGAGC-3' | 414 |
| <i>Ppd-D1_R2</i> | 5'-CACTGGTGGTAGCTGAGATT-3' | 288 |

Состав реакционной смеси объемом 20 мкл для проведения STS-анализа: 50 мМ KCl; 20 мМ трис-HCl, pH 9,0; 1,5 мМ MgCl₂; 0,01 % твин-20; 0,15 мМ каждого dNTP; 0,2 мкМ каждого праймера; 10–20 нг ДНК; 1 ед. Taq-полимеразы; 5 пкМ праймера Ppd-D1_F, по 2,5 пкМ праймеров Ppd-D1_R1 и Ppd-D1_R2. Чтобы предотвратить испарение реакционной смеси, добавляли по 20 мкл минерального масла. Для проведения амплификации использовали амплификатор «Терцик» («ДНК-технология», Россия). Продукты амплификации фракционировали в 10 %-м полиакриламидном геле, их визуализацию в ПААГ проводили окрашиванием 0,012 М AgNO₃. Молекулярную массу продуктов амплификации определяли относительно маркеров pUc18/MspI с помощью компьютерной программы Image Master 1D Elite (Amersham Pharmacia Biotech, USA).

Результаты и обсуждение

Сорта мягкой озимой пшеницы Селекционно-генетического института разных периодов создания неоднократно изучались в искусственных условиях по реакции на фотопериод [4, 6, 9]. Для всех сортов, созданных в последние 3–4 десятилетия, характерна слабая фотопериодическая чувствительность [7], что дает основание предположить наличие в их генотипах доминантных аллелей одного или нескольких генов *Ppd-1*. Слабая реакция на сокращение продолжительности дня у предполагаемых моно-, ди- или трехгенных генотипов с аллелями *Ppd-A1a*, и (или) *Ppd-B1a*, и (или) *Ppd-D1a* и сильная реакция на укороченный день у предполагаемых рецессивных генотипов *Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1b* (указан гаплоидный) были положены в основу идентификации генотипов сортов по системе генов *Ppd-1* путем гибридологического анализа [10]. В табл. 1 представлены результаты расщепления на рано и поздно колосящиеся растения F₂ популяций от скрещивания изученных сортов и линий с моногенными тестерами *Ppd-A1a* или *Ppd-B1a*, или *Ppd-D1a*, и рецессивным по данной системе генов тестером (*Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1b*) в условиях укороченного 12-часового дня. Расщепление F₂ популяций от скрещивания изучаемого сорта с рецессивным генотипом *Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1b* в определенном соотношении дало возможность рассчитать количество доминантных генов *Ppd* у тестируемого образца. Отсутствие расщепления (все растения колосились до установленной границы разделения на фенотипические классы) в F₂ комбинации скрещивания с тестерами, в генотипе которых есть только аллель *Ppd-A1a*, или только *Ppd-B1a*, или только *Ppd-D1a*, свидетельствовало об идентичности (аллельности) доминантного гена *Ppd* тестера и сорта; наличие расщепления в соотношениях 3 : 1, 15 : 1, 63 : 1 — о генетических различиях контроля фотопериодической чувствительности данных двух генотипов. На основании фактически полученного расщепления на рано и поздно колосящиеся растения F₂ гибридов в четырех комбинациях скрещивания с тестерами генов *Ppd-1* определяли генотип конкретного сорта. Из-за отсутствия в наборе изогенных линий сорта Мироновская 808 линии с геном *Ppd-D1a*, а в предоставленном нам наборе замещенных и рекомбинантно замещенных линий John Innes Centre — с геном *Ppd-A1a*, в определенные годы часть изучаемых сортов скрещивали не с четырьмя тестерами, а с тремя из каждого набора. В таком случае генотип конкретного сорта определяли, исходя из фактически полученного расщепления на рано и поздно колосящиеся растения F₂ гибридов трех комби-

ТАБЛИЦА 1. Соотношение рано и поздно колосящихся растений F_2 популяций от скрещивания сортов пшеницы с тестерами-носителями разных генов *Ppd-1* при выращивании в условиях 12-часового дня оранжей фитотрона

