

УДК 577.2:633.1

doi 10.18524/2077-1746.2019.1(44).168799

А. О. Бакума¹, аспірант**П. О. [unclear]**¹, д.б.н., доцент**Г. О. [unclear]**², д.с.-г.н., професор**С. В. Чеботар**^{1,3}, д.б.н., с.н.с¹ Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, кафедра генетики та молекулярної біології, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна² Інститут зрошувального землеробства НААН України, сел. Наддніпрянське, Херсон, 73483, Україна³ Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення НААН України, вул. Овідіопольська дорога, 3, Одеса, 65036, Україна, e-mail: s.v.chebotar@onu.edu.ua

АЛЕЛЬНИЙ СТАН ГЕНІВ СИСТЕМ *PPD-1* ТА *VRN-1* У СОРТІВ ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ІНСТИТУТУ ЗРОШУВАНОГО ЗЕМЛЕРОБСТВА НААН УКРАЇНИ

За допомогою ПЛР аналізу було визначено алельний стан генів систем *Ppd-1* та *Vrn-1* у 13 сортів озимої м'якої пшениці Інституту зрошувального землеробства НААН України та проведено співставлення даних молекулярно-генетичного аналізу з даними польового дослідження щодо строків колосіння та цвітіння. У досліджених сортах не визначено поліморфізму за системами генів *Ppd-1* та *Vrn-1*. У всіх сортах детектовано генотип *Ppd-D1a*, *Ppd-A1b*, *Ppd-B1b*. Поєднання мутацій, виявлених в нуклеотидній послідовності гена *Ppd-D1*, відповідає гаплотипу VII. Також у сортів не виявлено збільшення копій гена *Ppd-B1* (CNV). За системою *Vrn-1* сорти мають рецесивний генотип за трьома локусами. Не визначено достовірної різниці між сортами за строками колосіння та цвітіння, усі сорти мають слабку фотоперіодичну чутливість.

Ключові слова: озима м'яка пшениця; ПЛР-аналіз; *Ppd-1*; *Vrn-1*; CNV; чутливість до фотоперіоду; яровизаційна потреба

Серед занесених до Державного реєстру сортів рослин, придатних до поширення в Україні, сорти пшениці м'якої озимої, які створені в Інституті зрошувального землеробства НААН (ІЗЗ) є найкраще адаптованими до умов зрошення та вважаються універсальними для різних екологічних зон. Універсальність сортів базується на здатності формувати високу врожайність при інтенсивних технологіях вирощування на зрошенні та на середніх і низьких агрофонах в неполивних умовах; поєднанні високих рівнів продуктивного і адаптивного потенціалів та екологічній пластичності [9]. Тому пріоритетним напрямом подальшої роботи селекціонерів ІЗЗ повинне бути підвищення адаптивного потенціалу генотипів без зниження досягнутого високого рівня продуктивності [9].

Час колосіння є одним з ключових компонентів адаптації рослин пшениці (*Triticum aestivum* L.) до умов навколишнього середовища і, отже, впливає на потенціал сорту. Таким чином, для вирощування сортів пшениці в різних кліматичних умовах важливим є розуміння принципів генетичного контролю цієї ознаки.

Ключовими генетичними системами, що визначають час виголошування у пшениці, є система генів *Ppd-1*, що зумовлює реакцію рослин пшениці на фотоперіод, та гени *Vrn-1*, які контролюють реакцію на яровизаційні температури [35].

За силою впливу на чутливість до фотоперіоду гени *Ppd-1*, які розташовані на хромосомах 2A, 2B та 2D, знаходяться в порядку: *Ppd-D1* > *Ppd-B1* > *Ppd-A1* [34]. За даними Worland et al. [34] в окремих випадках ефект алеля *Ppd-B1* можна зіставити з *Ppd-D1*, в той же час за даними Langer et al. [23] варіація за кількістю копій (copy number variation, CNV) за геном *Ppd-B1* пояснює лише 3,2 % генотипової дисперсії за часом цвітіння, на відміну від гена *Ppd-D1* (58 %).

Нейтральна реакція на зміну тривалості світлового дня у рослин з домінантними алелями генів *Ppd-1* може бути пов'язана з поліморфізмами специфічних послідовностей або зі збільшенням числа копій генів. В промоторних областях генів *Ppd-D1* та *Ppd-A1* виявлені делеції. Так, делеція 2089 п.н. призводить до появи алелю *Ppd-D1a*, а делеції в локусі *Ppd-A1*: 1085 п.н. – до прояву алеля *Ppd-A1a.1*, 1027 п.н. – *Ppd-A1a.2*, 1117 п.н. – *Ppd-A1a.3*, 684 п.н. – *Ppd-A1a.4*, відповідно [14, 33, 28, 27]. На думку Díaz et al. [16], зниження чутливості до фотоперіоду, характерне для рослин – носіїв домінантного алеля *Ppd-B1*, викликано збільшенням числа копій (CNV) гена *Ppd-B1*. Такий стан локусу *Ppd-B1* позначається як алель *Ppd-B1a*. Відомо про наявність трьох типів *Ppd-B1a* алелю: двохкопійний, характерний для сорту Récltal, трьохкопійний, характерний для сорту Sonora64 та чотирьохкопійний, характерний для сорту Chinese Spring. Nishida зі співавторами [28] знайшли інсерцію 308 п.н. в області промотора озимого сорту Winter-Abukumawase. При цьому цей сорт мав тільки одну копію *Ppd-B1* та проявив знижену чутливість до фотоперіоду, що свідчило про те, що на нечутливість до фотоперіоду впливає саме мутація в промоторному регіоні *Ppd-B1*.

Крім того, додатково було виявлені мутації в нуклеотидній послідовності гена *Ppd-D1*: вставка транспозона типу MLTE (mariner-like transposable element) в інtronі 1, делеція 5 п.н. в сьомому екзоні, яка створює зсув рамки зчитування і призводить до синтезу нефункціонального білка, делеція 16 п. н. у восьмому екзоні, яка викликає заміщення останньої амінокислоти ССТ домену з гліцину на лейцин [14]. Внаслідок поєднання цих поліморфізмів у послідовності гена *Ppd-D1* було виділено десять функціонально відмінних гаплотипів, які контролюють різний рівень експресії гена і по-різному впливають на тривалість періоду «сходи-колосіння» [15, 19, 38].

Гени серії *Vrn-I*, які визначають наявність потреби в яровизації для переходу до генеративного розвитку, складаються з трьох ортологічних аналогів *Vrn-A1*, *Vrn-B1* і *Vrn-D1*, розташованих на хромосомах 5A, 5B і 5D відповідно [17, 18, 24, 30]. Ці локуси кодуєть фактор транскрипції MADS-box, який контролює перехід апікальної меристеми вегетативного пагону в репродуктивну фазу. У рослин пшениці, які потребують яровизації, *Vrn-I* експресується на низьких рівнях і індукується яровизацією, причому рівень експресії залежить від тривалості впливу холоду [31]. Вважається [8], що сорти озимої пшениці є носіями тільки рецесивних алелів всіх трьох генів *vrn-I*, але згідно з дослідженням Kiss et al. [22], домінантні алелі були визначені у 7 % з 683 сортів озимої пшениці з різних континентів світу. При цьому присутність тільки одного домінантного алеля гену *Vrn-A1* забезпечує повну нечутливість рослини до яровизації, а домінантні алелі генів *Vrn-B1* і *Vrn-D1* лише частково знижують потребу в ній [6, 30].

