

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

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ АЛЕЛІВ ГЕНА *PPD-A1*  
ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ (*TRITICUM*  
*AESTIVUM* L.) ТА ТВЕРДОЇ  
(*TRITICUM DURUM* DESF.)  
ЗА МОЛЕКУЛЯРНИМИ МАРКЕРАМИ**

Методичні рекомендації

Одеса  
«Екологія»  
2021

Розроблено ДНК-технологію ідентифікації генотипів м'якої та твердої пшениці за наявністю домінантних та рецесивних алелів гена *Ppd-A*, що бере участь у контролі відмінності за фотоперіодичною чутливістю.

Методичні рекомендації можуть бути використані в генетико-селекційних дослідженнях м'якої та твердої пшениці для підвищення ефективності добору вихідного матеріалу.

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

Автори:

**Балашова І. А.**, провідний науковий співробітник відділу загальної та молекулярної генетики СГІ-НЦНС, кандидат біол. наук;

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

Рецензенти:

**Стельмах А. Ф.**, головний науковий співробітник СГІ-НЦНС, доктор біол. наук, проф., академік НААН;

**Паламарчук А. І.**, кандидат с.-г. наук, зав. лабораторії селекції та насінництва твердої пшениці СГІ-НЦНС

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

## ЗМІСТ

<i>Вступ</i> .....	4
1. ОПИС МЕТОДУ .....	6
2. ЕТАПИ АНАЛІЗУ .....	8
2.1. Виділення ДНК з індивідуальних рослин (паростків, насіння, листків) .....	8
2.2. Виконання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) .....	8
2.3. Електрофоретичний розподіл продуктів ампліфікації .....	9
2.4. Візуалізація продуктів ампліфікації .....	9
2.5. Документування отриманих електрофореграм .....	10
3. ОПРАЦЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ .....	10
<i>Висновки</i> .....	14
<i>Список бібліографічних посилань</i> .....	14

## ВСТУП

Одним з головних завдань селекції є створення сортів, оптимально пристосованих до умов вирощування в певних природно-кліматичних зонах. Реакція рослин на низькі позитивні температури (яровизація) та тривалість освітлення (фотоперіодизм) є головними механізмами регуляції процесу онтогенезу та адаптації пшениці до факторів довкілля [1]. Генетичні відмінності за фотоперіодичною чутливістю відіграють важливу роль у визначенні відмінностей за адаптивністю та продуктивністю в багатьох регіонах вирощування пшениці в Європі [2; 3] та Україні [4].

Основні уявлення щодо генетичного контролю чутливості пшениці на скорочення тривалості дня сформувалися у другій половині минулого сторіччя. Зокрема показано неповне домінування слабкої фотоперіодичної чутливості, участь у контролі ознаки трьох генів [5–7], визначено локалізацію *Ppd-1* генів у коротких плечах хромосом 2-ї гомеологічної групи [8], оцінено вплив кожного з домінантних генів на зниження фотоперіодичної чутливості, тривалість періоду від сходів до колосіння та ряд інших біологічних і господарсько цінних ознак [9]. Пізніше, вже у нинішньому столітті, при вивченні особливостей структурної організації генів *Ppd-1* та механізмів регуляції фотоперіодичної реакції виявлено основні причини варіабельності ознаки, що зумовлено, в тому числі, множинним алелізмом значених генів, які віднесено до родини псевдорегуляторів *PRR*, що кодують білки-індуктори локусу цвітіння *TaFT (VRN3)* [10; 11]. На сьогодні за кожним з генів *Ppd-1* виявлено певну кількість чутливих (рецесивних) та нечутливих (домінантних) алелів, виникнення яких зумовлено різними мутаціями їхніх більш древніх форм. Такими мутаціями є делеції (*Ppd-D1*, *Ppd-A1*) або інсерції (*Ppd-B1*) у промоторі, що призводить до кардинальної зміни параметрів експресії, яка при інтактному промоторі триває тільки після світанку і до темної фази [12–14]. Мутації у промоторі знищують або порушують важливий сайт, що бере участь у пригніченні вираження гена у темний період доби, тому за відсутності такого експресія гена триває цілодобово з найбільшою активністю у темний період та на світанку. При наявності у сорту усіх генів фотоперіоду з інтактним промотором (рецесивні алелі) накопичення регуляторного білка обмежено світловим періодом, що в умовах скороченого дня затримує колосіння/цвітіння. І навпаки, присутність одного чи більше домінантних алелів впливає на