| Сорт | Рецессив | <i>Ppd-A1a</i> ¹ | <i>Ppd-B1a</i> ¹ | <i>Ppd-D1a</i> ¹ |
|---|----------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Генотип <i>Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1b</i> ² | | | | |
| Альбидум 12 | 6:63 | — | 77:25* | 90:22* |
| Кооператорка | 5:50 | — | 47:10* | 39:13* |
| Мироновская 808 | 4:97 | 31:10* | 53:15* | 79:15* |
| Одесская 3 | 0:39 | — | 36:21 | 50:11* |
| Одесская 16 | 14:144 | 73:28* | 68:17* | 84:18* |
| Омская озимая | 0:38 | 48:16* | 47:14* | — |
| Ульяновка | 0:122 | 48:20* | 101:36* | — |
| Чайка | 18:80 | 45:11* | 45:10* | — |
| Avalon | 4:97 | 69:45 | 68:26* | 77:21* |
| Bovictus | 5:104 | — | 63:27* | 82:26* |
| Herzog | 2:83 | 56:25* | 69:20* | — |
| LD-79 | 0:55 | 29:37 | 32:23 | — |
| Orizon | 5:76 | 73:10 | 82:36* | — |
| Vakka | 10:46 | 42:19* | 35:11* | — |
| Генотип <i>Ppd-A1a Ppd-B1b Ppd-D1b</i> ² | | | | |
| Южная заря | 28:44 | — | 90:7** | 105:6** |
| Floria | 54:20* | 50:0 | 54:5** | — |
| Salmon | 30:12* | 40:0 | 60:4** | — |
| Генотип <i>Ppd-A1b Ppd-B1a Ppd-D1b</i> ² | | | | |
| Донская полуинтенсивная | 51:19* | — | 70:0 | 67:5** |
| Селянка | 64:21* | — | 85:0 | 103:6** |
| Сибирская Нива | 46:19* | 60:7** | 60:0 | — |
| Norin 1 | 37:7* | 51:3** | 60:0 | — |
| Ольвия | 48:12* | 68:5** | 55:0 | 68:11 |
| Генотип <i>Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1a</i> ² | | | | |
| Одесская 162 | 122:45* | — | 113:7** | 160:0 |
| Одесская 265 | 42:14* | — | 81:5** | 40:0 |
| Одесская 266 | 76:16* | 92:5** | 44:3** | — |
| Одесская 267 | 55:18* | 84:20 | 75:6** | — |
| Одесская 268 | 89:37* | 59:17 | 144:14** | 74:0 |
| Одесская красноколосая | 41:15* | 62:13 | 69:6** | — |
| Одесская полукарликовая | 35:10* | 47:4** | 80:8 | 83:0 |
| Одом | 57:15* | 82:9** | 70:9** | 86:0 |
| Пересвет | 36:17* | 31:2** | 74:11 | 66:0 |
| Порада | 47:14* | 81:18 | 63:5** | — |
| Прибой | 37:7* | — | 74:4** | 64:0 |

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОТИПОВ *Ppd-1* СОРТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Продолжение табл. 1

| Сорт | Рецессив | <i>Ppd-A1a</i> ¹ | <i>Ppd-B1a</i> ¹ | <i>Ppd-D1a</i> ¹ |
|-------------------------|----------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Прима одесская | 52:29* | — | 106:6** | 145:0 |
| Прометей | 58:10* | 92:5** | 54:15 | — |
| Сирена одесская | 56:17* | — | 84:5 | 81:0 |
| Скороспелка 3б | 101:27* | 78:7** | 186:9* | 94:0 |
| Спартанка | 54:13* | 51:5** | 75:4** | — |
| Тира | 68:26* | — | 126:7** | 103:0 |
| Федоровка | 44:13* | 60:7** | 72:7** | 44:0 |
| Фрегат | 99:29* | 156:10** | 143:9** | — |
| Хвиля | 49:20* | 65:7** | 108:12** | — |
| Альбатрос одесский | 78:22* | — | 159:9** | 77:0 |
| Аврора | 33:7* | 35:13 | 87:8** | — |
| Безостая 1 | 43:18* | 39:4** | 125:10** | 93:0 |
| Бригантина | 36:13* | 75:9** | 172:13** | 133:0 |
| Бриз | 70:26* | — | 105:10** | 101:0 |
| Буревестник одесский | 79:24* | — | 84:9** | 80:0 |
| Виктория одесская | 98:30* | — | 84:5** | 75:0 |
| Вымпел одесский | 40:17* | 82:6** | 65:5** | — |
| Дальницкая | 69:25* | — | 117:5** | 98:0 |
| Донецкая полукарликовая | 110:32* | — | 76:3** | 78:0 |
| Зирка | 38:15* | 96:8** | 84:7** | 106:0 |
| Злагода | 68:25* | 103:11** | 73:8** | — |
| Золотава | 71:27* | 108:7** | 69:9** | — |
| Исток | 24:10* | 47:4** | 98:12 | — |
| Красуня одесская | 60:21* | — | 80:5** | 85:0 |
| Куяльник | 63:29* | — | 88:10** | 121:0 |
| Лада одесская | 87:18* | — | 98:9** | 71:0 |
| Лан | 48:15* | — | 68:6** | 63:0 |
| Лузановка одесская | 47:12* | — | 72:6** | 84:0 |
| Обрий | 96:30* | 68:3** | 59:7** | 94:0 |
| Одесская 51 | 48:9* | — | 71:5** | 62:0 |
| Одесская 66 | 55:27* | — | 106:12** | 116:0 |
| Одесская 117 | 27:7* | 152:11** | 187:9** | 100:0 |
| Одесская 120 | 92:32* | 128:9** | 134:9** | — |
| Херсонская безостая | 59:20* | 70:7** | 63:15 | 57:0 |
| Червона | 71:26* | 90:14 | 82:8** | — |
| Эритроспермум 127 | 96:34* | 106:13 | 120:7** | — |
| Эритроспермум 604 | 36:17* | — | 83:7** | 52:0 |
| Юбилейная 75 | 36:16* | 51:6** | 82:6** | — |
| Юна | 72:16* | — | 89:9** | 96:0 |
| Юннат одесский | 69:24* | — | 148:10** | 64:0 |