Метою роботи було визначення алельного стану генів системи *Ppd-I* та *Vrn-I* у сортів озимої м'якої пшениці Інституту зрошувального землеробства НААН та співставлення даних молекулярно-генетичного аналізу з даними польового досліджу щодо строків колосіння та цвітіння.

Матеріали та методи досліджень

Як матеріал для досліджень використовували сорти Інституту зрошувального землеробства НААН: Анатолія (2015), Благо (2011), Бургунка (2015), Конка (2014), Кохана (2009), Кошова (на сортовипробуваннях), Леда (2016), Марія (2013), Овідій (2009), Росинка (2007), Соборна (на сортовипробуваннях), Херсонська безоста (2002), Херсонська 99 (2005).

ДНК виділяли з етиологованих паростків пшениці згідно з рекомендованою методикою [14, 17]. Алель-специфічну та гніздову ПЛР проводили на ампліфікаторі FlexCycler (AnalytikJena, Німеччина) за рекомендаціями розробників молекулярних маркерів (табл. 1) [14, 16, 18, 19, 28]. Продукти ампліфікації ДНК, що отримані у ПЛР з вказаними праймерами, фракціонували методом електрофорезу в 1 % агарозному гелі та в 7 % поліакриламідному гелі, відповідно [13].

Дати колосіння та цвітіння досліджуваних сортів відмічали в ході проведення польових спостережень на базі ІЗЗ впродовж 2016–2018 років. Фенологічні спостереження проводились у розсаднику екологічного випробування з використанням штучного зрошення. Поливи проводились з використанням дощувальної установки ДДА 100МА. Рівень передполивної вологості ґрунту становив 75 % НВ у шарі 50 см. Дослідні ділянки розташовувались на Інгулецькому зрошувальному масиві [4]. Статистичне опрацювання даних проводили за допомогою програмного забезпечення Statistica 10 методом однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA).

Таблиця 1

Праймери для детекції поліморфізму за генами *Ppd-1* та *Vrn-1*

Алель	Нуклеотидна послідовність маркерів	Розмір фрагментів ампліфікації, п. н.
<i>Ppd-D1b</i> <i>Ppd-D1a</i>	F: 5'-acgcctccactacactg-3' R1: 5'-gttggttcaaacagagagc-3' R2: 5'-cactggtgtagctgagatt-3'	414 288
<i>Ppd-B1b</i> <i>Ppd-B1a</i>	F: 5'-acactagggctggtcgaaga-3' R: 5'-ccgagccagtgcacaaataac-3'	1292 1600
<i>Ppd-A1b</i> <i>Ppd-A1a</i>	F: 5'-cgtactccctccggtttctt-3' R1: 5'-gttggggtcgttgggtgtg-3' R2: 5'-aatttacggggaccaaataacc-3'	299 338
<i>Ppd-P3</i> (інсерція 16 п. н. у екзоні 8)	F: 5'-gatgaacatgaaacggg-3' R: 5'-gtctaaatagtaggtactagg-3'	320 336
<i>Ppd-P4</i> (TE інсерція в інтроні 1)	F: 5'-aggtccttactcatactcaatctca-3' R: 5'-ctccattgttgggtgtgtta-3'	2612
<i>Ppd-P5</i> (TE інсерція в інтроні 1)	F: 5'-ccattcgaggagacgattcat-3' R: 5'-ctgagaagaacacagagtgcaa-3'	1005
<i>Ppd-P6</i> (делеція 5 п. н. в екзоні 7)	F: 5'-gaatggcttctcctggtc-3' R: 5'-gatggcgaaacattatt-3'	1032 1027
<i>Ppd-P7</i> (делеція 5 п. н. в екзоні 7)	F: 5'-gtgtccttgcgaatcctt-3' R: 5'-ttggagccttgcctcatct-3'	184 179
Трьохкопійний <i>Ppd-B1</i> типу Sonora64	F: 5'-ccaggcgagtgatttacaca-3' R: 5'-gggcacgttaacacaccttt-3'	223
Чотирьохкопійний <i>Ppd-B1</i> типу Chinese Spring	F: 5'-taactgtctctcacaagtgc-3' R: 5'-ccggaacctgaggatcatc-3'	425
<i>vrn-A1</i>	F: 5'-gcactcctaaccactaacc-3' R: 5'-tcattcatcatcaaggcaaa-3'	1068
<i>vrn-B1</i>	F: 5'-caagtgaacgggttaggaca-3' R: 5'-caaatgaaaagggaatgagagca-3'	1149
<i>vrn-D1</i>	F: 5'-gttgtctgcctcatcaaatcc-3' R: 5'-aatgaaaagggaacggagcg-3'	997

Результати досліджень та їх обговорення

Використовуючи діагностичні молекулярні маркери для визначення поліморфізму за генетичними системами *Ppd-1* та *Vrn-1*, які контролюють реакцію на фотоперіод та яровизаційну потребу, були визначені генотипи сортів пшениці ІЗЗ. За локусом *Ppd-D1* детектовано фрагмент ампліфікації розміром 288 п.н., що свідчить про те, що всі сорти є носіями домінантного алелю *Ppd-D1a*. Локуси *Ppd-A1* та *Ppd-B1* також виявилися неполіморфними (ампліфіковані фрагменти 299 п.н. та 1292 п.н., відповідно), що свідчить про наявність у генотипі рецесивних алелів за цими локусами (рис. 1).

Таким чином, усі досліджені сорти ІЗЗ мають однаковий генотип *Ppd-1*, при чому домінантний алель присутній тільки в локусі *Ppd-D1*. Подібні результати були отримані при дослідженні сортів Півдня України селекції СГІ-НЦНС.

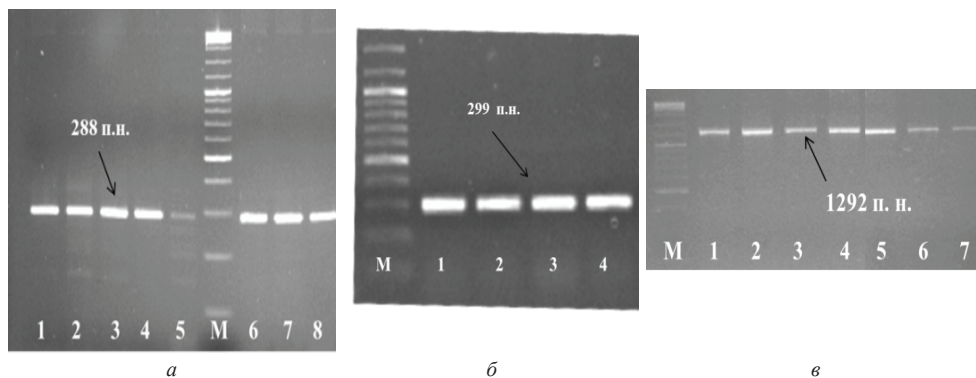


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації, отриманих за допомогою

ПЛР ДНК з алель-специфічними праймерами до алелів:

- а) *Ppd-D1a*: 1 – Анатолія, 2 – Благо, 3 – Бургунка, 4 – Конка,
5 – Кохана, 6 – Росинка, 7 – Соборна, 8 – Херсонська безоста;
б) *Ppd-A1b*: 1 – Анатолія, 2 – Благо, 3 – Бургунка, 4 – Конка;
в) *Ppd-B1b*: 1 – Анатолія, 2 – Благо, 3 – Бургунка, 4 – Конка,
5 – Кохана, 6 – Росинка, 7 – Соборна;
М – маркер молекулярної маси ladder mix

Так, домінантний алель *Ppd-A1a* не був виявлений у генфонді озимої пшениці [3], а щодо наявності домінантного алелю гена *Ppd-B1*, який зазначається присутністю інсерції 308 п.н. в промоторному регіоні, дослідження відносно зазначеної виборки, яка містила 64 сорти, не проводилися. При цьому частота генотипу *Ppd-D1a* на півдні України становила 93,7 % [10]. Слід відмітити, що серед досліджених вищевказаними авторами сортів був присутній сорт ІЗЗ Херсонська безоста, в генотипі якого також детектовано домінантний алель *Ppd-D1a*.

