

**ПЛР-АНАЛІЗ АЛЕЛЬНОГО СТАНУ ГЕНА *Ppd-D1* У ГЕНОТИПАХ СОРТІВ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ
МИРОНІВСЬКОГО ІНСТИТУТУ ПШЕНИЦІ ім. В.М. РЕМЕСЛА**

А. О. Бакума, студентка, Одеський національний університет імені І.І. Мечникова

Н. В. Булавка, к.б.н., с.н.с., Миронівський інститут пшениці імені В. М. Ремесла НААНУ

С. В. Чеботар, д.б.н., Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова; п.н.с., Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення НААН України

*Фотоперіодична реакція рослин – це функція еволюційно сформованого комплексу генів, робота яких забезпечує пристосування до певного фоторежиму та пов'язана з темпами розвитку рослин. Ген *Ppd-D1a*, локалізований у хромосомі 2D, розглядається як мажорний ген, який визначає нечутливість до фотоперіоду гексаплоїдної пшениці. Метою роботи було визначення алельного стану гена *Ppd-D1* у шести сортів озимої м'якої пшениці Миронівського інституту пшениці імені В.М. Ремесла НААНУ (МІП) за допомогою молекулярних маркерів. Методи. Алель-специфічна полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) за геном *Ppd-D1*, електрофорез у 7% ПААГ. Результати. Визначено алельний стан гена *Ppd-D1* у шести сортів озимої м'якої пшениці МІП. Висновки. В генотипах сортів Мирлена, Ювіляр миронівський, Миронівська ранньостигла та Монотип присутній домінуючий *Ppd-D1a* алель, який визначає ознаку «нечутливість до фотоперіоду», а в генотипах сортів Пам'яті Ремесла і Економка – рецесивний алель *Ppd-D1b*, який відповідає чутливому фенотипу.*

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

Вступ. Серед найважливіших зернових культур озима м'яка пшениця за посівними площами займає в Україні перше місце і є головною продовольчою культурою [1]. Необхідність посилення рівня стійкості сортів озимої пшениці до різного роду біотичних і абіотичних стресових чинників стимулювало розвиток напряму селекції на підвищення адаптивності зернових колосових культур [2]. У зв'язку з цим виникла потреба контролювання в ході селекції адаптивних ознак, зокрема яровизаційної потреби та фотоперіодичної чутливості. Саме тому, вивчення сортів пшениці Миронівського інституту пшениці імені В.М. Ремесла НААНУ (МІП), що характеризуються цінними господарськими ознаками, широко використовуються у сільськогосподарському виробництві та як вихідний матеріал у селекції, становить певний інтерес [3].

Фотоперіодизм – реакція рослин на добовий ритм освітлення, тобто на співвідношення довжини дня і ночі, що відбивається у зміні процесів росту і розвитку [4].

Гени, що контролюють реакцію рослин на фотоперіод, впливають на швидкість вегетації рослин, а відтак на їхні адаптивні властивості та врожайність [5]. Тому досконале вивчення системи генів фотоперіодичної реакції – одна із можливостей подальшого цілеспрямованого використання генотипів з певним алельним станом цих генів у селекції для створення сортів із запрограмованим ритмом розвитку.

Реакція рослин пшениці на фотоперіод контролюється генами *Ppd-A1*, *Ppd-B1*, *Ppd-D1*, які локалізовані на хромосомах другої гомеологічної групи 2A, 2B і 2D відповідно [6]. Домінантні і рецесивні алелі відповідно позначаються *Ppd-X1a* і *Ppd-X1b*, де X – A, B або D субгеном геному *Triticum aestivum* L. Зниження чутливості до тривалості дня обумовлено домінуючими алелями (a) генів *Ppd*, а сильна реакція на фотоперіод

(тобто чутливість) характерна для генотипів з рецесивними алелями усіх трьох генів [7].

Присутність у генотипах сучасних сортів одного або декількох домінуючих генів *Ppd* скорочує тривалість вегетаційного періоду, що дозволяє рослинам уникати посухи та високих температур у період наливу зерна, а також епіфітотій бурі й стебловій іржі [11]. Вказані факти свідчать про селекційну цінність слабчутливих до фотоперіоду генотипів для умов Степу та Лісостепу України.

Ген *Ppd-D1a* (2D), що досліджується у роботі, за даними Дж. Біалес із співавторами [8] та З. Гуо з колегами [9], є мажорним. Його наявність в генотипі пшениці призводить до зменшення фотоперіодичної чутливості [10].

