

UDC 577.2:631:581.115:542.1

Алелі гена *Ppd-D1* у зразках колекції *Aegilops tauschii* і м'якої пшениці

Г. О. Чеботар¹, С. В. Чеботар^{1,2}, Д. О. Бабенко², І. І. Моцний³,
А. Б. Щербань⁴, Ю. М. Сиволап¹

¹Південний біотехнологічний центр в рослинництві
Овідіопольська дорога, 3, Одеса, Україна, 65036

²Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Вул. Дворянська, 2, Одеса, Україна, 65026

³Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення
Овідіопольська дорога, 3, Одеса, Україна, 65036

⁴Інститут цитології і генетики Сибірського відділення РАН
Просп. Акад. Лаврентьєва, 10, Новосибірськ, Російська Федерація, 630090

gchebotar@rambler.ru

Світловий період суттєво впливає на ріст і розвиток рослин. Одним із головних генів чутливості до фотоперіоду є *Ppd-D1* з родини PRR, розташований на хромосомі 2D. Мета роботи полягала у визначенні алельного стану і молекулярної структури гена *Ppd-D1* у зразках з колекції *Ae. tauschii* з різними строками цвітіння та у 29 українських сортів м'якої пшениці. Методи. Алель-специфічна ПЛР з праймерами до гена *Ppd-D1*, секвенування і Blast-аналіз. Результати. Досліджено колекцію зразків *Ae. tauschii* та низку сортів озимої і ярої м'якої пшениці, визначено молекулярну структуру алельних варіантів (414, 429 і 453 п. н.) гена *Ppd-D1b* у колекції *Ae. tauschii*. Висновки. У досліджуваних сортах озимої м'якої пшениці присутній алель *Ppd-D1a*, а серед ярих сортів 60 % відрізняються наявністю алеля *Ppd-D1b* (розмір продуктів ампліфікації 414 п. н.). Blast-аналізом нуклеотидних послідовностей цього гена з банків даних у порівнянні з референсною послідовністю зразка k-1322 з колекції *Ae. tauschii* показано високий рівень гомології (від 80 до 100 %) між послідовностями генів PRR, характерних для генотипів *A* і *D* представників родів *Triticum* і *Aegilops*.

Ключові слова: *Aegilops tauschii*, м'яка пшениця, алель-специфічна ПЛР, *Ppd-D1*.

Вступ. *Ae. tauschii* Coss. ($2n = 14$; DD) є дикорослим диплоїдним видом роду *Aegilops* L., геном якого причетний до формування гексаплоїдного геному м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L. ($2n = 6x = 42$, AABBDD)). *T. aestivum* виникла близько 9500 років тому, у той час як *Ae. tauschii* заселяв велику площу у центральній Євразії протягом більше 2 млн років. *Ae. tauschii* – це самозапильний вид, однак переапілення трапляється досить часто [1]. На початку свого існування як виду *Ae. tauschii* Coss. пройшов через процес адаптивної внутрішньовидової дивергенції і розділився на підвиди *tauschii* і *strangulata* (Eig) Tzvelev [2].

У природі *Ae. tauschii* представлений множиною досить малих ізольованих популяцій, чверть з яких є мономорфною [1, 3], проте між собою популяції можуть значно різнитися генетично. Вид *Ae. tauschii* та ареал розповсюдження, який він займає вже більше мільйона років, зазнали найменшого впливу людини, оскільки цей вид не підходить для сільського господарства, тому наявність тих чи інших генів залежно від географічного походження популяцій є рефлексіями еволюційних подій, що відбувалися з популяціями за визначених географічних умов [3].

Генетичне розмаїття *Ae. tauschii* є цінним джерелом для поліпшення сучасних сортів м'якої пшениці. Завдяки *Ae. tauschii* м'яка пшениця набула як

корисних властивостей, необхідних для помелу і випічки, а також адаптивності, так і низку негативних ознак, що підлягають поліпшенню, а саме: сприйнятливість до грибкових захворювань [4], знижений вміст білка в зерні [5], наявність генів гібридного некрозу і хлорозу [6].

Наразі досягнуто значних успіхів стосовно включення у геном пшениці декількох генів стійкості до іржастих хвороб від *Ae. tauschii* [7]. У СУММІТ (Міжнародний центр поліпшення кукурудзи та пшениці) розробляється програма із селекції пшениці з використанням перенесення генів і подальшої успішної інтрогресії чужинних полігенних систем за рахунок гомологічної кон'югації хромосом D геномів пшениці та егілопсу [8].