За системою *Vrn-1* в трьох локусах визначені рецесивні алелі (рис. 2).

Вважається, що домінантні алелі *Vrn-1* виникли в результаті делецій або інсерцій в промоторі або в інтроні 1. При аналізі 205 китайських сортів озимої пшениці авторами Zhang зі співавторами [38] виявили, що домінантні алелі генів *Vrn-1* несли в своєму генотипі за локусом *A1* – 3,5 % сортів, за локусом *B1* – 16 %, за локусом *D1* – 41,5 %. В роботі Whittall зі співавторами [32] серед досліджених 203 канадських сортів озимої пшениці у 9 % виявлений домінантний алель *Vrn-A1*, і -тільки у одного сорту (0,5 %) знайдені алелі *Vrn-B1* і *Vrn-D1*, що призводять до нечутливості до яровизації.

За результатами досліджень низки авторів було визначено що для сортів озимої пшениці з рецесивним *vrn-1* генотипом відмінності в тривалості періоду низьких температур, необхідного для насичення реакції яровизації, пов'язані з локусом *vrn-A1* і можуть впливати на тривалість періоду «сходи-колосіння». Так, Diaz et al. [16] припустили, що різниця за строками колосіння була ви-

кликана наявністю одиначної копії *vrn-A1* в сорті Claire і трьох копій цього гена в сорті Hereward. Однак Li et al. [25] стверджували, що аналогічні відмінності, що спостерігали між сортом Jagger і селекційною лінією 2174, були зумовлені поліморфізмом за амінокислотною послідовністю в положенні 180 тобто наявністю аланіну і валіну відповідно. При цьому Kirpes et al. [21] виявили, що Claire і Jagger також відрізнялися від Hereward і лінії 2174 однонуклеотидним поліморфізмом (SNP) в сайті зв'язування білка GRP (Glycine rich RNA-binding Protein 2) в області першого інтрона *vrn-A1*, позначеного як RIP3 (RNA Immune Precipitation fragment 3) [20, 37]. Надалі в сортах з однією копією *vrn-A1* було виявлено різну кількість SNP в області RIP3 (гаплотипи 1_SNP і 3_SNP) і було показано, що рослини з гаплотипом 3_SNP, виколюються значно раніше, ніж рослини з гаплотипом 1_SNP, як за відсутності яровизації (різниця в 17 днів), так і після 3-х тижнів яровизації (різниця 11 днів). Таким чином, Kirpes із співавторами наполягають на доцільності проведення детекції поліморфізмів в області RIP3 у дослідженнях сортів, які достовірно різняться за строками виолошування [21].

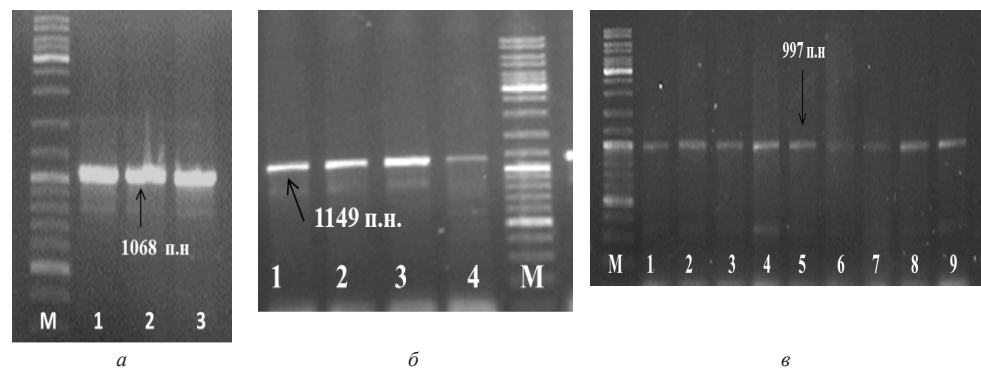


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації, отриманих за допомогою ПЛР ДНК з алель-специфічними праймерами до алелів:

- а) *vrn-A1*: 1 – Анатолія, 2 – Благо, 3 – Бургунка;
 б) *vrn-B1*: 1 – Анатолія, 2 – Благо, 3 – Бургунка; 4 – Конка;
 в) *vrn-D1*: 1 – Анатолія, 2 – Благо, 3 – Бургунка; 4 – Конка, 5 – Кохана М
 – маркер молекулярної маси ladder mix

Для оцінки поліморфізму і визначення гаплотипного складу за геном *Ppd-D1* в сортах ІЗЗ використовували ряд молекулярних маркерів (*Ppd-P3* – *Ppd-P7*). За локусом *Ppd-P3* детектовано фрагмент ампліфікації розміром 320 п.н. (рис. 3а), що свідчить про відсутність інсерції 16 п.н. у 8 екзоні. В результаті гніздової ПЛР з маркерами *Ppd-P6* і *Ppd-P7* у всіх сортів виявлений фрагмент ампліфікації 184 п.н. (рис. 3в), наявність якого свідчить про відсутність делеції 5 п.н. в 7 екзоні. З праймерами *Ppd-P4* та *Ppd-P5* не було визначено фрагмен-

тів 2612 п.н. та 1005 п.н., відповідно (рис. 3 б), що підтверджує наявність ТЕ інсерції в генотипі. За класифікацією, запропонованою Guo et al. [19] та Chen et al. [15], досліджувані сорти ІЗЗ за поєднанням мутацій в нуклеотидній послідовності гена *Ppd-D1* відносяться до гаплотипу VII.

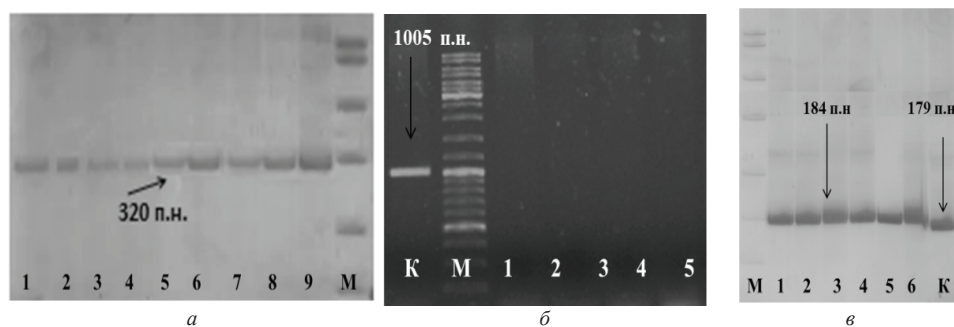


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації, отриманих за допомогою

ПЛР ДНК з праймерами, що рекомендовані для визначення гаплотипів за *Ppd-D1*:

- а – *Ppd-P3*: 1 – Анатолія, 2 – Благо, 3 – Бургунка, 4 – Конка, 5 – Кохана, 6 – Росинка, 7 – Соборна, 8 – Херсонська безоста; 9 – Овідій; М – маркер молекулярної маси pUC19/MspI
 б – *Ppd-P5*: 1 – Анатолія, 2 – Благо, 3 – Бургунка, 4 – Конка, 5 – Кохана, К – Легенда білоцерківська; М – маркер молекулярної маси ladder mix
 в – *Ppd-P7*: 1 – Анатолія, 2 – Благо, 3 – Бургунка, 4 – Конка, 5 – Кохана, 6 – Росинка, К – Легенда білоцерківська; М – маркер молекулярної маси pUC19/MspI