Вивчення фотоперіодичної чутливості за допомогою фенологічних спостережень 14 сучасних сортів МІП показало, що більшість сортів є слабо чутливими до фотоперіоду, 14% сортів з середньою чутливістю, сильно чутливим до фотоперіоду був лише сорт Миронівська 808 [3]. Але не зважаючи на важливе значення розуміння генетичної детермінації ознаки «фотоперіодична чутливість», досі не ідентифіковані *Ppd* генотипи для більшості сортів пшениці МІП. У зв'язку з вищевикладеним, було актуально встановити алельний стан гена *Ppd-D1* у сортах м'якої пшениці МІП, які часто використовуються в селекційних роботах як батьківської форми для отримання нового селекційного матеріалу.

Метою нашої роботи було визначення алелів гена чутливості до фотоперіоду *Ppd-D1* у низки сортів озимої м'якої пшениці МІП за допомогою алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Матеріали та методи. Матеріалом для дослідження слугували сорти селекції МІП – Економка, Мирлена, Монотип, Миронівська ранньостигла, Пам'яті Ремесла та Ювіляр миронівський Сумського національного аграрного університету

ський, що занесені до Державного реєстру сортів рослин, придатних для поширення в Україні у 2002-2009 рр. [12]. За контроль використано лінії пшениці Кооператорка (*Ppd-D1b*) та Кооператорка К-90 (*Ppd-D1a*), в генотипах яких алелі *Ppd-D1* гена були визначені раніше Чеботар з співавторами [13].

ДНК виділяли згідно з методичними рекомендаціями [14]. ПЛР проводили на ампліфікаторі Analytik Jena (Flex Cycler, Німеччина), як рекомендовано [8]. Для ідентифікації алелів гена *Ppd-D1* використовували праймери, розроблені Дж. Біалес із співавторами [8]. Продукти ампліфікації фракціонували методом вертикального електрофорезу в 7 % ПААГ та візуалізували згідно з рекомендаціями фірми «Promega» (США). Розміри ампліфікованих фрагментів обчислювали, використовуючи стандарти молекулярної маси λ UC19/MspI і ladder 50bp.

Результати і обговорення. Згідно даних електрофоретичного розподілу продуктів ампліфікації алель-специфічної ПЛР (рис. 1), у сортів: Мирлена, Ювіляр миронівський, Миронівська ранньостигла та Монотип виявлено фрагмент ампліфікації, розміром 288 п.н., який визначає алель *Ppd-D1a*. Детектований продукт ампліфікації співпадає з фрагментом, розміром 288 п.н., як було встановлено для контрольного зразка Кооператорка К-90 – носія алеля *Ppd-D1a*, дослідженого раніше [13]. У сортів Економка і Пам'яті Ремесла нами виявлено фрагмент ампліфікації, розміром 414 п.н., який відповідає алелю *Ppd-D1b*. Отриманий фрагмент ампліфікації співпадає з фрагментом, розміром 414 п.н., що детектований у контрольного зразка Кооператорка – носія алеля *Ppd-D1b* за даними Чеботар з співавторами [13].

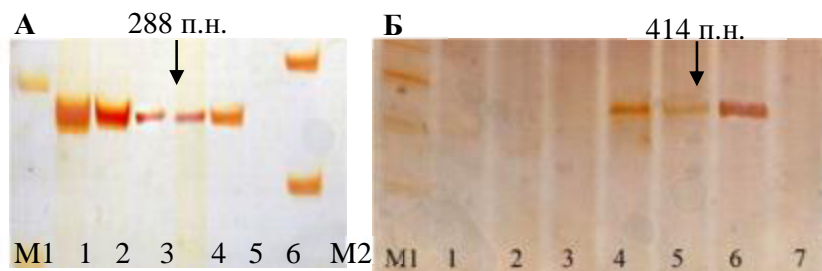


Рис. 1. Електрофоретичний розподіл у 7 % ПААГ продуктів ампліфікації, отриманих за допомогою ПЛР ДНК сортів пшениці з алель-специфічними праймерами до *Ppd-D1a* *Ppd-D1b*.
(А) *Ppd-D1a*: 1 – Мирлена, 2 – Ювіляр миронівський, 3 – Миронівська ранньостигла, 4 – Монотип, 5 – Кооператорка К-90, 6 – Кооператорка, М1 – маркер молекулярної маси ladder 50bp, М2 – маркер молекулярної маси λ UC 19/Msp I;
(Б) *Ppd-D1b*: 1 – Мирлена, 2 – Ювіляр миронівський, 3 – Миронівська ранньостигла, 4 – Пам'яті Ремесла, 5 – Економка, 6 – Кооператорка, 7 – Монотип, М1 – ladder 50bp