Окончание табл. 1

| Сорт | Рецессив | <i>Ppd-A1a</i> ¹ | <i>Ppd-B1a</i> ¹ | <i>Ppd-D1a</i> ¹ |
|---|----------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Якорь одесский | 60:25* | — | 69:6 | 72:0 |
| Viginta | 56:10* | 29:2** | 52:3** | — |
| Генотип <i>Ppd-A1a Ppd-B1a Ppd-D1b</i> ² | | | | |
| Numbu Komugi | 133:11** | — | 183:0 | 84:2*** |
| Triple Dirk C | 62:3** | 97:0 | 87:0 | 138:3*** |
| Генотип <i>Ppd-A1a Ppd-B1b Ppd-D1a</i> ² | | | | |
| Знахидка одесская | 87:10** | — | 114:2*** | 106:0 |
| И-36266 | 65:3** | — | 104:3*** | 87:0 |
| Никония | 56:7** | — | 123:3*** | 107:0 |
| Повага | 77:9** | — | 117:2*** | 135:0 |
| Генотип <i>Ppd-A1b Ppd-B1a Ppd-D1a</i> ² | | | | |
| Одесская 133 | 131:11** | — | 153:0 | 85:0 |

¹ Указаны только доминантные аллели, присутствующие в генотипе тестера. ² Указан гаплоидный генотип, «—» — комбинацию не изучали; * $\chi^2_{3;1} < 3,84$ при $P = 0,05$ для $df = 1$; ** $\chi^2_{15;1} < 3,84$ при $P = 0,05$ для $df = 1$; *** $\chi^2_{63;1} < 3,84$ при $P = 0,05$ для $df = 1$.

наций скрещивания с тестерами генов *Ppd-1* и трехгенной гипотезы контроля фотопериодической чувствительности [21]. С использованием указанных подходов были идентифицированы *Ppd-1* генотипы 82 сортов и линий мягкой пшеницы. В изученной выборке выявлено семь групп сортов различного *Ppd*-генотипа (см. табл. 1). При этом как в общей выборке сортов (82 образца) мягкой озимой пшеницы различного происхождения (рис. 1), так и выборке сортов СГИ (54 образца из изученных) отмечена высокая частота доминантных только по гену *Ppd-D1* генотипов соответственно 64,6 и 79,6 %. Частоты большинства других *Ppd*-генотипов в общей выборке и в выборке сортов СГИ низкие — от 0 до 7 %. За исключением рецессивного генотипа в обеих выборках, моногенно доминантного по гену *Ppd-B1a* и дигенно доминантного по генам *Ppd-A1a Ppd-D1a* генотипов в общей выборке они недостоверны.

Частота доминантного аллеля *Ppd-D1a* в наборе сортов СГИ составляла $87,0 \pm 4,6$ %, частоты аллелей *Ppd-A1a* и *Ppd-B1a* — соответственно $7,4 \pm 3,6$ и $5,6 \pm 3,1$ %. Такая высокая частота аллеля *Ppd-D1a* в наборе сортов СГИ обусловлена использованием в селекционных программах института по пшенице в 1960—1970 годах нескольких групп слабо реагирующих на изменение продолжительности дня генотипов — доноров различных генов карликовости, что и способствовало широкому распространению гена *Ppd-D1a* в Северном Причерноморье [8]. Первые слабочувствительные к фотопериоду средне- и короткостебельные сорта СГИ (Одесская 51, Одесская полукарликовая и др.) унаследовали аллель *Ppd-D1a* от российского сорта Безостая 1 и его мутанта Карлик 1. Сорт Безостая 1 был донором гена *Ppd-D1a* и в селекционных программах Болгарии [17]. Для сортов Обрий, Зирка, Знахидка одесская и других донором гена *Ppd-D1a* послужили яровые короткостебельные сорта СИММУТ, для сортов Бригантина, Лузановка одесская и других образцов — югославский сорт Zlatna Dolina.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОТИПОВ *Ppd-1* СОРТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