З огляду на те, що за даними Diaz et al. [16] копійність гену *Ppd-B1* може впливати на фенотипічний прояв фотоперіодичної чутливості, нами було визначено кількість копій *Ppd-B1* в генотипах зазначених сортів. На сьогодні в Україні CNV-мутації *Ppd-B1* досліджувалися Балашовою зі співавторами [2], які позначили трьох- та чотирьох-копійні мутанти як *Ppd-B1a* (*Ppd-B1* типу ‘Sonora64’) та *Ppd-B1c* (*Ppd-B1* типу ‘Chinese Spring’), відповідно. У загальній вибірці озимих та ярих сортів закордонної та вітчизняної селекції (в цілому 120 сортів пшениці) CNV-мутанти були виявлені авторами [2] у 29 сортів, причому носіями алелів *Ppd-B1a* та *Ppd-B1c* були 17 та 12 сортів, відповідно. При цьому серед українських сортів пшениці м’якої озимої домінантний алель *Ppd-B1c* визнаєно тільки у сорту Бригантина. У генотипах сортів ІЗЗ нами не було виявлено збільшення копій гена *Ppd-B1*. Як контрольні зразки для визначення алелів *Ppd-B1a* та *Ppd-B1c* використовували ДНК сортів Елегія миронівська та Струа миронівська, в генотипах яких зазначені мутації були раніше детектовані Балашовою зі співавторами [2]. Фрагменти 223 п.н. та 425 п.н. (рис. 4), які виначають наявність в генотипі трьох та чотирьох копій *Ppd-B1*, відповідно, наї не були детектовані при проведенні ПЛР.

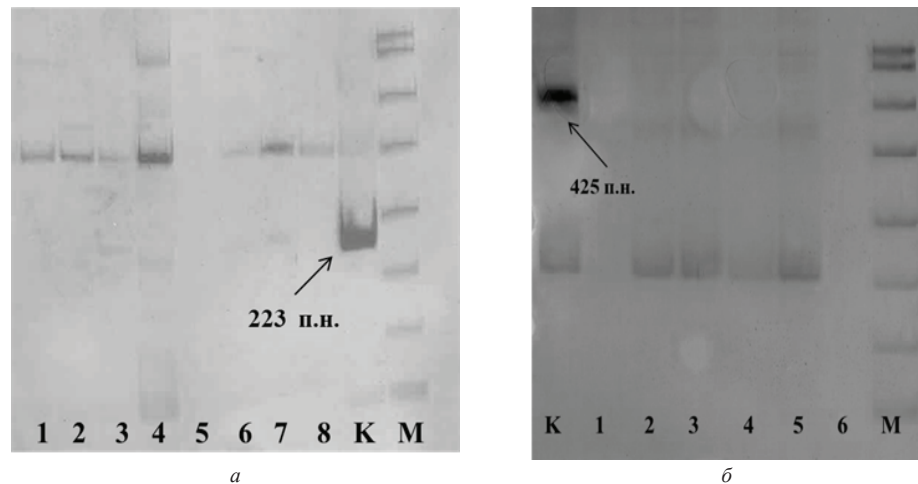


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації, отриманих за допомогою ПЛР ДНК з алель-специфічними праймерами до CNV гена *Ppd-B1*:

а – трьохкопійний *Ppd-B1* типу Sonora64: 1 – Анатолія, 2 – Благо, 3 – Бургунка, 4 – Конка, 5 – Кохана, 6 – Росинка, 7 – Соборна, 8 – Херсонська безоста; К – Струна миронівська;

б – чотирьохкопійний *Ppd-B1* типу Chinese Spring: 1 – Анатолія, 2 – Благо, 3 – Бургунка, 4 – Конка, 5 – Кохана, 6 – Росинка, К – Елегія миронівська

М – маркер молекулярної маси pUC19/MspI

Таким чином, при дослідженні сортів ІЗЗ нами не визначено поліморфізму генетичних систем, які детермінують фотоперіодичну чутливість та яровизаційну потребу. Усі сорти селекції ІЗЗ є носіями генотипу *Ppd-D1a*, *Ppd-A1b*, *Ppd-B1b* та рецесивного генотипу за локусами *vrn-1*. За структурою нуклеотидної послідовності гена *Ppd-D1* сорти ІЗЗ віднесено до гаплотипу VII. Крім того, не детектовано збільшення кількості копій гена *Ppd-B1*, які призводять до зменшення чутливості до фотоперіоду.

Статистичний аналіз даних польових спостережень, в ході яких впродовж трьох років відмічали дати колосіння та цвітіння досліджених сортів, показав, що усі сорти не мають достовірної різниці за цими показниками, тобто фенотиповий прояв чутливості до фотоперіоду загалом узгоджується з результатами молекулярно-генетичного аналізу генотипів (табл. 2).

Як зазначає Стельмах із співавторами [7], сучасним сортам озимої м'якої пшениці півдня України притаманна слабка фотоперіодична чутливість та скорочена потреба в яровизації. В степу Причорномор'я слабка фотоперіодична чутливість сприяє більш повному використанню весняних запасів вологи, інтенсивному накопиченню біологічного врожаю, його більш повній реалізації [5]. При цьому зниження реакції на фотоперіод в цих сортах досягається завдя-

ки наявності в генотипі домінантного алеля *Ppd-D1a*. За результатами Файта та ін. [10], серед озимих сортів України алель *Ppd-D1a* зустрічався значно частіше (77,5 %), ніж алель *Ppd-D1b* (22,5 %). І як показують дослідження ряду авторів, більш поліморфними за цим локусом виявилися сорти північних та центральних регіонів України. Так, в роботі Філімонова та ін. [11] в генотипах 15 сортів пшениці Білоцерківської дослідно-селекційної станції визначено алель *Ppd-D1a*, лише сорт Легенда білоцерківська мав повністю рецесивний *Ppd-1* генотип. В нашій більш ранній роботі [1] було показано, що серед сортів Миронівського Інституту пшениці імені В. М. Ремесла співвідношення *Ppd-D1a* та *Ppd-D1b* алелів становить 71,4 % та 28,6 %, відповідно. Всі сучасні сорти Полтавської державної аграрної академії, досліджені Чеботар та ін., [12] характеризувалися *Ppd-D1a* алелем, наявність якого в генотипах автори пояснюють використанням в схрещуваннях при їх створенні сортів СГІ-НЦНС, в родоводі яких був присутній сорт Безоста І, який, в свою чергу, має у генотипі алель *Ppd-D1a*.