Світловий період має важливе значення для росту і розвитку рослин. Фотоперіодизм як явище належить до біологічних реакцій, які регулюють час утворення генеративних морфоструктур у циклах морфогенезу, характерних для проходження відповідних етапів онтогенезу [9]. Фотоперіодична реакція – це функція еволюційно сформованого комплексу генів, робота яких забезпечує пристосування до певного фоторежиму та пов'язана з темпами розвитку рослин, скоростиглістю, морозо-зимостійкістю і, в цілому, ступенем екологічної пластичності [9–11]. Гени, які зумовлюють чутливість рослин до довжини дня, отримали назву *Ppd* (від англ. photoperiod). *Ppd-D1* (2DS) є одним із головних генів м'якої пшениці (*T. aestivum*), який впливає на чутливість до фотоперіоду, та є членом родини генів – регуляторів псевдовідповіді (pseudoresponse regulator – *PRR*).

Ефект дії генів фотоперіодичної реакції полягає у контролі тривалості проходження II–V етапів органогенезу, а саме: диференціації основи конуса наростання на зачаткові вузли, міжвузля і стеблові листя; диференціації головної осі зачаткового суцвіття, утворення конуса наростання другого порядку, початку утворення та диференціації квіток [12, 13].

Вплив генів *Ppd* у озимих сортів пшениці виявляється через 7 діб після завершення яровізації і закінчується за 2–3 тижні до колосіння залежно від наявності в генотипі того чи іншого домінантного гена *Ppd* [9]. У чутливих до фотоперіоду сортів затримка розвитку на II і III етапах органогенезу при-

зводить до посиленого кущення, підвищення кількості листя, формування більшого числа зародкових колосків і більшого колосу, проте знижується маса тисячі зерен і число зерен з колосу через зростаючу кількість стерильних квіток [9, 14, 15].

За останні декілька років знання молекулярної структури гена *Ppd-D1* значно розширилися [16, 17]. У двох відомих раніше контрастних за фенотиповим проявом алелів *Ppd-D1a* (забезпечує нечутливість до фотоперіоду) і *Ppd-D1b* (присутній у чутливих до фотоперіоду рослин) знайдено поліморфізм нуклеотидної послідовності, який з урахуванням останніх даних літератури [16] можна розділити на шість функціонально відмінних гаплотипів. При дослідженні рослин кожного гаплотипу [16] показано, що ці гаплотипи контролюють різний рівень експресії послідовності *Ppd-D1*, а також впливають на час колосіння, висоту рослин, масу тисячі зерен, довжину колоса. Фотоперіодичну нечутливість за умов як короткого (10 год або менше світлового дня), так і довгого дня (14 год або більше світлового дня) обумовлює делеція розміром 2089 п. н. перед кодуючою ділянкою (алель *Ppd-D1a*), фотоперіодично чутливий генотип визначає алель *Ppd-D1b* – тобто така делеція відсутня. За гіпотезою авторів [16], на місці цієї делеції у минулому був сайт зв'язування з транскрипційним фактором – негативним регулятором, втрата цього сайту (або втрата можливості його впізнавати) спричиняє підвищення експресії алеля *Ppd-D1a*. Цей алель, скоріше за все, з'явився завдяки мутації всередині алеля *Ppd-D1b*, найбільше він розповсюджений в Азії, що свідчить на користь східного походження *Ppd-D1a* [16].

Метою роботи було визначення алельного стану і молекулярної структури гена *Ppd-D1* у зразках з колекції *Ae. tauschii* з різними строками цвітіння та 29 українських сортів м'якої пшениці.

Матеріали і методи. Матеріалом досліджень слугували зразки з колекції *Ae. tauschii*: k-55, k-76, k-108, k-178, k-216, k-358, k-362, k-396, k-415, k-602, k-608, k-624, k-667, k-677, k-678, k-994, k-1322, k-1761, k-1957, k-2363, отримані із Всеросійського інституту рослинництва (РФ). Як контроль використано лінії озимої м'якої пшениці: Кооператорка (*Ppd-D1b*) та Кооператорка К-90 (*Ppd-D1a*).

| | | | | | |
|----------|-----|--|-----|--|--|
| <i>a</i> | | | | | |
| k-216 | 121 | GTCAACTCACGGCAGGGATGGCAATGGGTAGCGTATGGGTGGATACAACCCCTTCTACCC | 180 | | |
| | | | | | |
| k-1322 | 121 | GTCAACTC-----ATGGGTAGCGTATGGGTGGATACAACCCCTTCTACCC | 165 | | |
| <i>б</i> | | | | | |
| k-216 | 241 | CATGCCCAT-----TGGGTATCCAGTGGGAATAATATATAC | 276 | | |
| | | | | | |
| k-2363 | 241 | CATGCCCATACCCATCGGGTATCCTATACCCAATGGGTATCCAGTGGGAATAATATATAC | 300 | | |