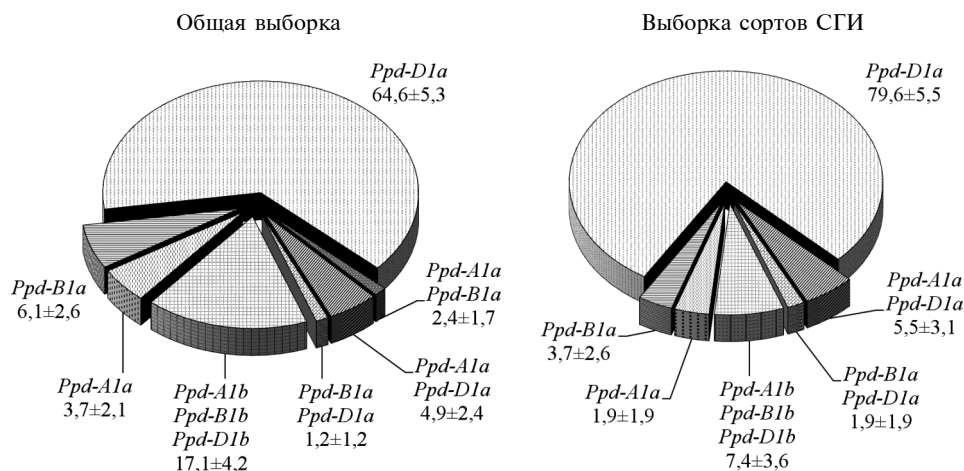


Рис. 1. Частоты различных *Ppd* генотипов в общем наборе и наборах сортов селекции СГИ, % (за исключением рецессивного генотипа указаны только доминантные аллели генов)

Вместе с тем, в силу ряда причин, использование гибридологического анализа неэффективно для идентификации большого набора сортов. Поэтому для продолжения работ по идентификации генофонда вида *Triticum aestivum* L. по генам *Ppd-1* мы использовали маркеры ДНК. Учитывая отсутствие эффективных ПЦР-тестов для идентификации генов *Ppd-B1a* и *Ppd-A1a*, основное внимание было сконцентрировано на ДНК-анализе аллельных различий по гену *Ppd-D1* как охарактеризованных выше озимых сортов и линий, так и не идентифицированных по генам *Ppd* сортов. Всего было проанализировано 173 образца озимого, ярового и интермедиального (двуручки) типов развития. При проведении ДНК-анализа продукт амплификации 288 пн (рис. 2), характерный для мутантного гена *Ppd-D1a*, был выявлен у 122 озимых, яровых и сортов двуручек или у $70,5 \pm 3,5$ % образцов (табл. 2). Маркерный фрагмент 414 пн детектирован у 47 озимых, яровых и сортов двуручек ($27,2 \pm 3,4$ % образцов), что свидетельствует о наличии рецессивного аллеля *Ppd-D1b*. У трех озимых сортов Федоровка, Шестопаковка, Южная заря и яро-

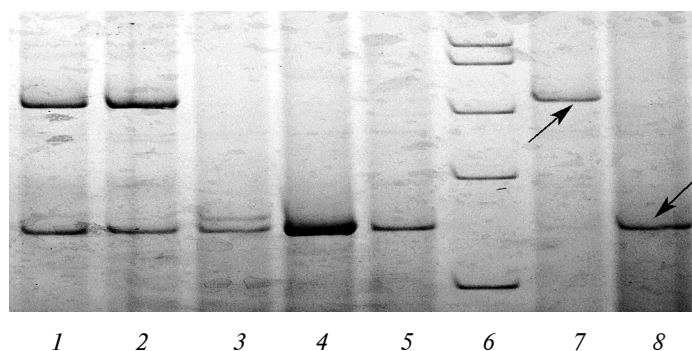


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК сортов мягкой озимой пшеницы с использованием STS-ПЦР-анализа:

1 — Федоровка; 2 — Шестопаковка (неоднородные сорта); 3 — Альбатрос одесский; 4 — Знаходка одесская; 5 — Куяльник; 6 — маркер pUC19/MspI; 7 — Чайка (414 пн; *Ppd-D1b*); 8 — Харьковская 107 (все 288 пн; *Ppd-D1a*); стрелками указаны фрагменты размером 288 и 414 пн

ТАБЛИЦА 2. Генотипы сортов мягкой пшеницы озимого, ярового и интермедияльного (двуручки) типов развития разного географического происхождения, дифференцированные по аллелям локуса *Ppd-D1* с помощью маркерного анализа