Таблиця 2
Характеристика сортів ІЗЗ за *Ppd-1* генами та датами колосіння та цвітіння

Сорт	Алельний стан генів <i>Ppd</i>			Мутації (делетії та інсерції) гена <i>Ppd-D1</i>					Гапло-тип за геном <i>Ppd-D1</i>	Середні значення за три роки (2016-2018 рр *)	
	D1	A1	B1	24 + 15 п.н.	2 т.п.н.	TE	5 п.н.	16 п.н.		дата коло-сіння	дата цвітіння
Анатолія	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	-	-	+	+	-	VII	8,7	12
Бургунка	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	-	-	+	+	-	VII	10	12,7
Конка	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	-	-	+	+	-	VII	8,7	11,7
Кохана	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	-	-	+	+	-	VII	8,7	12
Кошова	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	-	-	+	+	-	VII	10,7	14,3
Ледя	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	-	-	+	+	-	VII	13	16,3
Марія	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	-	-	+	+	-	VII	10	13
Овідій	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	-	-	+	+	-	VII	8,7	11,7
Росинка	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	-	-	+	+	-	VII	9,7	12,7
Соборна	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	-	-	+	+	-	VII	9,7	12,7
Херсонська Безоста	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	-	-	+	+	-	VII	11	14,3
Херсонська 99	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	-	-	+	+	-	VII	8,3	11,3
НІР _{0,05}										-	-
Р**										7,8%	5,2%

Примітка: * – кількість днів до колосіння та цвітіння, починаючи відлік з першого травня;

** – показник точності досліджу

За результатами досліджень Würschum [36] локуси *Ppd-D1* і *Ppd-B1* обумовлюють 48,2 % і 8,3 % генотипової дисперсії щодо строків виколошування, відповідно, і тому є основними локусами, які детермінують різницю у тривалості періоду до колосіння при порівнянні сортів озимої пшениці. Для оптимізації застосування у селекційній практиці результатів досліджень генетичних детермінант адаптивних характеристик пшениці, до яких належать *Ppd-1* і *Vrn-1* локуси, що обумовлюють тривалість вегетації, необхідне детальне вивчення взаємодії "генотип - середовище" в різних локаціях, тобто оцінка характеру реалізації генотипу в певних еколого-кліматичних умовах. Та й подальша селекційна робота мусить бути націлена на створення сортів налаштованих до конкретних умов вирощування, а це можливо з урахуванням поєднання певних алелів генів, що відповідають за фенологію озимої пшениці.

Висновки

1. За системою *Ppd-1* у всіх сортів ІЗЗ детектовано домінантний алель *Ppd-D1a*, в локусах *Ppd-A1* та *Ppd-B1* визначені рецесивні алелі *b*. Поєднання мутацій в нуклеотидній послідовності гена *Ppd-D1* вказує на те, що досліджені сорти відносяться до гаплотипу VII.
2. За системою *Vrn-1* сорти є носіями рецесивного генотипу.
3. В генотипах сортів не детектовано збільшення копій гена *Ppd-B1*.
4. Досліджені сорти є ранньостиглими і не мають достовірних відмінностей за строками колосіння та цвітіння, що добре узгоджується з результатами молекулярно-генетичного аналізу систем генів *Ppd-1* та *Vrn-1*, які контролюють тривалість вегетаційного періоду рослин пшениці.

Стаття надійшла до редакції 26.03.2019

Список використаної літератури

1. Бакума А. О. Генотипи сучасних миронівських сортів озимої м'якої пшениці за *Ppd-A1*-, *Ppd-B1*-, *Ppd-D1*-генами, та їх чутливість до фотоперіоду / А. О. Бакума, Н. В. Булавка, С. В. Чеботар // Вісник ОНУ. Біологія. – 2016. – Т. 21, вип. 1 (38). – С. 75–78. doi: http://www.irbis-nbuv.gov.ua/cgi-bin/irbis_nbuv/cgiirbis_64.exe?I21DBN=LINK&P21DBN=UJRN&Z21ID=&S21REF=10&S21CNR=20&S21STN=1&S21FMT=ASP_meta&C21COM=S&S21P03=FILA=&S21STR=Von_u_biol_2016_21_1_9
2. Балашова І. А. Ідентифікація алелів генів *Ppd-D1* і *Ppd-B1* пшениці м'якої за молекулярними маркерами: Методичні рекомендації / І. А. Балашова, В. І. Файт // Одеса: СГІ-НЦНС, 2015. – 16 с.
3. Балашова І. А. Розробка ДНК-технологій ідентифікації генів ортологічної серії *Ppd-1* м'якої і твердої пшениць / І. А. Балашова, В. І. Файт // Сільськогосподарська біотехнологія: теоретичні розробки і впровадження в селекцію рослин. – Одеса: Астропринт, 2016. – С. 9–19.
4. Вожегова Р. А. Методика польових і лабораторних досліджень на зрошуваних землях / Р. А. Вожегова, М. П. Малирчук, С. В. Коковіхін та ін. // – Херсон: Вид. Грінш Д. С., 2014. – 286 с.
5. Мусіч В. М. Фотоперіодична чутливість та адаптивність різних сортів озимої пшениці на півдні України / В. М. Мусіч, В. В. Пильнев, О. В. Нефйодов, С. В. Рабінович // Реалізація потенційних можливостей сортів та гібридів Селекційно-генетичного інституту в умовах України. – Одеса, 1996. – С. 76–83.

6. Потокина Е.К Комбинация аллелей генов *Ppd* и *Vrn* и сроки колошения у мягкой пшеницы / Е. К. Потокина, В. А. Кошкин, Е. А. Алексеева, И. И. Матвиенко, В. А. Филобок, Л. А. Беспалова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. – Том 16, № 1. – С. 77–86.
7. Стельмах А. Ф. Возможность улучшения адаптивности озимой пшеницы путем усиления фотопериодизма и потребности в яровизации / А. Ф. Стельмах, В. І. Файт // Збірник наукових праць Селекційно-генетичного інституту-Національного центру насіннєзнавства та сортівивчення. – 2016 – № 27. – С. 103-108.
8. Стельмах А.Ф. Изучение роли генетических систем *Vrn* и *Ppd* у мягкой пшеницы / А. Ф. Стельмах, В. И. Авсенин, В. А. Кучеров, А. И. Воронин // Вопросы генетики и селекции зерновых культур. КОЦ СЭВ. Одесса (СССР). НИИР Прага-Рузыне (ЧССР). – 1987. – Вып. 3. – С. 125–132.
9. Усик Л. О. Інноваційні сорти пшениці м'якої озимої селекції Інституту зрошуваного землеробства НААН для умов зрошення Півдня України / Л. О. Усик, Г. Г. Базалій., Н. Д. Колесникова // Зрошуване землеробство. – 2015. – Вип. 64. – С. 139–142. Doi: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Zz_2015_64_42
10. Файт В. И. 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 // Физиология растений и генетика. – 2014. – Т. 46, № 4. – С. 325–336. Doi: http://nbuv.gov.ua/UJRN/FBKR_2014_45_4_7
11. Филимонов В. М. ПЛР-анализ генов фотопериодичной чувствости у сортов м'якої озимої пшениці селекції Білоцерківської дослідно-селекційної станції / В. М. Филимонов, А. А. Бакума, Г. А. Чеботарь, Л. А. Бурденюк-Тарасевич, С. В. Чеботарь // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2018. – Т. 16, № 2. – С. 217-226. Doi: http://utgis.org.ua/journals/index.php/VisnykUTGiS/article/view/1060/Filimonov_18
12. Чеботар Г. О. Характеристика сортів пшениці селекції Полтавської державної аграрної академії за допомогою маркерів до генів, що визначають важливі господарсько-агрономічні ознаки / Г. О. Чеботар, С. В. Чеботар, М. К. Топораш, А. О. Бакума, В. М. Тищенко // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2017. – Т. 15, № 2. – С. 187–195. Doi: <http://utgis.org.ua/journals/index.php/VisnykUTGiS/article/view/878/Chebotar>
13. Bassam B. J. Silver staining of DNA in polyacrylamide gels / B. J. Bassam, P. M. Gresshoff // Nat. Protoc. – 2007. – Vol. 2. – P. 2649–2654 Doi: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.330>
14. Beales J. Pseudo-Response Regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) / J. Beales, A. Turner, S. Griffiths, J. W. Snape, D. A. Laurie // Theor. Appl. Genet. – 2007. – Vol. 115. – P. 721–733. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0603-4>
15. Chen F. Molecular characterization of vernalization and response genes in bread wheat from the yellow and Huai Valley of China / F. Chen, M. X. Gao, J. H. Zhang, A. H. Zuo, X. L. Shang, D. Q. Cui // BMC Plant Bio. – 2013. – Vol. 13. – P. 199. Doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-199>
16. Díaz A. Copy number variation affecting the *Photoperiod-B1* and *Vernalization-A1* genes is associated with altered flowering time in wheat (*Triticum aestivum*) / A. Díaz, M. Zikhali, A. S. Turner, P. Isaac, D. A. Laurie // PLoS One. – 2012. – Vol. 7(3):e33234. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033234>
17. Dubcovsky J. Comparative RFLP mapping of *Triticum monococcum* genes controlling vernalization requirement / J. Dubcovsky, D. Lijavetzky, L. Appendino, G. Tranquilli // Theor Appl Genet. – 1998. – Vol. 97. – P. 968–975 Doi: <https://doi.org/10.1007/s001220050978>
18. Fu D. Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat / D. Fu, P. Szücs, L. Yan, M. Helguera, J. S. Skinner, J. V. Zitzewitz, et al. // Molecular Genetics and Genomics. – 2005. – Vol. 273. – P. 54–65 Doi: <https://doi.org/10.1007/s00438-004-1095-4>
19. Guo Z. Discovery, evaluation and distribution of haplotypes of the wheat *Ppd-D1* gene / Z. Guo, Y. Song, R. Zhou, Z. Ren, J. Jia // New Phytol. – 2010. – Vol. 185, № 3. – P. 841–851. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03099.x>
20. Kippes N. Identification of the VERNALIZATION 4 gene reveals the origin of spring growth habit in ancient wheats from South Asia / N. Kippes, J. Debernardi, H. A. Vasquez-Gross, B. A. Akpinar, H. Budak, K. Kato, S. Chao, E. Akhunov, J. Dubcovsky // Proc Natl Acad Sci USA. – 2015. – Vol. 112. – P. E5401-E5410. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1514883112>
21. Kippes N. Single nucleotide polymorphisms in a regulatory site of VRN-A1 first intron are associated with differences in vernalization requirement in winter wheat / N. Kippes, M. Guedira, L. Lin et al. // Molecular Genetics and Genomics. – 2018. – Vol. 293 (5). – P. 1231–1243 Doi: <https://doi.org/10.1007/s00438-018-1455-0>