зниження чутливості до фотоперіоду і прискорює проходження етапу від сходів до колосіння. Іншим механізмом виникнення домінантних (нечутливих) алелів є *snv*-мутації, що зумовлює збільшення копій функціонального гена, притаманно лише гену *Ppd-B1* [15]. Збільшення накопичення регуляторного білка зумовлено багатокопійністю гена. Множинний алелізм *Ppd-1* стосується не тільки варіабельності домінантних алелів, оскільки мутації виникали також у кодуючій зоні, що у деяких випадках призвело до порушення коду та утворення білків, які мають знижену функціональність, або її втратили наразі порушення важливих білкових доменів. Такі мутації (рецесивні алелі) відомі у генів *Ppd-D1* та *Ppd-A1* [13; 16; 17]. Природний множинний алелізм зумовлює варіабельність *Ppd*-генотипів, що дозволяє створювати сорти, більш пристосовані для вирощування у певних кліматичних умовах. Але створення таких потребує попереднього вивчення актуальності того чи іншого генотипу, що неможливо без визначення носіїв певних алелів та їхніх комбінацій. Нині розроблено велику кількість ПЛР-тестів, використання яких дозволяє визначити *Ppd*-генотипи сортів різного типу розвитку. Завдяки наявності ДНК-маркерів визначено алельний стан генів *Ppd-D1*, *Ppd-B1* багатьох сортів м'якої пшениці, оскільки з такими більшою мірою пов'язують варіабельність за фотоперіодичною чутливістю [18]. Менше уваги приділялось маркуванню гена *Ppd-A1*, оскільки, по-перше, тривалий час домінантний алель цього гена помилково оцінювали за фенотиповим проявом — як слабкіший за інші. По-друге, у пшениці м'якої домінантний алель даного гена не набув значного поширення. Носії гена *Ppd-A1* дуже рідко залучались у селекції, можливо, цьому запобігало широке використання *Ppd-D1a*-генотипів. Але за дослідженнями останніх років виявлено існування чотирьох домінантних алелів *Ppd-A1*, які є результатом делеції у промоторі розміром 1085 п.н., або 1027 п.н., або 1117 п.н., або 680 п.н. [19] Зазначені алелі позначено як *Ppd-A1a.1*, *Ppd-A1a.2*, *Ppd-A1a.3*, *Ppd-A1a.4*, відповідно. Перший з них виявлений у виду *T. aestivum* у 2012 році [15]. Два наступних — кількома роками раніше, вони притаманні генотипам виду *T. durum* [14]. Останній алель детектовано у малопоширеного виду *T. compactum* у 2015 році. Не виключно, що існують й інші варіації домінантного гена *Ppd-A1*. На відміну від пшениці м'якої, у виду *T. durum* домінантні алелі трапляються частіше. Припускається, що більший вплив на зниження фотоперіодичної чутливості справляє алель *Ppd-A1a.2*. За відсутності у тетраплоїдного виду гена *Ppd-D1* саме з домінантним

геном *Ppd-A1* пов'язують основні відмінності за фотоперіодичною реакцією у виду *T. durum*. Разом з тим мутації виникали також у кодуєчій зоні гена *Ppd-A1*. Загалом же у гена *Ppd-A1* ідентифіковано більше ніж 60 гаплотипів, поєднаних у гаплогрупи I та II. Швидше за все, більшість мутацій є нейтральними, однак деякі призводять до порушення генетичного коду, що зумовлює утворення білків, які частково або повністю втрачають свою функцію індукторів локусу цвітіння. До таких відносяться делеція 303 п.н. у екзонах 5, 6 та делеція 2 п.н. у екзоні 7 [20]. Зазначені мутанти позначено нами як алелі *Ppd-A1\_del303* та *Ppd-A1\_del2ex7* відповідно. Слід зазначити, що в екзоні 7 гена *Ppd-D1* також є делеція 5 п.н. — алель *Ppd-D1d*, яка зумовлює утворення нефункціонального білка. Наявність мутантного рецесивного алелю позначається на темпах розвитку, особливо у випадках, коли аналогічні за дією мутації присутні у *Ppd-A1* та *Ppd-D1* пшениці м'якої. Що стосується сортів виду *T. durum*, то за наявності лише двох генів *Ppd-1* втрата функціональності білка *Ppd-A1* також може затримувати колосіння. Дотепер недостатньо інформації щодо поширення у культурних видів пшениці мутантних алелів *Ppd-A1*, що заважає вивченню як ефектів певних алелів за фоточутливістю, так і їхнього впливу на господарські ознаки.

Протягом декількох років за використання ДНК-маркерів визначено алельний стан генів *Ppd-D1* та *Ppd-B1* у багатьох сортів пшениці м'якої, але значно менше інформації щодо генотипів таких за алелями гена *Ppd-A1*. Стосовно алельного стану генів *Ppd-1* сортів пшениці виду *T. durum*, насамперед сортів української селекції, свідчень практично немає.

Методичні рекомендації, по-перше, представляють можливість застосування ПЛР-маркерів для ідентифікації алелів гена *Ppd-A1*, по-друге, враховуючи існуючі дані щодо алельного стану *Ppd-D1* та *Ppd-B1*, надають інформацію щодо *Ppd*-генотипів значної кількості сортів пшениці м'якої озимого та ярого типу розвитку, в тому числі української селекції [21].