| Генотип | Сорт | <i>n</i> | $p \pm S_p, \%$ |
|--------------------------|---|----------|-----------------|
| <i>Ppd-D1a</i> | <p>Озимые: Аврора, Альбатрос одесский, Батько, Безостая 1, Белоснежка, Бригантина, Бриз, Буревестник одесский, Василина, Вдала, Веснянка, Виктория одесская, Вымпел одесский, Дальнишкая, Дарунок, Донецкая полукарликовая, Донская полуинтенсивная, Донской сюрприз, Застава одесская, Зирка, Злагода, Знахидка одесская, Золотава, Иришка, Карлик 1, Киевская остистая, Красуня одесская, Краснодарская 99, Куяльник, Лада одесская, Лан, Леля, Лыбидь, Лузановка одесская, Любава одесская, Лютесценс 7, Лютесценс 606, Нагорода одесская, Никония, Нота, Обрий, Одесская 51, Одесская 66, Одесская 117, Одесская 120, Одесская 162, Одесская 265, Одесская 266, Одесская 267, Одесская красноколосая, Одесская полукарликовая, Одом, Ольвия, Омская 2, Омская 3, Омская 4, Омская 5, Панна, Пересвет, Перлына Лисостепу, Писанка, Победа 50, Повага, Полукарлик 3, Порада, Прима одесская, Прогресс, Прометей, Русса, Свитанок 1, Селянка, Сибирская нива, Символ одесский, Сирена одесская, Скороспелка 36, Спартанка, Станичная, Старшина, Степова, Струмок, Тира, Украинка одесская, Фантазия одесская, Фрегат, Харьковская 11, Харьковская 96, Харьковская 105, Харьковская 106, Харьковская 107, Хвиля, Херсонская безостая, Червона, Эритроспермум 127, Эритроспермум 604, Юбилейная 75, Юна, Юннат одесский, Якорь одесский, Ясочка, Ятрань 60, Danica, Numbu Komugi, Seti, 3Л Mercia/2D Ciano F 67, P3Л Mara 2D</p> <p>Яровые: Комсомольская 3, Beacon, Bob White S, Ciano F 67, Cosoacqua F 75, Frontana, Mexicano-120, Saitama 27, Saric, Sonalika</p> <p>Двуручки: Афина, Зимоярка, Л-897я23, Паллада, Соломия, Яра</p> | 122 | 70,5±3,5 |
| <i>Ppd-D1b</i> | <p>Озимые: Альбидум 12, Альбидум 114, Апогей луганский, Гостианум 237, Зенитка улучшенная, Кооператорка, линия 326, Лютесценс 238, Мильтурум 120, Мироновская 808, ИЛ Мироновская 808-<i>Ppd-A1a</i>, ИЛ Мироновская 808-<i>Ppd-B1a</i>, Одесская 16, Одесская 26, Омская озимая, Ренан, Северная заря, Ульяновка, Феррогинеум 1239, Харьковская 4, Харьковская 20, Харьковская 63, Харьковская 81, Чайка, Avalon, Bandit, Brigand, Capelle-Desprez, Farandole, Mercia, 3Л Mercia/2B Chenese Spring, Triple Dirk C, Vakka, P3Л Capelle-Desprez <i>Ppd-B1a</i></p> <p>Яровые: Альмата, АНК-18А, Волгоуральская, Орхон, Саратовская 29, Тюменская 2, Bledsol, Chinese Spring, Goudveld, Santa Catalina</p> <p>Двуручки: Ласточка, Norin 29, Norin 1</p> | 47 | 27,2±3,4 |
| <i>Ppd-D1a/Ppd-D1b</i> * | <p>Озимые: Федоровка, Шестопаловка, Южная заря</p> <p>Яровые: Red River 68</p> | 4 | 2,3±1,1 |
| Всего | | 173 | 100,0 |

*Сорта состоят из двух генотипов с разными аллелями гена *Ppd-D1* (неоднородные сорта).

вого сорта Red River 68 (2,3±1,1 %) выявлена гетерозиготность по локусу *Ppd-D1*.

В наборе исследуемых 20 яровых сортов (за исключением неоднородного сорта Red River 68) частоты генотипов *Ppd-D1a* и *Ppd-D1b* не отличались и составляли $50,0 \pm 11,2$ %. Яровую пшеницу возделывают, как правило, в северных районах с продолжительным естественным летним днем, который нивелирует различия по эффектам генов фотопериодизма, и генотипы *Ppd-D1a* в таких условиях уже не обладают существенным преимуществом по урожаю зерна. Данный вывод подтвердили Дайк и др. [15], которые показали неперспективность использования в селекции яровой пшеницы в условиях северных широт Америки гена *Ppd-D1a*.

В общем наборе 129 озимых сортов (исключая неоднородные сорта, селекционные, изогенные, замещенные, рекомбинантно замещенные линии и мутанты) частота встречаемости аллеля *Ppd-D1a* ($77,5 \pm 3,7$ %) значительно превышала встречаемость *Ppd-D1b* ($22,5 \pm 3,7$ %). Следовательно, слабая фотопериодическая чувствительность, обусловленная присутствием в генотипе гена *Ppd-D1a*, является одним из необходимых условий для реализации потенциала урожайности озимых сортов, которые чаще всего возделывают в более южных районах с относительно мягкой зимой и укороченным естественным днем.