22. Kiss T. Allele frequencies in the VRN-A1, VRN-B1 and VRN-D1 vernalization response and *PPD-B1* and *PPD-D1* photoperiod sensitivity genes, and their effect of on heading in a diverse set of wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) / T. Kiss, K. Balla, O. Veisz, L. Láng et al. // Molecular Breeding. – 2014. – Vol. 34(2). – P. 297–310. Doi: <https://dx.doi.org/10.1007%2Fs11032-014-0034-2>.
23. Langer S. M. Flowering time control in European winter wheat / S. M. Langer, C. F. Longin, T. Würschum // Front Plant Sci. – 2014. – Vol. 5. – P. 537. Doi: <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffpls.2014.00537>.
24. Law C. N. The genetic control of ear-emergence time by chromosomes 5A and 5D of wheat / C. N. Law, A. J. Worland, B. Giorgi // Heredity. – 1975. – Vol. 36. – P. 49–58 Doi: <https://doi.org/10.1038/hdy.1976.5>
25. Li G. Vernalization requirement duration in winter wheat is controlled by TaVRN-A1 at the protein level / G. Li, M. Yu, T. Fang, S. Cao, B. F. Carver, L. Yan // The Plant Journal. – 2013. – Vol. 76. – P. 742–753 Doi: <https://doi.org/10.1111/tpj.12326>
26. Murray M. G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA / M. G. Murray, W. F. Thompson // Nucleic Acids Res. – 1980. – Vol. 8 (19). – P. 4321–4326. Doi: <https://dx.doi.org/10.1093%2Fnar%2F8.19.4321>
27. Muterko A. Discovery, evaluation and distribution of haplotypes and new alleles of the Photoperiod-*A1* gene in wheat / A. Muterko, R. Kalendar, J. Cockram, I. Balashova // Plant Mol Biol. – 2015. – Vol. 88 (1–2). – P. 149–164. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0313-2>
28. Nishida H. Structural variation in the 5' upstream region of photoperiod-insensitive alleles *Ppd-A1a* and *Ppd-B1a* identified in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.), and their effect on heading time / H. Nishida, T. Yoshida, K. Kawakami, M. Fujita, B. Long, Y. Akashi, D. A. Laurie, K. Kato // Molecular Breeding. – 2013. – Vol. 31, – P. 27–37 Doi: <https://doi.org/10.1007/s11032-012-9765-0>
29. Pervaiz Z. H. A modified method for high-quality DNA extraction for molecular analysis in cereal plants / Z. H. Pervaiz, N. A. Turi, I. Khaliq, M. A. Rabbani, S. A. Malik // Genet. Mol. Res. – 2011. – Vol. 10 (3). – P.1669–1673. Doi: <http://dx.doi.gov/10.4238/vol10-3gmr1346>
30. Pugsley A. T. A genetic analysis of the spring–winter habit of growth in wheat / A. T. Pugsley // Australian Journal of Agricultural Research. – 1971. – Vol. 22 (1). – P. 21–31 Doi: <https://doi.org/10.1071/AR9710021>
31. Shcherban A. B. Effect of *VRN-1* and *PPD-D1* genes on heading time in European bread wheat cultivars / A. B. Shcherban, A. Börner, E. A. Salina // Plant Breeding. – 2014. – Vol. 134 (1). – P. 49 – 55 Doi: <https://doi.org/10.1111/pbr.12223>
32. Whittal A. Allelic variation of vernalization and photoperiod response genes in a diverse set of North American high latitude winter wheat genotypes / A. Whittal, M. Kaviani, R. Graf, G. Humphreys, A. Navabi // PLoS ONE. – 2018. – Vol. 13(8): e0203068. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203068>
33. Wilhelm E.P. Photoperiod insensitive *Ppd-A1a* mutations in tetraploid wheat (*Triticum durum* Desf.) / E. P. Wilhelm, A. S. Turner, D. A. Laurie // Theor Appl Genet. – 2009. – Vol. 118, № 2. – P. 285–294. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0898-9>
34. Worland A. J. The influence of photoperiod genes on the adaptability of European winter wheats / A. J. Worland, A. Börner, V. Korzun, W. M. Li, S. Petrovic, E. J. Sayers // Euphytica. – 1998. – Vol. 100, – P. 385–394.
35. Worland A. J. The influence of the flowering time genes on environmental adaptability in European wheats / A. J. Worland // Euphytica. – 1996. – Vol. 89. – P. 49–57.
36. Würschum T. A three-component system incorporating *Ppd-D1*, copy number variation at *Ppd-B1*, and numerous small-effect quantitative trait loci facilitates adaptation of heading time in winter wheat cultivars of worldwide origin / T. Würschum, S. M. Langer, C. Longin, M. R. Tucker, W. L. Leiser // Plant Cell Environ. – 2018. – Vol. 41, № 6. – P. 1407–1416. Doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00470>
37. Xiao J. O-GlcNAc-mediated interaction between VER2 and TaGRP2 elicits TaVRN1 mRNA accumulation during vernalization in winter wheat / J. Xiao, S. Xu, C. Li, Y. Xu, L. Xing et al. // Nature Communications. – 2014. – Vol. 5 (4572) Doi: <https://doi.org/10.1038/ncomms5572>
38. Zhang X. K. Allelic variation at the vernalization and photoperiod sensitivity loci in Chinese winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) / X. K. Zhang, M. Gao, S. Wang, F. Chen, D. Cui // Front Plant Sci. – 2015. – Vol. 6. – P. 470 Doi: <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffpls.2015.00470>