Рис. 1. Структура фрагментів алеля *Ppd-D1b*. Порівняння послідовностей фрагментів ампліфікації ДНК з праймерами до алеля *Ppd-D1b* зразків *Ae. tauschii* k-216 і k-1322 (*a*) та k-216 і k-2363 (*б*)

Вивчали сорти озимої (Ремеслівна, Богдана, Ятрань 60, Астет, Хуртовина, Смуглянка, Снігурка, Дріада 1, Росинка, Донецька 48, Дар Луганщини, Ліона, Бунчук, Жарвій, Борвій, Лузанівка одеська, Альбатрос одеський, Херсонська безоста, Херсонська 99) і ярої (Елегія миронівська, Струна миронівська, Дніпрянка, Скороспелка 99, Харківська 26, Колективна 3, Героїня, Ажурная, Срібнянка, Стависька) м'якої пшениці 1982–2010 років реєстрації з різних науково-дослідних установ (Реєстр сортів, придатних до поширення в Україні, 2011).

ДНК виділяли згідно з методичними рекомендаціями [18]. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили, як рекомендовано [17]. Продукти ампліфікації фракціонували в 7 %-му неденатурувальному ПААГ та в 6 %-му ПААГ на ALF-express генетичному аналізаторі («Amersham Biotech», Австрія). Продукти ампліфікації візуалізували в 7 %-му неденатурувальному ПААГ згідно з рекомендаціями фірми «Promega» (США) [19].

Для секвенування ПЛР-продукти очищали за допомогою QIA-quick PCR purification kit («Qiagen», Німеччина). Первинну структуру ДНК ПЛР-фрагментів визначали в обох напрямках з використанням ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing ready reaction kit («Perkin Elmer», США). Продукти реакцій секвенування аналізували за допомогою ABI PRISM 310 Genetic Analyzer («Perkin Elmer»). Послідовності вирівнювали, використовуючи програму Chromas Lite 2.0 (Technelysium Pty Ltd, 1998–2004). На основі референсної послідовності зразка k-1322 відомі гомологічні послідовності генів *Ppd-D1* знайдено в банках даних Genbank, EMBL і DDBJ із застосуванням алгоритму BLAST [20] та за допомогою програми Clustal W (version 1.7) [21] проведено їхнє порівняння з проаналізованими в цій роботі послідовностями.

Результати і обговорення. У досліджених зразках *Ae. tauschii* методом ПЛР з праймерами *Ppd-D1_F* і *Ppd-D1_R1*, розробленими у роботі [17], виявлено фрагменти ампліфікації розміром 414 і 453 п. н. Варто відмітити, що рослини, які несуть ці алелі, є чутливими до фотоперіоду. Мутації, за якими відрізняють ці два алелі, – це дві вставки 15 і 24 п. н., розділені послідовністю 105 п. н. в області розміром 2089 п. н., розміщеній перед кодуючою послідовністю гена, її наявність призводить до фотоперіодичної чутливості рослин [17]. Як показано раніше [16, 17], алелю *Ppd-D1b* відповідають два фрагменти ампліфікації довжиною 414 і 453 п. н. Проте ПЛР-аналіз зразків ДНК з колекції *Ae. tauschii* нами виявлено продукт ампліфікації розміром 429 п. н., характерний для зразків k-216, k-55, k-362, k-624, k-678, k-1761 і до останнього часу [22] не відомий. Для подальшого вивчення структури цього алеля секвеновано зразки із фрагментами ампліфікації 429 (k-216), 453 (k-2363) і 414 п. н. (k-1322). У зразка k-216, який відрізняється наявністю фрагмента ампліфікації розміром 429 п. н. в області, що ампліфікується з праймерами до алеля *Ppd-D1b*, розміщена одна вставка розміром 15 п. н. (рис. 1) у порівнянні із зразком, розмір фрагментів ампліфікації якого 414 п. н., і немає другої вставки, характерної для фрагмента ампліфікації ДНК зразка k-2363 розміром 453 п. н.

Одержані нами результати вивчення колекції зразків *Ae. tauschii* з праймерами до алеля *Ppd-D1b* (рис. 2) узгоджуються з даними роботи [16], автори якої при дослідженні колекції з 55 зразків егілопсів показали наявність двох структурних варіантів гена *Ppd-D1b* – 414 і 453 п. н., а в останніх роботах авторів [22] виділено три гаплотипи, розмір фрагментів ампліфікації яких відповідає 453, 429 і 414 п. н. Ці структурні варіанти алеля *Ppd-D1b* мають одна-