Превышение частоты генотипа *Ppd-D1a* по сравнению с генотипом *Ppd-D1b* отмечено и в исследованных выборках озимых сортов разных регионов Украины и России (табл. 3) за исключением выборки сортов Востока Украины (Донецк, Луганск, Харьков). В последнем случае частоты генотипов *Ppd-D1a* и *Ppd-D1b* равнялись $50,0 \pm 11,8$ %. При этом следует отметить, что генотип *Ppd-D1b* у исследованного сортимента Севера (Белая Церковь, Киев, Мироновка) и Юга (Одесса) Украины идентифицирован только у сортов, районированных до 1950—1960-х годов. У сортов более позднего периода создания и до настоящего времени идентифицирован генотип *Ppd-D1a*. Достоверные различия частот встречаемости *Ppd-D1a* или *Ppd-D1b* генотипов в выборках сортов различных регионов может указывать на селекционную ценность данных генотипов для конкретных условий выращивания.

Результаты идентификации озимых генотипов по аллелям гена *Ppd-D1* при гибридологическом и ДНК-анализе у большинства изученных образцов совпадали. ДНК-маркер размером 414 пн (*Ppd-D1b*) выявлен у рецессивных по всем трем генам ортологичной серии *Ppd-1* сортов Альбидум 12, Кооператорка, Мироновская 808, Одесская 16, Омская озимая, Ульяновка, Чайка, Avalon, моногенно доминантного по гену *Ppd-B1a* сорта Nojin 1 и дигенно доминантного по генам *Ppd-A1a* *Ppd-B1a* сорта Triple Dirk C, что полностью согласуется с результатами гибридологического анализа. Продукты амплификации размером 288 пн (детектируются у форм с геном *Ppd-D1a*) были выявлены у 52 образцов, в генотипе которых, по данным гибридологического анализа, есть только один аллель *Ppd-D1a* (Аврора, Альбатрос одесский, Безостая 1, Бригантина, Бриз, Буревестник одесский, Виктория одесская, Вымпел одесский, Дальницкая, Донецкая полукарликовая, Зирка, Злагода, Золотава, Красуня одесская, Куяльник, Лада одесская, Лан, Лузановка одесская, Обрий, Одесская 51, Одесская 66, Одесская 117, Одесская 120, Одесская 162, Одесская 265, Одесская 266, Одесская 267, Одесская красноколосая, Одесская полукарликовая, Одом, Пересвет, Порада, Прима одесская, Прометей, Сирена одесская, Скороспелка 3б, Спартанка, Тира, Фрегат, Хвиля, Херсонская безостая, Червона, Эритроспермум 127, Эритроспер-

Таблица 3. Частоты генотипов *Ppd-D1a* и *Ppd-D1b* в общей выборке и выборках сортов озимого типа развития отдельных регионов Украины и России

| Регион | Всего | | <i>Ppd-D1a</i> | | <i>Ppd-D1b</i> | |
|-----------------|----------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | <i>n</i> | $p \pm S_p, \%$ | <i>n</i> | $p \pm S_p, \%$ | <i>n</i> | $p \pm S_p, \%$ |
| Общая выборка | 129 | 100,0 | 100 | 77,5±3,7 | 29 | 22,5±3,7 |
| Восток Украины | 18 | 100,0 | 9 | 50,0±11,8 | 9 | 50,0±11,8 |
| Юг Украины | 64 | 100,0 | 60 | 93,7±3,1 | 4 | 6,3±3,1 |
| Север Украины | 7 | 100,0 | 6 | 85,7±13,2 | 1 | 14,3±13,2 |
| Западная Сибирь | 7 | 100,0 | 5 | 71,4±17,1 | 2 | 28,6±17,1 |
| Северный Кавказ | 15 | 100,0 | 15 | 100,0±5,6 | 0 | 0,0±5,6 |

мум 604, Юбилейная 75, Юна, Юннат одесский, Якорь одесский) или он же в сочетании с геном *Ppd-A1a* (Знахидка одесская, Повага, Никония). Идентичность результатов генетического и ДНК-анализов образцов носителей гена *Ppd-D1a* подтверждает возможность применения маркерного анализа для идентификации *Ppd-D1*-генотипов широкого набора сортов. У двух сортов Южная заря и Федоровка (генотип первого — *Ppd-A1a Ppd-B1b Ppd-D1b*, второго — *Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1a*) выявлено два маркерных фрагмента 288 и 414 пн. Следовательно, каждый из них состоит из двух генотипов (*Ppd-D1a* и *Ppd-D1b*) по аллелям гена *Ppd-D1*, один из которых и идентифицирован при гибридологическом анализе соответствующего сорта.