А. А. Бакума¹, О. А. Шалашова¹, А. А. Галущак², С. В. Чеботарь^{1,3}

¹Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, кафедра генетики и молекулярной биологии, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина

²Институт орошаемого земледелия НААН Украины, сел. Надднепрянское, Херсон, 73483, Украина

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

АЛЛЕЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ГЕНОВ СИСТЕМ *PPD-1* И *VRN-1* В СОРТАХ ОЗИМОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ИНСТИТУТА ОРОШАЕМОГО ЗЕМЛЕДЕЛИЯ НААН УКРАИНЫ

Резюме

Целью данной работы было определение аллельного состояния генов системы *Ppd-1* и *Vrn-1* в 13 сортах мягкой озимой пшеницы Института орошаемого земледелия НААН Украины (ИОЗ) и сопоставление данных молекулярно-генетического анализа с данными полевых исследований. Для достижения этой цели ставили следующие **задачи**: 1) определить аллельное состояние генов систем *Ppd-1* и *Vrn-1* в генотипах сортов мягкой пшеницы, созданных в ИОЗ; 2) провести сбор данных наблюдений за этапами развития (колошения и цветения) сортов пшеницы в условиях южной степи Украины и провести статистический анализ зависимости сроков колошения и цветения от аллельного состояния генов *Ppd-1* и *Vrn-1* в генотипах сортов пшеницы.

Материал. Сорта пшеницы мягкой озимой селекции ИОЗ. **Методы.** Выделение ДНК, аллель-специфическая и гнездовая ПЦР, электрофорез продуктов амплификации, однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

Результаты. По системе *Ppd-1* во всех сортах ИОЗ детектирован доминантный аллель *Ppd-D1a*, в локусах *Ppd-A1* и *Ppd-B1* определены рецессивные аллели *b*. Сочетание мутаций в нуклеотидной последовательности гена *Ppd-D1* указывает на то, что исследованные сорта относятся к гаплотипу VII. По системе *Vrn-1* сорта являются носителями рецессивного генотипа. В генотипах сортов не детектировано увеличение копий гена *Ppd-B1*. Исследованные сорта являются раннеспелыми и не имеют достоверных различий по срокам колошения и цветения, что хорошо согласуется с результатами молекулярно-генетического анализа систем генов *Ppd-1* и *Vrn-1*, которые контролируют продолжительность вегетационного периода растений пшеницы.

Ключевые слова: озимая мягкая пшеница; ПЦР-анализ; *Ppd-1*; *Vrn-1*; CNV; чувствительность к фотопериоду; яровизационная потребность.

A. O. Bakuma¹, G. O. Chebotar¹, U. O. Lavrinenko², S. V. Chebotar^{1,3}

¹Odesa National Mechnykov University, Department of Genetics and Molecular Biology,

2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine

²Institute of irrigated agriculture of NAAS, Naddniprianske village, Kherson 73483, Ukraine

³Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine
3, Ovidiopolska doroga str., Odesa, 65036, Ukraine

ALLELIC STATUS OF THE *PPD-1* AND *VRN-1* GENETIC SYSTEMS IN WINTER WHEAT VARIETIES OF THE INSTITUTE OF IRRIGATED AGRICULTURE OF NAAS UKRAINE

Abstract

The aim of the current investigation was to determine the alleles of the genes of *Ppd-1* and *Vrn-1* systems in 13 bread winter wheat varieties created in the Institute of Irrigated Agriculture of the National Academy of Sciences of Ukraine (IIA) and to compare the data of the molecular genetic analysis with the data of field research. To accomplish this goal, the following **tasks** were set: 1) to determine the allelic state of the genes of the systems *Ppd-1* and *Vrn-1* in the genotypes of bread wheat varieties created in the IIA; 2) to collect the data of observations at stages of development (heading and flowering) of wheat varieties in the conditions of the Southern steppe of Ukraine and (3) to carry out a statistical analysis of the dependence of the periods of heading and flowering on the allelic composition of genes *Ppd-1* and *Vrn-1* in the genotypes of wheat varieties.

Material. Varieties of winter bread wheat created in IIA. **Methods.** DNA extraction, allele-specific and nested PCR, electrophoresis of amplification products, one-way dispersion analysis (ANOVA).

Results. By the *Ppd-1* system in all IIA varieties dominant *Ppd-D1a* allele was detected, recessive alleles *b* were identified in *Ppd-A1* and *Ppd-B1* loci. The combination of mutations in the nucleotide sequence of the *Ppd-D1* gene indicates that the studied varieties belong to the haplotype VII. By the *Vrn-1* system, the varieties are carriers of a recessive genotype. No increase in the number of *Ppd-B1* gene copies was detected in the genotype of the variety. The varieties investigated are early and do not have any significant differences in terms of heading and flowering, which corresponds to the results of the molecular-genetic analysis of *Ppd-1* and *Vrn-1* genes that control the duration of the vegetative period of wheat plants.

Key words: winter bread wheat; *Ppd-1*; *Vrn-1*; CNV; sensitivity to photoperiod, vernalization response.