Наші дані узгоджуються з результатами польового дослідження, проведеного на базі МІП у 2007 та 2008 роках. Згідно цих досліджень [15], для вивчення фотоперіодичної чутливості проросле насіння яровизували протягом 60 діб і вирощували за природного та штучно скороченого (12 годин) фотоперіодів. Фотоперіодичну чутливість оцінювали за різницею в строках виколювання при вирощуванні на природному й короткому фотоперіоді (d). Для сорту Пам'яті Ремесла була визначена середня чутливість до фотоперіоду (d = 9,1), а для сортів Ювіляр миронівський (d = 3,8), Миронівська ранньостигла (d = 6,3) – слабка чутливість до фотоперіоду [15]. Слід відмітити, що різниця за тривалістю періоду до колосіння між рослинами, які вирощуються в умовах скороченого і подовженого дня (d) у слабкочутливих до фотоперіоду генотипів може складати від 0 до 14 діб, у середньо-чутливих – від 16 до 24 діб, а сильночутливими до фотоперіоду є сорти, у яких d складає більш ніж 27 діб [16].

Фенотипові характеристики перелічених сортів узгоджується з нашими даними, згідно яких у

сорті Пам'яті Ремесла виявлений алель *Ppd-D1b*, що відповідає за фотоперіодичну чутливість, у сортів Ювіляр миронівський і Миронівська ранньостигла детектовано алель *Ppd-D1a*, який є мажорним серед тих, що забезпечують фотоперіодичну нечутливість.

Висновки. Згідно виконаних нами досліджень з шести сортів, що були проаналізовані за допомогою алель-специфічної ПЛР, алель *Ppd-D1a* присутній у Мирлена, Ювіляр миронівський, Миронівська ранньостигла та Монотип, а алель *Ppd-D1b*, що є рецесивним – визначає чутливість до фотоперіоду – детектовано у Пам'яті Ремесла і Економка.

Нами виявлено, що в генотипах, слабкочутливих до фотоперіоду рослин, присутній домінуючий алель – *a* гену *Ppd-D1*. Наявність цього алелю в генотипі пшениці за даними В.І. Файта [5] сприяє скороченню тривалості періоду до колосіння, значному зростанню врожаю та окремим його складовим при вирощуванні в умовах Південного степу України, але також зниженню зимостійкості і морозостійкості наприкінці

зимівлі.

Перспективи. Отримані нами дані дозволили на молекулярному рівні визначити алельний стан гена *Ppd-D1* у генотипах шести сучасних

українських сортів озимої м'якої пшениці. Використання цих даних дозволить створювати нові сорти пшениці озимої із запрограмованим темпом розвитку для певної зони України.

Список використаної літератури:

1. Зінченко О. І. Рослинництво : підручник / Зінченко О. І., Салатенко В. Н., Білоножко М. А. – К. : Аграрна освіта, 2001. – 591 с.
2. Литвиненко М. А. Теоретичні основи та методи селекції озимої м'якої пшениці на підвищення адаптивного потенціалу для умов Степу України : автореф. дис. д-ра с.-г. наук. – Київ, 2001. – 46 с.
3. Булавка Н. В. Особливості яровизаційної потреби та фотоперіодичної чутливості Миронівських сортів озимої м'якої пшениці / Н. В. Булавка // Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого-біохімічні і генетичні аспекти : матеріали II міжнародної наукової конференції (Харків, Україна, 11-13 жовтня, 2011 р.). – Харків, 2011. – С. 57-58.
4. Полевой В. В. Физиология растений : учебник / В. В. Полевой. – М. : Высшая школа, 1989. – 464 с.
5. Файт В. И. Влияние различий генов *Ppd* на агрономические признаки озимой мягкой пшеницы / В. И. Файт, В. Р. Фёдорова // Цитология и генетика. – 2007. – № 6. – С. 26-33.
6. McIntosh R. A. Catalogue of gene symbols for wheat / R. A. McIntosh, Y. Yamazaki, K. M. Devos [et al.] [Electronic recourse] // Proc. 10th Inter. Wheat Genet. Symp. – Paestum (Italy), 2003. – Access mode : <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/top/top.jsp>.
7. Гончаров Н. П. Генетический контроль фотопериодической реакции у мягкой пшеницы (обзор) / Н. П. Гончаров // С.-х. биология. – 1986. – № 11. – С. 84-90.
8. Beales J. A Pseudo-Response Regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) / J. Beales, A. Turner, S. Griffiths [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2007. – Vol. 115. – P. 721-723.
9. Guo Z. Discovery, evaluation and distribution of haplotypes of the wheat *Ppd-D1* gene / Z. Guo, Y. Song, R. Zhou [et al.] // New Phytol. – 2010. – Vol. 185, № 3. – P. 841-851.
10. Тоцький В. М. Генетичні механізми детермінації фотоперіодичної реакції пшениці / В. М. Тоцький, О. Ф. Мутерко, І. А. Балашова, Л. Ф. Дьяченко // Біологічні системи. Науковий вісник Чернівецького університету. – 2011. – Т. 3. - Вип. 1. – С. 19-25.
11. Федорова В. Р. Відмінності ефектів генів фотоперіодичної реакції в озимій м'якої пшениці : автореф. дис. канд. биол. наук. – Одеса, 2004. – 19 с.
12. Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні у 2014 році [Електронний ресурс]. – Режим доступу до матеріалів: <http://vet.gov.ua/sites/default/files/ReestrEU-2014-04-23.pdf>.
13. Чеботар Г. О. Алелі гена *Ppd-D1* у зразках колекції *Aegilops tauschii* і м'якої пшениці / Г. О. Чеботар, С. В. Чеботар, Д. О. Бабенко [та ін.] // Biopolymers and Cell. – 2012. – Vol. 28, № 2. – P. 149-155.
14. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях / Под. ред. Ю. М. Сиволапа. – К. : Аграрна наука, 1998. – С. 8-33.
15. Булавка Н. В. Яровизаційна потреба та фотоперіодична чутливість сортів озимої м'якої пшениці селекції МІП / Н. В. Булавка // Агробіологія : збірник наукових праць Білоцерків. держ. аграр. ун-ту. – 2010. – Вип. 2 (69). – С. 138.
16. Файт В. И. Идентификация и эффекты аллелей генов темпов развития пшеницы / В. И. Файт : автореф. дис. д-ра биол. наук. – Одесса, 2008. – 40 с.

ПЦР-АНАЛИЗ АЛЛЕЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ГЕНА *Ppd-D1* В ГЕНОТИПАХ СОРТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ МИРОНОВСКОГО ИНСТИТУТА ПШЕНИЦЫ ИМ. В.Н. РЕМЕСЛО

А.А. Бакума, Н.В. Булавка, С.В. Чеботарь

*Фотопериодическая реакция растений – это функция эволюционно сформированного комплекса генов, работа которых обеспечивает приспособление к определённому фоторежиму и связана с темпами развития растений. Ген *Ppd-D1a*, локализованный в хромосоме 2D, рассматривается в качестве мажорного гена, который определяет нечувствительность к фотопериоду гексаплоидных пшениц. Целью работы было определение аллельного состояния гена *Ppd-D1* в шести сортах озимой мягкой пшеницы Мироновского института пшеницы имени В.Н. Ремесло НААНУ (МИП) с помощью молекулярных маркеров. Методы. Аллель-специфичный ПЦР-анализ гена *Ppd-D1*, электрофорез в 7% ПААГ. Результаты. Определено аллельное состояние гена *Ppd-D1* в шести сортах озимой мягкой пшеницы МИП. Выводы. В генотипах сортов Мирлена, Юбилар мироновский, Мироновская раннеспелая и Монотип присутствует доминантный *Ppd-D1a* аллель, который определяет признак «нечувствительность к фотопериоду», а у Памяти Ремесло и Экономка – рецессивный аллель *Ppd-D1b*, который отвечает чувствительному фенотипу.*

Ключевые слова: пшеница мягкая озимая, аллель-специфичная ПЦР, *Ppd-D1*.

PCR ANALYSIS OF ALLELES OF *Ppd-D1* GENE IN THE GENOTYPES OF WHEAT VARIETIES OF MIRONIVSKYI INSTITUTE OF WHEAT

A.O. Vakuma, N.V. Bulavka, S.V. Chebotar

Photoperiodic response of plants is a function of the evolutionary formed complex of genes, which pro-

vide adaptation to a particular photoperiod and is connected with the development of plants. The Ppd-D1a gene, located on the chromosome 2D, has been described as a major gene that determines photoperiodic insensitivity of hexaploid wheat. **The aim** of work was to reveal alleles of gene Ppd-D1 in genotypes of six winter wheat varieties of Mironivskyi Institute of Wheat by using molecular markers. **Methods.** Allele-specific PCR-analysis of the Ppd-D1 gene and electrophoresis in 7% PAAG have been applied. **Results.** The alleles of Ppd-D1 gene in genotypes of six winter wheat varieties of Mironivskyi Institute of Wheat have been defined. **Conclusions.** In the genotypes of four varieties Myrlena, Jubilar Mironovsky, Myronivska ranniostyglia, Monotype have present the dominant Ppd-D1a allele, which associated with the characteristic "photoperiod insensitivity" and in the genotypes of varieties Ekonomka and Pamyaty Remesla there is the recessive allele Ppd-D1b that respond to sensitive to photoperiod phenotype.