## 1. ОПИС МЕТОДУ

Метод дозволяє виявити домінантні алелі *Ppd-A1a.1*, *Ppd-A1a.2*, *Ppd-A1a.3* у пшениці видів *T. aestivum* та *T. durum*, що значно впливають на зниження фоточутливості; рецесивного алеля *Ppd-A1b* і

мутантних рецесивних алелів *Ppd-A1\_del303* та *Ppd-A1\_del2ex7*, що кодують нефункціональні регуляторні протеїни. Для визначення рецесивного та домінантних алелів *Ppd-A1* використовують кілька ПЛР-тестів, розроблених на підставі поліморфізму ДНК промоторної зони гена. По-перше, для маркування гена *Ppd-A1* виду *Tr. durum* запропонована мультиплексна ПЛР, за якої наявність фрагмента ампліфікації 452 п.н. свідчить про інтактний стан промотора (рецесивний стан), фрагменти 380 п.н та 290 п.н. визначають домінантні алелі *Ppd-A1a.2* та *Ppd-A1a.3* відповідно [14]. По-друге, при маркуванні *Ppd-A1* як тетра-, так і гексаплоїдних видів пшениці розроблено ПЛР-тест для визначення тільки рецесивного стану гена, про що свідчить наявність на електрофореграмі також фрагмента 452 п.н. Якщо такий фрагмент відсутній, то використовується інший ПЛР-тест, за яким можна визначити присутність будь-якого з відомих домінантних алелів *Ppd-A1a.1*, *Ppd-A1a.2*, *Ppd-A1a.3*. Маркерами є фрагменти 405 п.н., 463 п.н., 372 п.н. відповідно [19]. Для визначення наявності делеції 303 п.н. в екзонах 5, 6 та делеції 2 п.н. в екзоні 7 гена *Ppd-A1* використано два ПЛР-тести, рекомендовані Takenaka et. al [20]. Наявність алеля, що нами позначено як *Ppd-A1\_del303*, детектує фрагмент 220 п.н., і в даному випадку контролем був сорт Capelle-Desprez, у якого така мутація наявна. На присутність в генотипі алелю *Ppd-A1\_del2ex7* вказує наявність фрагменту ампліфікації 180 п.н.

Маркерні фрагменти визначають при використанні електрофоре-зу продуктів ампліфікації ДНК у 10 % поліакриламідному гелі.

Таблиця 1

Маркерні фрагменти ампліфікації при ідентифікації окремих алелів гена *Ppd-A1*, п.н.

Алель	Маркерні фрагменти ампліфікації (п.н.)			
	ПЛР-тест № 1 (рецесивний стан)	ПЛР-тест № 2 ( <i>T.durum</i> )	ПЛР-тест № 3 ( <i>T.aestivum</i> та <i>T. durum</i> )	ПЛР-тести № 4 та № 5 (рецесивні мутантні алелі)
<i>PpdA1b</i>	452	452		
<i>Ppd-A1a.1</i>			405	
<i>Ppd- A1a.2</i>		380	463	
<i>Ppd- A1a.3</i>		290	372	
<i>Ppd-A1_del303</i>				220
<i>Ppd-A1_del2ex7</i>				180

## 2. ЕТАПИ АНАЛІЗУ

Закінчення табл. 2

### 2.1. Виділення ДНК з індивідуальних рослин (паростків, насіння, листків)

Зразки гомогенізувати в епандорфі з 0,5 мл лізуючого буферу, що містить: 1,4 М NaCl; 20 mM Na<sub>3</sub>EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0 (25 °C); 2 % СТАВ. Інкубація — на водяній бані протягом 1 години при 60 °C. Депротейнізацію проводити рівним об'ємом суміші хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1). Центрифугувати протягом п'яти хвилин у центрифугу Eppendorf 5415 при 12000 об/хв, водяну фазу (не чіпаючи інтерфази) переносити в інший епандорф. ДНК екстрагувати рівним об'ємом ізопропанолу з наступним центрифугуванням протягом п'яти хвилин при 12000 об/хв. Надосадну рідину зливати, осад промити 1 мл 70 % етанолу. Отриманий осад ДНК розчиняти в 500 мкл розчину TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM Na<sub>3</sub>EDTA). Концентрацію ДНК вимірювати на флуориметрі ТКО Hoefler-100 у розчині 1 x TNE (10 mM Tris-HCl pH 7.4 (25 °C); 100 mM NaCl; 1mM Na<sub>3</sub>EDTA) з 100 мкг/мл інтеркалюючого барвника Hoechst 33258.