Вместе с тем фрагменты амплификации ДНК размером 288 пн выявлены у сортов Донская полуинтенсивная, Ольвия, Селянка, Сибирская Нива и Numbu Komugi, у которых ген *Ppd-D1a* отсутствует. Согласно данным генетического анализа, первые четыре являются носителями гена *Ppd-B1a*, а последний — его же в сочетании с *Ppd-A1a*. Детекция ДНК-маркера 288 пн у указанных пяти сортов подтверждает наличие делеции в промоторе гена *Ppd-D1*, следовательно, слабая фотопериодическая чувствительность сортов Донская полуинтенсивная, Ольвия, Селянка, Сибирская Нива, Numbu Komugi обусловлена присутствием в их генотипах аллеля *Ppd-D1a*. Случаи несовпадения результатов идентификации генотипов методами гибридологического и ПЦР анализа отмечены в литературе [1]. Детекция маркерного фрагмента 288 пн подтверждает наличие делеции в промоторе гена *Ppd-D1*, что дало возможность внести коррективы в характеристики *Ppd*-генотипов указанных пяти сортов. Объективность маркерного тестирования, в частности, при использовании генетически идентифицированного материала, позволяет с высокой степенью достоверности оценивать результаты анализа выборки сортов с неизвестными *Ppd-I* генотипами.

Таким образом, в результате идентификации *Ppd*-генотипов методами гибридологического и маркерного ДНК-анализа выявлено преимущественное распространение в наборе сортов озимой пшеницы различных эколого-географических зон доминантного только по гену *Ppd-D1a* генотипа (77,5—79,6 %). За исключением рецессивного по всем трем ге-

нам *Ppd-1* ($17,1 \pm 4,2$ %) генотипа, частоты встречаемости остальных пяти *Ppd*-генотипов очень малы и несущественны. Достоверные различия частот генотипов-носителей генов *Ppd-D1a* и *Ppd-D1b* в наборах сортов различных регионов и их отличие от таковых общего набора свидетельствует о селекционной ценности указанных генотипов для определенных условий.

1. Емцева М., Ефремова Т. Определение генотипов у различных сортов мягкой пшеницы по генам, контролирующим тип развития // Тез. 2-й междунар. школы-конф. молодых ученых «Генетика и селекция растений, основанная на современных генетических знаниях и технологиях» (Москва, 5–10 декабря 2011). — М.: Цифровичок, 2011. — С. 39.
2. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях / Под ред. Ю.М. Сиволапа. — Киев: Аграрна наука, 1998. — С. 34–40.
3. Мережко А.Ф., Кошкин В.А., Матвиенко И.И. Исходный материал для создания серии почти изогенных линий мягкой пшеницы с различной фотопериодической чувствительностью // Генетика. — 1997. — **33**, № 4. — С. 501–511.
4. Мусіч В.М., Пильнєв В.В., Нефїодов О.В., Рабінович С.В. Фотоперіодична чутливість та адаптивність різних сортів озимої пшениці на півдні України // Реалізація потенційних можливостей сортів та гібридів Селекційно-генетичного інституту в умовах України. — Одеса, 1996. — С. 76–83.
5. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. — М.: Колос, 1973. — 327 с.
6. Стельмах А.Ф., Лифенко С.П., Файт В.И., Мокану Н.В. Оцінка генетико-фізіологічних реакцій початкового розвитку сортів озимої м'якої пшениці // Вісн. аграрної науки. — 2007. — № 11. — С. 39–43.
7. Стельмах А.Ф., Файт В.И. Разнообразие генотипов современных сортов озимой мягкой пшеницы по потребности в яровизации и фоточувствительности // Молекул. и прикл. генетика. — 2011. — **12**. — С. 15–18.
8. Файт В.И. Идентифікація і ефекти алелів генів темпів розвитку пшениці: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. — Одеса, 2009. — 39 с.
9. Файт В.И. Морозостійкість і урожайність окремих сортів озимої м'якої пшениці // Вісн. аграрної науки. — 2005. — № 11. — С. 25–29.
10. Файт В.И., Стельмах А.Ф. Идентифікація *Ppd*-генотипів деяких сортів озимої м'якої пшениці // Агроєкологія і біотехнологія. — 1998. — Вип. 2. — С. 189–194.
11. Файт В.И., Федорова В.Р., Балашова И.А., Стельмах А.Ф. Продолжительность периода до колошения и тест на аллелизм *Ppd*-линий различного происхождения // Цитология и генетика. — 2006. — **40**, № 1. — С. 27–36.
12. Beales J., Turner A., Griffiths S. et al. Pseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. — 2007. — **115**. — P. 721–733.
13. Bentley A.R., Horsnell R., Werner C.P. et al. Short, natural, and extended photoperiod response in BC2F4 lines of bread wheat with different Photoperiod-1 (*Ppd-1*) alleles // J. Exp. Bot. — 2013. — **64**(7). — P. 1783–1793.
14. Butterworth K., Reid A., Sayers L., Worland T. A comparison of the pleiotropic effects of photoperiod insensitive genes *Ppd-A1*, *Ppd-B1* and *Ppd-D1* in a Mercia winter wheat background // Annu. Wheat News. — 2001. — **47**. — P. 230–231.
15. Dyck J.A., Matus-Cadiz M.A., Hucl P. et al. Agronomic performance of hard red spring wheat isolines sensitive and insensitive to photoperiod // Crop Sci. — 2004. — **44**. — P. 1976–1981.
16. Eagles H.A., Cane K., Vallance N. The flow of alleles of important photoperiod and vernalisation genes through Australian wheat // Crop Pasture Sci. — 2009. — **60**(7). — P. 646–657.
17. Kovel S., Ganeva G., Christov N. et al. Allele variation in loci for adaptive response and plant height and its effect on grain yield in wheat // Biotechnology & Biotechnological Equipment. — 2010. — **24**(2). — P. 1807–1813.
18. Kumar S., Sharma V., Chaudhary S. et al. 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. — **91**, N 1. — P. 33–47.
19. Law C.N., Sutka J., Worland A.J. A genetic study of day-length response in wheat // Heredity. — 1978. — **41**, N 2. — P. 185–191.
20. Maystenko O.I., Aliev E.B. Chromosomal location of genes responsible for photoperiodic reaction in a non-sensitive spring variety of common wheat Shabati Sonora // Cereal Res. Communic. — 1985. — **13**. — P. 363–369.
21. McIntosh R.A., Devos K.M., Dubcovsky J. et al. Catalogue of gene symbols for wheat // Proceeding of the 11th Intern. wheat genetics symposium. — Brisbane, Qid Australia, 2008 /