Keywords: winter bread wheat, allele-specific PCR, Ppd-D1.

Дата надходження до редакції: 15.04.2014.

Рецензенти: Власенко В.А.

УДК 635.21:631.52

ЕФЕКТИВНІСТЬ СЕЛЕКЦІЇ КАРТОПЛІ НА ПОСУХОСТІЙКІСТЬ

Н. С. Кожушко, д.с.-г.н., професор, Сумський національний аграрний університет

Г. І. Пискун, д.с.-г.н., РУП «НПЦ НАН Білорусі по картоплярству і плодоовочівництву»

І. І. Колядко, к.с.-г.н., РУП «НПЦ НАН Білорусі по картоплярству і плодоовочівництву»

М. М. Сахошко, ст. викладач, Сумський національний аграрний університет

П. В. Савченко, аспірант, Сумський національний аграрний університет

Викладені результати селекції картоплі за стійкістю до картопляної нематоди і стресових факторів зовнішнього середовища. Виявлені перспективні батьківські форми та їх комбінації для селекції картоплі на посухостійкість. Виділені гібриди картоплі з підвищеним і високим рівнем селектованих ознак. Визначена доля впливу генотипу, погодних умов та їх сумісної дії на показники посухостійкості.

Ключові слова: картопля, селекція, нематодостійкість, посухостійкість.

Постановка проблеми: Сучасною проблемою картоплярства Сумщини є підвищення ефективності виробництва продукції за негативним впливом розповсюдженого карантинного шкідника картопляна нематода та стресових погодних умов за період вегетації культури.

Сорт, як один з основних факторів інноваційної технології, здатний удосконалити систему виробництва та забезпечити 40-50% урожаю за рахунок підвищення стійкості до хвороб, шкідників та несприятливих умов зовнішнього середовища. Тому виникає потреба підвищення ефективності селекції картоплі за комплексом вищевказаних показників з наступною оптимізацією регіонального сортового складу культури за рахунок нематодостійкими сортами, толерантними до посухи, водного та високотемпературного стресів. У цьому зв'язку виділення гібридів картоплі нематодостійких форм з підвищеним рівнем посухостійкості селекції Інституту проблем картоплярства північно-східного регіону України Сумського НАУ набуває особливого значення і актуальності.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Впродовж останніх десятиліть Державний реєстр сортів рослин демонструє стабільне поповнення нематодостійкими сортами картоплі для поширення в Україні. У Реєстрі на 2014 рік серед 150 сортів більша половина таких. Відомо, що картопляна нематода особливо шкодочинна на присадібних ділянках, де недобір урожаю нестійкого сорту картоплі становить 11-43% [1], ранніх і се-

редньоранніх сортів – до 70-80%, пізніх – до 30% [2].

В Україні картопляна нематода зареєстрована в 13 областях на площі 5,6 тис. га. Основні заражені площі знаходяться в Чернігівській, Волинській, Львівській, Сумській та Рівненській областях.

Вирощування стійких сортів картоплі дозволяє знизити зараженість ґрунту за одну вегетацію на 40-80% [3], нематодостійких сумських сортів – на 50-93% за даними Інституту захисту рослин НААНУ.

Що стосується посухостійкості державних сортових ресурсів картоплі, то 62,2% з них має середній рівень ознаки – 5 балів, 31,2% сортів – з балом 7 і менше 5% – з вищою ознакою у 9 балів [4]. Найбільш потужна селекція на посухостійкість у країнах зарубіжжя – Німеччина і Голландія. Серед української селекції першість належить Інституту картоплярства НААН. З реєстрованих сортів картоплі сумської селекції, три з них, а саме Аграрна, Псельська і Фермерська мають високу посухостійкість – 7 балів, інші п'ять сортів Молодіжна, Ластівка, Селянська, Слобожанка – 2 і Плюшка – 5 балів [5].

Посуха – потужний фактор впливу на формування врожаю картоплі. Вона затримує, зупиняє або навіть призводить до втрати утвореної в процесі фотосинтезу органічної маси [6], викликає порушення водного режиму рослин, який потім спричиняє послаблення фотосинтезу, дихан-