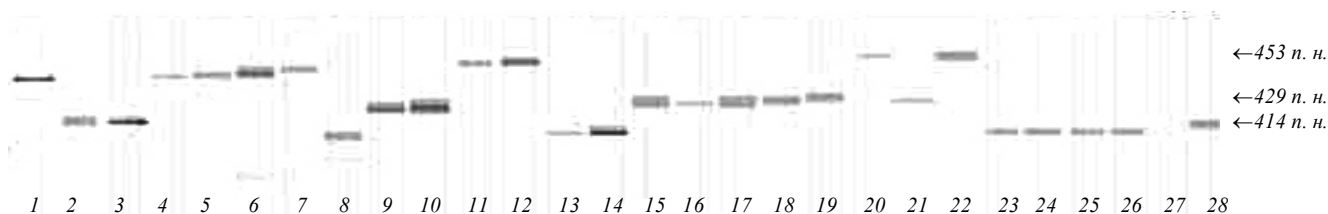


Рис. 2. Електрофоретичний розподіл продуктів ампліфікації ДНК *Ae. tauschii*, отриманих методом ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Ppd-D1b* на генетичному аналізаторі ALF-express II: 1 – k-415; 2, 3 – k-55; 4, 5 – k-677; 6, 7 – k-2363; 8 – Кооператорка; 9, 10 – k-362; 11, 12 – k-178; 13, 14 – k-1322; 15, 16 – k-678; 17, 18 – k-216; 19 – k-1761; 20, 21 – k-994; 22 – k-76; 23, 24 – k-1957; 25, 26 – k-396; 27 – Кооператорка К-90; 28 – референсний фрагмент розміром 414 п. н.

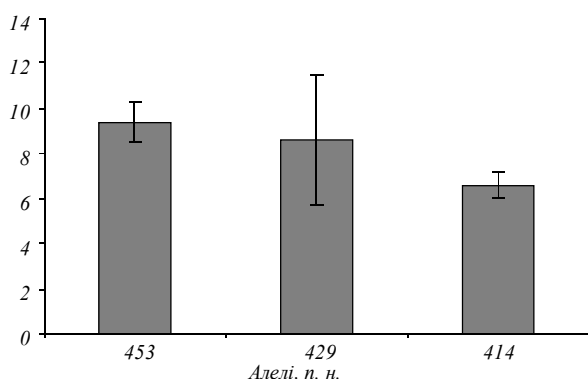


Рис. 3. Час колосіння зразків *Ae. tauschii*, які мають різні структурні варіанти алеля *Ppd-D1b*. По осі ординат – дні з початку травня до колосіння, середнє за датою колосіння \pm стандартне відхилення

ковий фенотиповий прояв – рослини чутливі до фотоперіоду, хоча існує повідомлення щодо більш раннього колосіння зразків, які містять фрагмент ампліфікації розміром 453 п. н. [22].

Згідно з даними, отриманими нами в 2010 році, спостерігаються тенденції до більш раннього колосіння зразків *Ae. tauschii*, які характеризуються наявністю фрагмента 414 п. н., у порівнянні з іншими структурними варіантами алеля *Ppd-D1b* (рис. 3). Однак за критерієм Ст'юдента достовірних відмінностей не виявлено.

Грунтуючись на даних молекулярно-генетичного аналізу нами встановлено, що досліджувані зразки *Ae. tauschii* містять алель *Ppd-D1b* гена чутливості до фотоперіоду, довжина фрагментів ампліфікації у зразків k-108, k-358, k-396, k-608, k-1322, k-1957 становить 414 п. н.; у зразків k-76, k-178, k-415, k-602, k-667, k-677, k-2363 – 453 п. н.; у зразків k-55, k-216, k-362, k-624, k-678, k-1761 – 429 п. н. Зразок k-994 виявився гетерогенним, у ньому визначено фрагменти ампліфікації 429 і 453 п. н. У досліджених зразках з колекції *Ae. tauschii* нами не знайдено алеля *Ppd-D1a*, пов'язаного з нечутливі-

стю до фотоперіоду, але цей алель характерний для сучасних сортів озимої пшениці. Можливо, мутація в локусі *Ppd-D1*, яка спричинила утворення алеля *Ppd-D1a*, відбулася вже в геномі м'якої пшениці і не торкнулася егілопсів. На сьогодні [16, 22] не виявлено зразків *Ae. tauschii* з делецією 2089 п. н. перед кодуючою ділянкою, яка обумовлює нечутливість до фотоперіоду.

Проведено BLAST-аналіз молекулярних баз даних на основі продукту секвенування зразка k-1322 розміром 414 п. н. (рис. 4). Знайдено 100 %-ву гомологію послідовностям ізолятів *Ae. tauschii* spp. *strangulata* (AS2386, AS2387), які вивчали в роботі [22]. Наразі авторами [22] показано, що до підвиду *strangulata* належать зразки з нуклеотидною послідовністю розміром 414 п. н., а до підвиду *tauschii* – 453 п. н. Зразки з розміром фрагментів ампліфікації 429 п. н., досліджені в [22], автори віднесли до проміжних форм між двома підвидами.