### 2.2. Виконання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)

В таблиці 2 наведено інформацію щодо послідовності праймерів для ампліфікації маркерних фрагментів ДНК.

Таблиця 2

Праймери для проведення ПЛР-аналізу та маркування генів *Ppd-A1b*, *Ppd-A1\_del303*, *Ppd-A1\_del2ex7*, *Ppd-A1a.1*, *Ppd-A1a.2*, *Ppd-A1a.3*

Ген	Праймер	Послідовність праймерів	Розмір фрагменту, п.н.
<i>Ppd-A1b</i> <i>Ppd-A1a.2</i> <i>Ppd-A1a.3</i>	durum_AglF1	gtatgcgattcgctgaagt	452 п.н.
	durum_AglF2	cgtcacccatgactctgtt	380 п.н.
	durum_AglR2	ctggctccaagaggaaacac	290 п.н. [14]
<i>Ppd-A1a.1</i> <i>Ppd-A1a.2</i> <i>Ppd-A1a.3</i>	Ppd-A1proF	gtatgcgattcgctgaagt	405 п.н. 463 п.н.
	durum_AglR2	cgtcacccatgactctgtt	372 п.н. [14, 19]
<i>Ppd-A1b</i>	durum_Ag5del_F1	gtatgcgattcgctgaagt	452 п.н.
	durum_Ag5del_R2	ctggctccaagaggaaacac	[14]

Ген	Праймер	Послідовність праймерів	Розмір фрагменту, п.н.
<i>Ppd-A1_del2ex7</i>	2 bp_del_F1	gccgcccgtgaacaagttg	170 п.н.
	2 bp_del_R1	ggtaacgcacctgcaaaatgag	[20]
<i>Ppd-A1_del303</i>	303 bp_del_F2	cttaccatctgtgagaagtatctgcatc	220 п.н.
	303 bp_del_R3	cgatcagcagctcgaacaattac	[20]

Реакційний буфер для проведення тестування будь-якого з зазначених алелів методом ПЛР містить: 50 mM KCl; 20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,01 % Tween-20; 0,15 mM кожного dNTP; 5 пМ кожного праймера, 20 нг ДНК і 1 од. Taq-полімерази. Об'єм реакційної суміші — 20 мкл. Ампліфікація: денатурація — 94 °C — 2 хв, далі — 20 с; відпал — 60 °C — 30 с; синтез — 72 °C — 50 с. 35 циклів; остання елонгація — 72 °C — 3 хв.

### 2.3. Електрофоретичний розподіл продуктів ампліфікації

Для тестування продуктів ампліфікації застосовувати 2,0 % агарозні гелі та 10 % ПААГ. Агарозні гелі з ПЛР-продуктами забарвлювати бромистим етидієм і фотографувати в УФ світлі.

Для оцінки продуктів ампліфікації (10 мкл-аліквоту ПЛР-суміші) використовувати 10 % поліакриламідний гель.

Склад гелю: 10 % акриламід, 1 x TBE-буфер (50 mM трис-Н<sub>3</sub>ВО<sub>3</sub>, 2 mM Na<sub>3</sub>EDTA, pH 8.0). Електрофорез проводити при напрузі 500 V протягом 120 хв при 60 °C. Для приготування гелю застосовувати таку суміш: 10 мл розчину 30 % поліакриламід у 3 мл 10 x TBE-буферу, 25 мкл ТМЕД, 50 мкл 10 % ПСА. Кожний зразок ДНК змішувати з 4 мкл 0,2 % (w/v) розчином бромфенолового синього, 0,2 % (w/v) ксиленціанолу, що необхідно для контролю за просуванням фрагментів ДНК в гелі. Для контролю молекулярної ваги ампліфікованих фрагментів використовувати ДНК рUC19, рестриковану MspI, яку наносити в окрему лунку.

### 2.4. Візуалізація продуктів ампліфікації

Фарбування поліакриламідного гелю здійснювати у кілька етапів: обробка гелю у 10 % етанолі протягом 5 хвилин, перенесення гелю у розчин 1 % HNO<sub>3</sub> на 5 хв. з наступним промиванням гелю дисти-

льованою водою. Після промивання гель витримувати 20 хв у розчині 0,012 М AgNO<sub>3</sub> у темряві, промивати кілька разів дистильованою водою та інкубувати гель у розчині (0,28 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (безводний), 0,019 % формалін) до прояви продуктів ампліфікації. Забарвлений гель кілька разів промивати дистильованою водою та витримувати 10 хв. у розчині 10 % CH<sub>3</sub>COOH. Гелі зберігати між двома листами прозорої поліетиленової плівки.

### 2.5. Документування отриманих електрофореграм

Отримані електрофореграми документувати фотографуванням при використанні транслюмінатора.