- In KOMUGI Integrated wheat Science Database: [http // www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/top](http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/top)
22. *Pestsova E., Roder M.* Microsatellite analysis of wheat chromosome 2D allows the reconstruction of chromosomal inheritance in pedigrees of breeding programmes // *TAG*. — 2002. — **106**, N 1. — P. 84–91.
 23. *Scarth R., Law C.N.* The control of the day-length response in wheat by the genes 2 chromosomes // *Z. Pflanzenzucht*. — 1984. — **92**, N 2. — P. 140–150.
 24. *Scarth R., Law C.N.* The location of the photoperiod gene *Ppd2* and additional genetic factor for ear-emergence time on chromosome 2B of wheat // *Heredity*. — 1983. — **51**, N 3. — P. 607–619.
 25. *Sip V., Chrpova J., Zofajova A. et al.* Effects of specific *Rht* and *Ppd* alleles on agronomic traits in winter wheat cultivars grown in middle Europe // *Euphytica*. — 2010. — **172**, N 2. — P. 221–233.
 26. *Worland A.J., Borner A., Korzun V. et al.* The influence of photoperiod genes on the adaptability of European winter wheats // *Ibid.* — 1998. — **100**, N 1–3. — P. 385–394.
 27. *Worland A.J., Petrovic S., Law C.N.* Genetic analysis of chromosome 2D of wheat II. The importance of this chromosome to Yugoslavian varieties // *Plant Breed.* — 1988. — N 100. — P. 247–259.
 28. *Yang F.P., Zhang X.K., Xia X.C. et al.* Distribution of photoperiod insensitive *Ppd-D1a* allele in chinese wheat cultivars // *Euphytica*. — 2009. — **165**. — P. 445–452.

Получено 24.02.2014

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГЕНОТИПІВ *Ppd-1* СОРТІВ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ МЕТОДАМИ ГЕНЕТИЧНОГО ТА STS-ПЦР АНАЛІЗУ

V.I. Fayt, I.A. Balashova, V.R. Fedorova, M.S. Balvinska

Селекційно-генетичний інститут—Національний центр насіннезнавства та сортовивчення Національної академії аграрних наук України, Одеса

Ідентифіковано *Ppd*-генотипи 187 сортів м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) методами гібридологічного і маркерного аналізу, встановлено частоти різних *Ppd*-генотипів та алелів гена *Ppd-D1*. Виявлено переважне поширення мутантного *Ppd-D1* в наборі досліджених сортів озимої пшениці (77,5–79,6 %). Установлено вірогідні відмінності за частотою трапляння алеля *Ppd-D1a* в озимих сортах, що свідчить про селекційну або адаптивну цінність цього гена в конкретних умовах вирощування.

IDENTIFICATION OF BREAD WHEAT *Ppd*-GENOTYPES BY HYBRIDOLOGICAL AND STS-PCR ANALYSIS

V.I. Fayt, I.A. Balashova, V.R. Fedorova, M.S. Balvinska

Plant Breeding and Genetics Institute—National Center of Seed and Cultivar Investigation, National Academy of Agrarian Sciences
3 Ovidiopol'ska road, Odesa, 65036, Ukraine

The *Ppd*-genotypes of 187 bread wheat varieties were identified by hybridological and marker analysis methods. The frequency of different *Ppd*-genotypes and alleles of *Ppd-D1* was established. The mutant allele *Ppd-D1a* was the most common (77.5–79.6 %) in the set of studied winter wheat varieties. Significant differences in the frequency of allele *Ppd-D1a* in winter varieties was shown. This is the evidence of breeding or adaptive value of *Ppd-D1a* gene for definite growing conditions.

Key words: *Triticum aestivum* L., photoperiod, genes *Ppd*, genotype.