Встановлено високий рівень гомології (80 %) між нуклеотидною послідовністю розміром 414 п. н. гена *Ppd-D1b* та зразками послідовності гена *PRR* тетраплоїдного виду *Triticum turgidum* ($2n = 28$; AABB; рис. 4). Наразі відомі чотири зразки послідовності гена *PRR* з А-геному *T. turgidum*, що продемонстрували вищий відсоток гомології (88 %) з послідовністю 453 п. н. Нечутливість до фотоперіоду тетраплоїдної пшениці пов'язана з двома незалежними делеціями в гені *PRR* А-геному, які викликають зміни експресії і пов'язані з індукцією головного регулятора цвітіння (*FLOWERING LOCUS T – FT* [23]). Делеції в генах *PRR*, розташованих в А- і D-геномах гексаплоїдної пшениці, видаляють загальну ділянку, так що можна припустити існування однакового механізму нечутливості до фотоперіоду у геномах пшениць *T. aestivum* і *T. turgidum* [23]. При

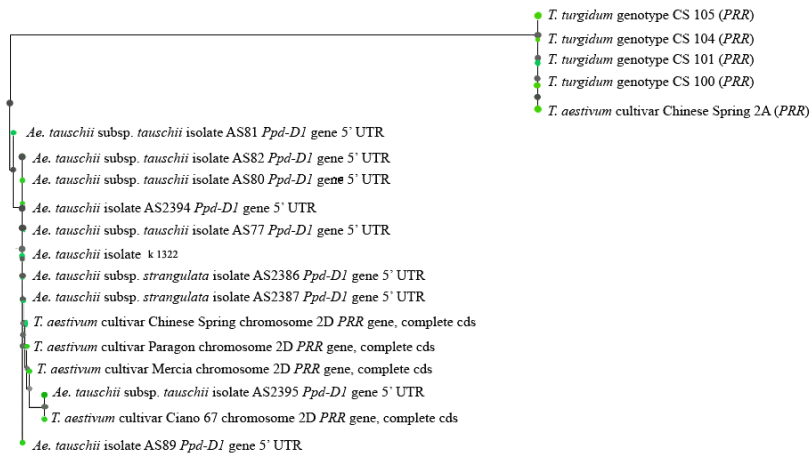


Рис. 4. Дендрограма генетичної подібності послідовностей гена *PRR*. Зразок *Ae. tauschii* k-1322 має розмір 414 п. н.

секвенуванні фрагментів з тетраплоїдних пшениць детектовано два типи делеції, 1027 і 1117 п. н., у гена *PRR* А-геному, які делетують спільну ділянку розміром 886 п. н. У свою чергу, делеція розміром 2089 п. н. у геномі D також містить таку ділянку (886 п. н.) [23].

Результати визначення методом ПЛР алелів гена чутливості до фотоперіоду *Ppd-D1* у генотипах сортів озимої м'якої пшениці української селекції наведено на рис. 5. Показано, що всі досліджені сорти озимої м'якої пшениці, окрім контрольного Кооператорки, мають у генотипах домінуючий алель *Ppd-D1a* (фрагмент ампліфікації з праймерами *Ppd-D1_F* і *Ppd-D1_R2* – 288 п. н.), який чинить значний вплив на прояв нечутливості до фотоперіоду. Нечутливість до фотоперіоду дає змогу сортам повністю сформувати вегетативні та генеративні органи рослини і досягти фази повної стиглості раніше того періоду, коли настають несприятливі умови з низькою вологістю і підвищеною температурою, уникнути епіфітотій бурі і стебловій іржі [24], мати високу потенційну продуктивність у посушливих умовах степу Причорномор'я [9, 25], краще використовувати весняні запаси вологи та інтенсивніше накопичувати біологічний врожай, проте мають гірші показники адаптивності до умов перезимівлі.

Зазначене вище підтверджує селекційну цінність слабо чутливих і нечутливих до фотоперіоду генотипів для умов лісостепу і степу України [9]. Однак серед проаналізованих нами ярих сортів 60 % містять алель *Ppd-D1b* і лише 40 % – *Ppd-D1a*, що наразі суттєво відрізняється від даних стосовно розподілу алелів гена *Ppd-D1* у озимих сортів. Сор-

ти ярої м'якої пшениці Елегія миронівська, Харківська 26, Колективна 3, Героїня, Срібнянка і Стависька характеризуються наявністю алеля *Ppd-D1b*.