## 3. ОПРАЦЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Після проведення електрофорезу продукту ПЛР-тесту № 1, розрахованого для визначення рецесивного алеля *Ppd-A1*, на доріжках гелю має чітко детектуватися фрагмент 452 п.н. (рис.1). Відсутність такого свідчить про наявність делеції в промоторі.

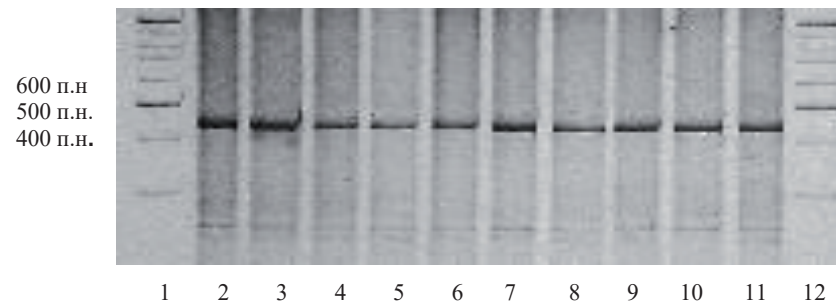


Рис. 1. Маркування рецесивного стану гена *Ppd-A1* в українських сортах пшениці озимої м'якої: 2 — Миронівська 808, 3 — Одеська 16, 4 — Левада, 5 — Обрій, 6 — Бригантіна, 7 — Орійка, 8 — Зелений гай, 9 — Легенда миронівська, 10 — Волошкава, 11 — Ясногірка; 1, 12 — маркер молекулярної ваги Ledder 100

Результатом проведення мультиплексної ПЛР — ПЛР-тест № 2 для виявлення алельного стану *Ppd-A1* виду *T.durum* має бути або фрагмент 452 п.н. — рецесивний стан гена, або фрагмент 380 п.н. чи

фрагмент 290 п.н., що свідчить про присутність домінантних алелів *Ppd-A1a.2* чи *Ppd-A1a.3* відповідно (рис. 2).

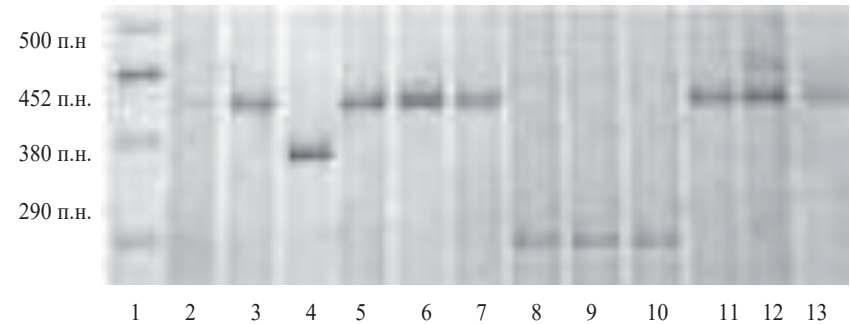


Рис. 2. Електрофореграма продуктів мультиплексної ПЛР, що детектують алелі *Ppd-A1b*, *Ppd-A1a.2*, *Ppd-A1.3* у сортів *T. durum*: 1 — Ledder 1000; 2 — Берекеш, 3 — Харківська 46, 4 — Мерліурі; 5 — Спадщина, 6 — Чадо, 7 — Народна, 8 — Метиска, 9 — Луганська 7, 10 — Кораловий, 11 — Акведук, 12 — Блискучий, 13 — Лінкор

При використуванні ПЛР-тесту № 3, розрахованого для визначення будь-якого з відомих домінантних алелів *Ppd-A1* видів *T.aestivum* та *T. durum*, на доріжках ПАА гелю мають детектуватися фрагменти 405 п.н., 463 п.н., 372 п.н. — алелі *Ppd-A1a.1* — *Tr.aestivum*, *Ppd-A1a.2*, *Ppd-A1.3* — *T. durum* (рис. 3). У вибірці 138 озимих української селекції та 153 ярих сортів м'якої пшениці різного походження за зазначеним ПЛР-тестом виявлено лише продукт 452 п.н. — маркер рецесивного стану гена.

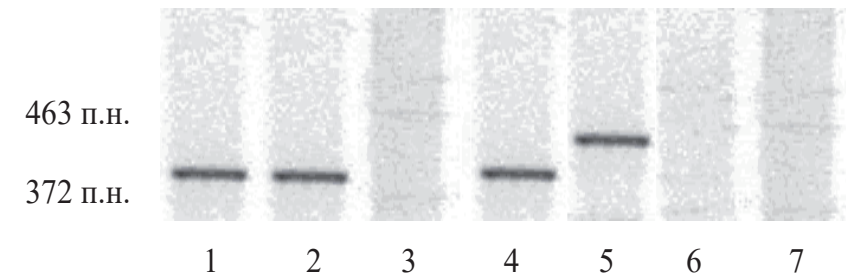


Рис. 3. Електрофореграма продуктів алель-специфічної ПЛР, детектуючих алель *Ppd-A1a.2* у сорта Мерліурі та алель *Ppd-A1.3* у сортів Метиска, Луганська 7, Кораловий

Серед досліджених 50 ярих та 30 озимих сортів пшениці твердої з застосуванням двох ПЛР-тестів алель *Ppd-A1a.3* виявлено у ярих сортів Метиска і Луганська 7 та у озимого сорту Кораловий. Алель *Ppd-A1.2* присутній лише у ярого грузинського сорту Мерліурі (рис. 2, 3).

Оскільки серед досліджуваних сортів відсутні носії алелю *Ppd-A1a.1*, на рис. 3 не представлений маркерний фрагмент 405 п.н., який теж визначається застосуванням ПЛР з праймерами Ppd-A1proF та durum\_Ag5del\_R2A.

Використання ПЛР-тесту для маркування алеля *Ppd-A1\_del303* не виявило такого серед сортів пшениці виду *Tr. durum*. В наборі озимих сортів м'якої пшениці української селекції носіями *Ppd-A1\_del303* є 11 або 15 % сортів (рис. 4). Але у сортів пшениці м'якої ярого типу розвитку зазначений алель виявлено лише у кількох зразків з різних кліматичних зон, серед яких відсутні українські.

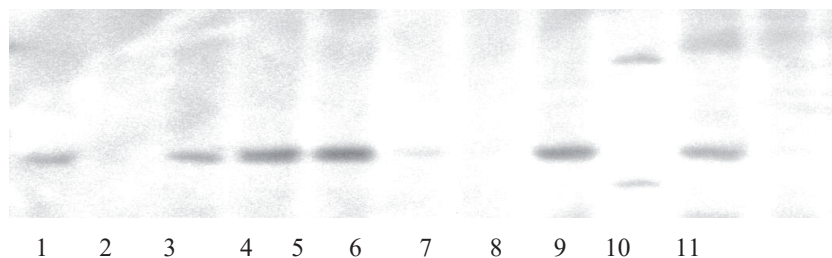


Рис. 4. Маркування алелю *Ppd-A1\_del303* в українських сортах пшениці озимої м'якої: 1 — Capelle-Despez (контроль), 3 — Мільтурум 120, 4 — Експромт, 5 — Веснянка, 6 — Полянка, 8 — Полукарлік 3, 10 — Істина; 2 — Колос мIRONIVСЬКИЙ, 7 — Балада мIRONIVСЬКА, 11 — Обрій; 9 — маркер молекулярної ваги pUC19/MspI

Алель *Ppd-A1\_del2ex7* широко поширений серед сортів твердої пшениці — 57 %, або 46 зразків (рис. 5, табл. 2). Привертає увагу той факт, що у твердої пшениці, фотоперіодичну реакцію якої контролюють лише два гени *Ppd-1*, майже половина сортів має ген *Ppd-A1* з мутацією, яка призводить до втрати функціональності *Ppd*-білка. Зазначений алель не виявлено серед сортів пшениці м'якої озимого типу розвитку, але такий виявлений у кількох ярих сортів даного виду різного походження. Цікаво, що у родоводі сортів м'якої пшениці з виявленим геном *Ppd-A1\_del2ex7* присутній як батьківській, так і пра-батьківській компонент сорту твердої пшениці. Отже, можна ствер-

джувати, що алель *Ppd-A1\_del2ex7* інтродукований в геном м'якої пшениці від твердої пшениці.

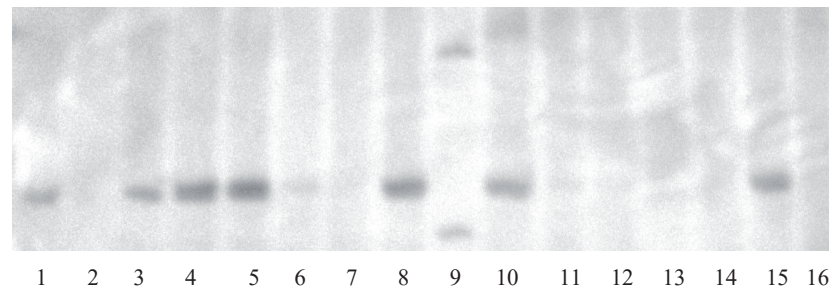


Рис. 5. Маркування алеля *Ppd-A1\_del2ex7* сортів пшениці твердої та м'якої: 1–8 — сорти *T.durum*; 10–16 — сорти *T.aestivum*; 1, 3, 4, 5, 8 — присутність мутантного алеля у сортів Парус, Айсберг, Колективна 2, Харківська 46, Білотурка; 2, 6, 7 — відсутність мутантного алеля у сортів Яскравий, Чадо, Метиска (пшениця тверда); 10, 15 — сорти Сарубра, Opata 85 — присутність мутантного алеля; 11, 12, 13, 14, 16 — відсутність мутантного алеля у сортів Саратовська 29, Полтавка, Сріб'янка, Торчинська, Елегія мIRONIVСЬКА (пшениця м'яка)