Дослідженнями алельного стану переважно вітчизняних сортів пшениці за геном *Ppd-D1* методом мультиплексної ПЛР серед 48 протестованих [26] генотипів як ярої, так і озимої пшениці виявлено, що 78 % характеризуються наявністю алеля *Ppd-D1a*, а 22 % – *Ppd-D1b*. У публікації [27] встановлено, що австралійські та індійські сорти несуть домінуючі гени *Ppd* (за новою номенклатурою *Ppd-D1a*). Автори роботи [28] вивчали алельний стан гена *Ppd-D1* серед 63 турецьких сортів та 7 ландрас і визначили, що 60 % сортів та 3 ландраси мають алель *Ppd-D1a*, тоді як інші генотипи несуть алель *Ppd-D1b*. За умов Югославії (нині Сербії) нечутливість до фотоперіоду надає переваги за врожаєм, які становлять більше 35 %. У центральній Німеччині цей показник не перевищує 15 %, а у Великій Британії може варіювати від + 9 % у більш теплий і сухий сезон, до – 8 % при типовому прохолодному і вологому літі [29].

За результатами нашого дослідження, озимі сорти селекції різних селекційних центрів України містять алель *Ppd-D1a*, який за період селекції було визначено як важливий елемент генотипу для умов південних регіонів України.

Висновки. Проаналізовано колекцію з 20 зразків *Ae. tauschii*, 19 сортів озимої та 10 сортів ярої м'якої пшениці з різних селекційних центрів України за алельним складом гена *Ppd-D1*. Виявлено три структурних варіанти алеля гена *Ppd-D1b* за розміром фрагментів ампліфікації 414, 429 і 453 п. н. у

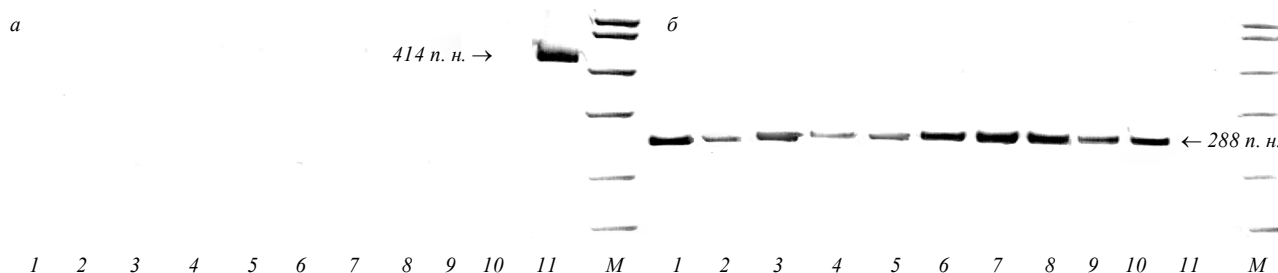


Рис. 5. Електрофоретичний розподіл у 7%-му неденатуровальному ПААГ продуктів ампліфікації ДНК, отриманих методом ПЛПР з праймерами до локусів *Ppd-D1b* (а) і *Ppd-D1a* (б) при аналізі сортів озимої м'якої пшениці: 1 – Ремеслівна; 2 – Херсонська безоста; 3 – Херсонська 99; 4 – Ятрань 60; 5 – Богдана; 6 – Хуртовина; 7 – Астет; 8 – Дріада 1; 9 – Росинка; 10 – Кооператорка К-90; 11 – Кооператорка; М – маркер молекулярної маси *pUC19/MspI*

колекції *Ae. tauschii*, це може бути корисним для вивчення внутрішньовидової еволюції генів *Ppd* і дивергенції *Ae. tauschii*.

Blast-аналізом встановлено високий рівень гомології (від 80 до 100 %) між нуклеотидними послідовностями генів *PRR*, характерних для А- і D-геномів представників родів *Triticum* і *Aegilops*.

На основі даних молекулярно-генетичного аналізу визначено, що у досліджених сортів озимої м'якої пшениці присутній алель *Ppd-D1a*, а серед ярих сортів 60 % містять алель *Ppd-D1b*.

Роботу виконано частково в рамках проекту Ф-40/94-2011 «Молекулярно-генетичний аналіз поліморфізму генів, які контролюють ріст, розвиток та чутливість до фотоперіоду, серед російських та українських сортів м'якої пшениці» Міжнародного співробітництва між Україною та Російською Федерацією.

G. O. Chebotar¹, S. V. Chebotar^{1,2}, D. O. Babenko², I. I. Motsnyu³, A. B. Scherban⁴, Yu. M. Sivolap¹

Alleles of *Ppd-D1* gene in the collection of *Aegilops tauschii* accessions and bread wheat varieties

¹South Plant Biotechnology Center, NAAS of Ukraine

3, Ovidiopolska doroga, Odesa, Ukraine, 65036

²Odesa I. I. Mechnikov National University

2, Dvoryanska Str., Odesa, Ukraine, 65082

³Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation

3, Ovidiopolska doroga, Odesa, Ukraine, 65036

⁴The Institute of Cytology and Genetics, the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

10, Prosp. Akad. Lavrentyeva, Novosibirsk, Russian Federation, 630090

Summary

Light period significantly influences on the growth and development of plants. One of the major genes of photoperiod sensitivity is

Ppd-D1, located on the chromosome 2D. **The aim** of the work was to determine the alleles and molecular structure of *Ppd-D1* gene in samples from the collection of *Ae. tauschii* accessions, which have different flowering periods, and in 29 Ukrainian wheat varieties. **Methods.** We used methods of allele-specific PCR with primers to the *Ppd-D1* gene, sequencing and Blast-analysis. **Results.** The collection of *Ae. tauschii* accessions and several varieties of winter and spring wheat was studied. The molecular structure of the allelic variants (414, 429 and 453 b. p.) of *Ppd-D1b* gene was determined in the collection of *Aegilops. tauschii* accessions. **Conclusions.** The *Ppd-D1a* allele was present in all studied varieties of winter wheat. 60 % of spring wheat is characterized by *Ppd-D1b* allele (size of amplification products 414 b. p.). Blast-analysis of the sequence data banks on the basis of the reference sequence of sample k-1322 from the collection of *Ae. tauschii* accessions has shown a high homology (80 to 100 %) between the nucleotide sequences of *PRR* genes, that characterize the A and D genomes of representatives of the genera *Triticum* and *Aegilops*.

Keywords: *Aegilops tauschii*, bread wheat, allele-specific PCR, *Ppd-D1*.

Г. А. Чеботарь, С. В. Чеботарь, Д. А. Бабенко, И. И. Моцный, А. Б. Щербань, Ю. М. Сиволап

Аллели гена *Ppd-D1* в образцах коллекции *Aegilops tauschii* и мягкой пшеницы

Резюме

Световой период существенно влияет на рост и развитие растений. Одним из главных генов чувствительности к фотопериоду является *Ppd-D1*, расположенный на хромосоме 2D. **Цель работы** состояла в определении аллельного состояния и молекулярной структуры гена *Ppd-D1* в образцах из коллекции *Ae. tauschii* с разными сроками цветения и в 29 украинских сортах мягкой пшеницы. **Методы.** Аллель-специфичная ПЦР с праймерами к гену *Ppd-D1*, секвенирование и Blast-анализ. **Результаты.** Исследована коллекция образцов *Ae. tauschii* и ряд сортов озимой и яровой мягкой пшеницы, определена молекулярная структура аллельных вариантов (414, 429 и 453 п. н.) гена *Ppd-D1b* в коллекции *Ae. tauschii*. **Выводы.** У исследованных сортов озимой мягкой пшеницы присутствует аллель *Ppd-D1a*, а среди яровых сортов у 60 % определен аллель *Ppd-D1b* (размер продуктов амплификации 414 п. н.). Blast-анализом нуклеотидных последовательностей этого гена из банков данных в сравнении с референсной последовательностью образца k-1322 из коллекции *Ae. tauschii* показан высокий уровень гомологии (от 80 до 100 %) между последовательностями генов *PRR*, характерных для А- и D-геномов представителей родов *Triticum* и *Aegilops*.

Ключевые слова: *Aegilops tauschii*, мягкая пшеница, алель-специфичная ПЦР, *Ppd-D1*.