Це найкраще можна продемонструвати на прикладі сорту м'якої пшениці Саратовська 46, одним з батьків якого є сорт Сарубра, створений схрещуванням сортів Білотурка (*T. durum*) та Полтавка (*Tr. aestivum*). В родоводі мексиканських сортів м'якої пшениці Opata 85, Nesser одним з пра-батьківських компонентів є сорт твердої пшениці Gaza. Сорт Lumillo, швидше за все, є донором даного мутантного алеля для сортів Ботанічна 2 та Башкирська 8.

Таблиця 3

Алельний стан сортів твердої та м'якої пшениці ярого та озимого типу розвитку за геном *Ppd-A1*

Озимі	<i>Ppd-A1</i>	Ярі
<i>T. durum</i>		
Бурштин, Крейсер, Яскравий, Акведук, Аргонавт, Престижний, Континент, Лайнер,	<i>Ppd-A1b</i>	Жизель, Ізольда, Гордеїформе 3, Чадо, Харківська 1, Харківська 15, Донська елегія, Харківська 3, Харківська 13, Харківська 25, Харківська 51, Местна, Ширван 5, Шовковиста, Ема, Presto de taviro, Oviachic 65, Brindur, Gkbasa, Gumillo, Marzaga, Megadur, Zenati

Закінчення табл. 3

Озимі	<i>Ppd-A1</i>	Ярі
Парус, Айсберг, Лінкор, Гардемарин, Лагуна, Золоте руно, Надійний, Перлина, Гавань, Алий парус, Афіна, Алмазний, Макар, Шляхетний, Арал, Фактор, Босфор, Дельфін, Прозорий, Блискучий	<i>Ppd-A1<sub>del2ex7</sub></i>	Прикраса, Кучумівка, Черноголовка, Прибуткова, Харківська 21, Харківська 39, Колективна 2, Білотурка, Тур, Воронежська 7, Арнаутка, Новодонська, Дуняша, Харківська 33, Харківська 37, Харківська 46, Народна, Тбілісурі Terra, Pandur, Trems, Movis, Caodat, Lupidur, Wells, Malliani 2
Кораловий	<i>Ppd-A1a.2</i>	Мерліурі
	<i>Ppd-A1a.3</i>	Метиска, Луганська 7
<i>T. aestivum</i>		
	<i>Ppd-A1<sub>del2ex7</sub></i>	Сарубра, Саратівська 46, Ботанічна 2, Башкирська 8, Opata 85, Nesser, Swalov algat, Kalyansona

Оскільки раніше опрацьовано маркування генів *Ppd-D1* та *Ppd-B1* [17], визначення аельного стану гена *Ppd-A1* дозволило охарактеризувати *Ppd*-генотипи за всіма трьома генами ортологічної групи *Ppd-1* значної кількості сортів.

### ВИСНОВКИ

Запропоновані ПЛР-тести дозволяють швидко, протягом короткого терміну виявляти присутність чи відсутність певних алелів гена *Ppd-A1* у різноманітного генетичного матеріалу пшениці м'якої та твердої.

### СПИСОК БІБЛЮГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ

1. Kamran A., Iqbal M., Spaner D. Flowering time in wheat (*Triticum aestivum* L.): a key factor for global adaptability. *Euphytica*. 2014. Vol. 197. P. 1–26. DOI: 10.1007/s10681-014-1075-7.
2. Snape J. W., Laurie D. A., Worland A. J. Understanding the genetics of abiotic stress response in cereals and possible strategies for their amelioration. *Aspects of Applied Biology*. 1998. № 50. P. 9–14.