REFERENCES

1. Dudnikov A. Allozyme variation in Transcaucasian populations of *Aegilops squarrosa* // Heredity.—1998.—**80**.—P. 248–258.
2. Eig A. Monographisch-kritische Übersicht der Gattung *Aegilops*. Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis.—Beihefte, 1929.—Vol. 55.—228 p.
3. Dudnikov A. Spatial patterns of adenylate kinase, catalase, endopeptidase and fructose-1,6-diphosphatase encoding genes allelic variation in *Aegilops tauschii* Coss. // Genet. Resour. Crop. Evol.—2011.—Springer published online: DOI 10.1007/s10722-011-9659-8.
4. Migushova E. F. Origin of the genomes of wheat // Proc. Appl. Bot., Genet. and Breeders.—1975.—**55**, N 3.—P. 3–28.
5. Tyuterev S. L., Chmeleva Z. V., Moysa I. I., Dorofeev B. F. The study of protein and essential amino acids in grains of wheat and its wild relatives // Proc. Appl. Bot., Genet. and Breeders.—1973.—**52**, N 1.—P. 222–241.
6. Kihara H. Substitution of nucleus and its effects on genome manifestation // Cytologia.—1951.—**16**.—P. 177–193.
7. McIntosh R., Dubcovsky J., Rogers W., Morris C., Appels R., Xia X. Catalogue of gene symbols for wheat // Annu. Wheat Newsletter.—2010, suppl.—**56**.—P. 273–282.
8. Mujeeb-Kazi A., Delgado R., Cortes A., Cano S., Rosas V., Sanchez J. Progress in exploiting *Aegilops tauschii* for wheat improvement // Annu. Wheat Newsletter.—2004.—**50**.—P. 79–88.
9. Fedorova V. R. Differences in effects of photoperiod response genes in winter bread wheat // PhD thesis: 03.00.15.—Plant breeding and genetic institute.—Odessa, 2004.—19 p.
10. Stelmach A. F., Martynyuk V. R. Influence of photoperiod response genes on the formation of a cone growth of winter wheat under autumn sowing // Agroecology and Biotechnology.—1998.—N 2.—P. 183–189.
11. Mosaad M., Ortiz Ferrara G., Machalakshmi V., Rajaram S. Vernalisation and photoperiod response of adapted wheat from Mediterranean region // J. Genet. and Breed.—1995.—**49**, N 3.—P. 229–235.
12. Stelmach A. F. Genetic systems that regulate flowering response in wheat // Wheat: prospects for global improvement.—Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1998.—P. 491–501.
13. Cockram J., Huw J., Leigh F., O'Sullivan D., Powell W., Laurie D. A., Greenland A. J. Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication and sustainable productivity // J. Exp. Bot.—2007.—**58**, N 6.—P. 1231–1244.
14. Kuznetsova E. S. To the knowledge of the nature of «hibernating» crop // Proceedings of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding.—1960.—**32**, N 2.—P. 249–258.
15. Oleynikov T. V. Effect of day length and temperature on the formation of rudimentary spike in cereals // Morphogenesis of plants.—Moscow: Izd. Moscow State University, 1961.—Vol. 1.—P. 133–170.
16. 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.—**185**, N 3.—P. 841–851.
17. Beales J., Turner A., Griffiths S., Snape J. W., Laurie D. A. A Pseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet.—2007.—**115**, N 5.—P. 721–733.
18. Using of PCR analysis in genetic and breeding studies / Ed. Yu. M. Sivolap // Kiev: Agricultural Sciences, 1998.—33 p.
19. *Promega* Technical Manual. Gene Print. STR Systems.—New York, 1999.—Is. 7.—52 p.
20. Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. Basic local alignment search tool // J. Mol. Biol.—1990.—**215**, N 5.—P. 403–410.
21. Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucleic Acids Res.—1994.—**22**, N 22.—P. 4673–4680.
22. Huang L., Wang Q., Zhang L., Yuan Z., Wang J., Zhang H., Zheng Y., Liu D. Haplotype variations of gene *Ppd-D1* in *Aegilops tauschii* and their implications on wheat origin // Genet. Resour. Crop. Evol.—2011.—Springer published online: DOI 10.1007/s10722-011-9741-2.
23. Wilhelm E. P., Turner A. S., Laurie D. A. Photoperiod insensitive *Ppd-A1a* mutations in tetraploid wheat (*Triticum durum* Desf.) // Theor. Appl. Genet.—2009.—**118**, N 2.—P. 285–294.
24. Lifenko S. F., Erinyak N. I., Nargan T. N. Selection of varieties of winter wheat intensive type // Col. of Scientific Works.—Odessa: Plant Breeding and Genetics Institute – NACNAIS, 2002.—P. 22–42.
25. Litvinenko N. A., Kozlov V. V. The possibility of different combinations of sensitivity to day length and vernalization requirements in winter wheat genotypes // Science-Tech. bulletin. VSGL.—1986.—**4**, N 66.—P. 5–11.
26. Mutterko O. F., Balashova I. A. Using of multiplex STS-PCR to determinate genotypes of *Ppd-D1* in wheat varieties // 2nd International Conf. «Regulation of plant growth: physiological, biochemical and genetic aspects» (11–13 October, 2011.).—Kharkiv, 2011.—P. 81–82.
27. Law C., Scarth R. Genetics and its potential for understanding the action of light in flowering // Light and the flowering process / Eds D. Vince-Prue, B. Thomas, K. E. Cockshull.—London: Acad. press, 1984.—P. 193–209.
28. Andeden E., Yediay F., Baloch F., Shaaf S., Kilian B., Nachit M., Ozkan H. Distribution of vernalization and photoperiod genes (*Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, *Vrn-B3*, *Ppd-D1*) in Turkish bread wheat cultivars and landraces // Cereal Res. Commun.—2011.—**39**, N 3.—P. 352–364.
29. Worland A., Borner A., Korzun V., Li W., Petrovic S., Sayers E. The influence of photoperiod genes to the adaptability of European winter wheats // Euphytica.—1998.—**100**, N 1–3.—P. 385–394.

Received 23.01.12