3. Kolev S., Ganeva G., Christov N., Belchev I., Kostov K., Tsenov N., Rachovska G., Landgeva S., Ivanov M., Abu Mhadi N., Todorovska E. Allele variation in loci for adaptive response and plant height and its effect on grain yield in wheat. *Biotechnol. & Biotechnol.* 2010. V. 24 (2). P. 1807–1813.
4. Файт В. И., Федорова В. Р. Влияние генотипов Ppd на адаптацию и урожай в условиях юга степи Украины. *Цитология и генетика*. 2007. 41, № 6. С. 26–33.
5. Pugsley A. T. The photoperiodic sensitivity of some spring wheat with special reference to the variety Thatcher. *Austr. J. Agr. Res.* 1966. Vol. 17, № 5. P. 591–599.
6. Гончаров Н. П. Генетический контроль фотопериодической реакции у мягкой пшеницы. *Сельскохозяйственная биология*. 1986. № 11. С. 84–90.
7. 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.
8. Scarth R., Law C. N. The control of the day-length response in wheat by the genes 2 chromosomes. *Z. Pflanzenzucht*. 1984. Vol. 92, № 2. P. 140–150.
9. Мусіч В. М., Пильнев В. В., Нефьодов О. 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.
10. Yan L., Fu D., Li C., Blechl A., Tranquilli G., Bonafede M. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006. V. 103, № 51. P. 19581–19586.
11. Wenkel S., Turck F., Singer K., Gissot L., Le Gourrierc J., Samach A., Coupland G. CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2006. V. 18, № 11. P. 2971–2984.
12. Beales J. A., Turner A., Griffiths S., Snape J. W., Laurie D. A. Pseudo-Response Regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*. 2007. V. 115. P. 721–733.
13. Guo Z., Song Y., Zhou R., Ren Z., Jia J. Discovery, evaluation and distribution of haplotypes of the wheat *Ppd-D1* gene. *New Phytologist*. 2010. 186.841–851.
14. Wilhelm E. P., Turner A. S., Laurie D. A. Photoperiod insensitive *Ppd-A1a* mutations in tetraploid wheat (*Triticum durum* Desf.). *Theor Appl Genet*. 2009. V. 118, № 2. P. 285–294.



15. Diaz A., Zikhali M., Turner A., Isaac P., Laurie D. Copy number variation affecting the *Photoperiod-B1* and *Vernalization-A1* genes is associated with altered flowering time in wheat (*Triticum aestivum*). *PLoS One*. 2012. V. 7(3). e33234. DOI: org/10.1371/journal.pone.0033234.
16. Shaw Lindsay M., Turner F. S., Herry L., Griffiths S., Laurie D. A. Mutant alleles of *Photoperiod-1* in Wheat (*Triticum aestivum* L.) that confer a late flowering phenotype in long days. *Plos One*. 2013. 8(11): e79459. DOI: org/10.1371/journal.pone.0079459.
17. Bentley A. R., Horsnell R., Werner C. P., Turner A. S., Rose G. A., Bedard C., Howell P., Wilhelm E. P., Mackay I. J., Howells R. M., Greenland A., Laurie D. A., Gosman N. 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.
18. Балашова І. А., Файт В. І. Вариабельність *Ppd-1* генотипов у озимих сортів пшениці української селекції. *Геноміка та біохімія сільськогосподарських рослин: тези міжнар. наук. конф., м. Одеса, 12 вересня 2017 р.* Одеса, 2017. С. 20–21.
19. Muterko A., Kalendar R., Cockram J., Balashova I. Discovery, evaluation and distribution of haplotypes and new alleles of the *Photoperiod-A1* gene in wheat. *Plant Mol. Biol.* 2015. Vol. 88. P. 149–1642.
20. Takenaka S., Kawahara T. Evolution of tetraploid wheat based on variations in 5' UTR regions of *Ppd-A1*: evidence of gene flow between emmer and timopheevi wheat. *Genet Resour Crop Evol.* 2013. V. 60, № 7. P. 2143–2155.
21. Балашова І. А., Файт В. І. Ідентифікація алелів генів *Ppd-D1* і *Ppd-B1* пшениці м'якої за молекулярними маркерами: методичні рекомендації. Одеса: СГІ-НЦНС, 2015. 16 с.

**Ідентифікація** алелів гена *Ppd-A1* пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L.) та твердої (*Triticum durum* Desf.) за молекулярними маркерами: методичні рекомендації / авт.: І. А. Балашова, В. І. Файт ; СГІ –НЦНС. — Одеса : Екологія, 2021. — 20 с.

Розроблено ДНК-технологію ідентифікації генотипів м'якої та твердої пшениці за наявністю домінантних та рецесивних алелів гена *Ppd-A*, що бере участь у контролі відмінності за фотоперіодичною чутливістю.

Методичні рекомендації можуть бути використані в генетико-селекційних дослідженнях м'якої та твердої пшениці для підвищення ефективності добору вихідного матеріалу.

УДК 577.2:631:581.115:542.1

*Науково-методичне видання*

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ АЛЕЛІВ ГЕНА *PPD-A1*  
ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ (*TRITICUM*  
*AESTIVUM* L.) ТА ТВЕРДОЇ  
(*TRITICUM DURUM* DESF.)  
ЗА МОЛЕКУЛЯРНИМИ МАРКЕРАМИ**

Методичні рекомендації

Автори:

**Балашова І. А., Файт В. І.**

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

Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 1,16.  
Тираж 100 прим. Зам. № 104.

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](mailto:astro_print@ukr.net); [www.astroprint.ua](http://www.astroprint.ua); [www.stranichka.in.ua](http://www.stranichka.in.ua)  
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК No1873 від 20.07.2004 р.