References

1. Bakuma A. O., Bulavka N. V., Chebotar S. V. (2016) «*The genotypes of modern myronivsky varieties of winter wheat for Ppd-A1, Ppd-B1, Ppd-D1 genes and their sensitivity to photoperiod*» [«Genotypy suchasnyx myronivskyx sortiv ozymoyi m'yakoyi pshenyci za Ppd-A1, Ppd-B1, Ppd-D1-genamy ta yix chutlyvist' do fotoperiodu»], *Bulletin of ONU. Biology*, 21, 1(38), pp. 75–78.
2. Balashova I. A., Fayt V. I. (2015) «*Identification of alleles of the Ppd-D1 and Ppd-B1 genes of bread wheat with molecular markers: Methodical recommendations*» [«Identyfikaciya aleliv geniv Ppd-D1 i Ppd-B1 pshenyci m'yakoyi za molekulyarnymi markeramy: Metodychni rekomendaciyi»], PBGI – NCSCI, 16 p.
3. Balashova I. A., Fayt V. I. (2016) «*Development of DNA technology for identifying genes of the orthogonal series Ppd-1 of bread and durum wheat*» [«Rozrobka DNK-tekhnologij identyfikaciyi geniv ortologichnoyi seriyi Ppd-1 m'yakoyi i tverdoyi pshenycz'»], *Agricultural Biotechnology: Theoretical Developments and Implementation in Plant Selection*, Odesa: Astroprint, P. 9–19.
4. Vozhegova R. A., Malyarchuk M. P., Kokokhin S. V. et al. (2014) «*Methods of field and laboratory research on irrigated lands*» [«Metodyka pol'ovyykh i laboratornykh doslidzhen' na zroshuvanykh zemlyakh»], Kherson: Publishing house Grin D. S., 286 p.
5. Musich V. M., Pilnnev V. V., Nefyodov A. V., Rabinovich S. V. (1996) «*Photoperiodic sensitivity and adaptability of different varieties of winter wheat in the south of Ukraine*» [«Fotoperiodychna chutlyvist' ta adaptivnist' riznyx sortiv ozymoyi pshenyci na pivdni Ukrayiny»], *Implementation of potential possibilities of varieties and hybrids Selection-genetic institute in the conditions of Ukraine*, Odesa, pp. 76–83.
6. Potokina E. K., Koshkin V. A., Alekseeva E. A., Matvienko I. I., Bespalova L. A., Filobok V. A. (2012) «*Combinations of alleles of the Ppd and Vrn genes determine the heading time in common wheat varieties*» [«Kombinatiya allelev genov Ppd i Vrn i sroki kolosheniya u myagkoy pshenitsyi»], *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 16(1), pp. 77–86.
7. Stelmakh A. F., Fayt V. I. (2016) «*Winter bread wheat adaptivity may be improved by increasing photosensitivity and vernalization requirements*» [«Vozmozhnost uluchsheniya adaptivnosti ozimoy pshenitsyi putem usileniya fotoperiodizma i potrebnosti v yarovizatsii»], *Anthology of scientific treatises of Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations*, 27, pp. 103–108.
8. Stelmakh A. F., Avsenin, V. I., Kucherov V. A., Voronin A. N. (1987) «*Study of the role of genetic systems Vrn and Ppd in bread wheat*» [«Izuchenie roli geneticheskikh sistem Vrn i Ppd u myagkoy pshenitsyi»], *Questions of genetics and breeding process of grain crops of KOTs SEV, Odessa (USSR), NIIR Praga Ruzyne (ChSSR)*, Issue 3, P.125 – 132.
9. Usik L. A., Basalii G. G., Kolesnikova N. D. (2015) «*Innovative varieties of winter wheat of selection of the Institute of Irrigated Agriculture of the NAAS for irrigation conditions in the South of Ukraine*» [«Innovatsijni sorty pshenyci m'yakoyi ozymoyi selekciyi Instytutu zroshuvanogo zemlerobstva NAAN dlya umov zrosheniya Pivdnyia Ukrayiny»], *Irrigation Agriculture*, 64, pp. 139–142.
10. Fayt V. I., Balashova I. A., Fedorova V. R., Balvinska M. S. (2014) «*Identification of bread wheat Ppd-1 genotypes by hybridological and STS-PCR analysis*» [«Identyfikatsiya genotipov Ppd-1 sortov myagkoy pshenitsyi metodami geneticheskogo i STS-PTS-R analiza»], *Plant physiology and genetics*, 46, 4, pp. 325–336.
11. Filimonov V. M., Bakuma A. A., Chebotar G. A., Burdenyuk-Tarasevich L. A., Chebotar S. V. (2018) «*PCR-analysis of photoperiodous sensitivity genes in bread wheat varieties from Bilatserkovska Experimental Breeding Station*» [«PLR-analiz geniv fotoperiodychnoyi chutlyvosti u sortiv m'yakoyi ozymoyi pshenyci selekciyi Bilocerktivskoyi doslidno-selekciynoyi stanciyi»] *The Bulletin of Ukrainian Society of Geneticists and Breeders*, 16, 2, pp. 217 – 226.
12. Chebotar G. O., Chebotar S. V., Toporash M. K., Bakuma A. O., Tytschenko V. M. (2017) «*Characteristics of wheat varieties of Poltava State Agrarian Academy breeding with gene markers that determine important agronomical traits*» [«Karakterystyka sortiv pshenyci selekciyi Poltavskoyi derzhavnoyi agrarnoyi akademiyi za dopomogoyu markeriv do geniv, shho vyznachayut' vazhlyvi gospodars'ko-agronomiczni oznaky»], *The Bulletin of Ukrainian Society of Geneticists and Breeders*, 15, 2, pp. 187–195.
13. Bassam B. J., Gresshoff P. M. (2007) «*Silver staining of DNA in polyacrylamide gels*», *Nat. Protoc.*, 2, pp. 2649–2654.
14. Beales J., Turner A., Griffiths S., Snape J. W., Laurie D. A. (2007) «*Pseudo-Response Regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive Ppd-D1a mutant of wheat (Triticum aestivum L.)*», *Theor. Appl. Genet.*, 115, pp. 721–733.
15. Chen F., Gao M. X., Zhang J. H., Zuo A. H., Shang X. L., Cui D. Q. (2013) «*Molecular characterization of vernalization and response genes in bread wheat from the yellow and Huai Valley of China*», *BMC Plant Bio*, 13, pp. 199.

16. Díaz A., Zikhali M., Turner A., Isaac S. P., Laurie D. A. (2012) «Copy number variation affecting the *Photoperiod-B1* and *Vernalization-A1* genes is associated with altered flowering time in wheat (*Triticum aestivum*)». PLoS One, 7(3):e33234.
17. Dubcovsky J., Lijavetzky D., Appendino L., Tranquilli G. (1998) «Comparative RFLP mapping of *Triticum monococcum* genes controlling vernalization requirement», Theor Appl Genet, 97, pp. 968–975.
18. Fu D., Szűcs P., Yan L., Helguera M., Skinner J. S., Zitzewitz J. V. et al. (2005) «Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat», Molecular Genetics and Genomics, 273, pp. 54–65.
19. Guo Z., Song Y., Zhou R., Ren Z., Jia J. (2010) «Discovery, evaluation and distribution of haplotypes of the wheat *Ppd-D1* gene», New Phytol, 185, 3, pp. 841–851.
20. Kippes N., Debernardi J., Vasquez-Gross H. A., Akpinar B. A., Budak H., Kato K., Chao S., Akhunov E., Dubcovsky J. (2015) «Identification of the *VERNALIZATION 4* gene reveals the origin of spring growth habit in ancient wheats from South Asia», Proc Natl Acad Sci USA, 112, pp. E5401–E5410.
21. Kippes N., Guedira M., Lin L. et al. (2018) «Single nucleotide polymorphisms in a regulatory site of *VRN-A1* first intron are associated with differences in vernalization requirement in winter wheat», Molecular Genetics and Genomics, 293 (5), pp. 1231–1243.
22. Kiss T., Balla K., Veisz O., Láng L. et al. (2014) «Allele frequencies in the *VRN-A1*, *VRN-B1* and *VRN-D1* vernalization response and *PPD-B1* and *PPD-D1* photoperiod sensitivity genes, and their effects on heading in a diverse set of wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.)», Molecular Breeding, 34(2), pp. 297–310.
23. Langer S. M., Longin C. F., Würschum T. (2014) «Flowering time control in European winter wheat», Front Plant Sci, 5, pp. 537.
24. Law C. N., Worland A. J., Giorgi B. (1975) «The genetic control of ear-emergence time by chromosomes 5A and 5D of wheat», Heredity, 36, pp. 49–58.
25. Li G., Yu M., Fang T., Cao S., Carver B. F., Yan L. (2013) «Vernalization requirement duration in winter wheat is controlled by *TaVRN-A1* at the protein level», The Plant Journal, 76, pp. 742–753.
26. Murray M. G., Thompson W. F. (1980) «Rapid isolation of high molecular weight plant DNA», Nucleic Acids Res., 8 (19), pp. 4321–4326.
27. Muterko A., Kalendar R., Cockram J., Balashova I. (2015) «Discovery, evaluation and distribution of haplotypes and new alleles of the *Photoperiod-A1* gene in wheat», Plant Mol Biol, 88 (1–2), pp. 149–164.
28. Nishida H., Yoshida T., Kawakami K., Fujita M., Long B., Akashi Y., Laurie D. A., Kato K. (2013) «Structural variation in the 5' upstream region of photoperiod-insensitive alleles *Ppd-A1a* and *Ppd-B1a* identified in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.), and their effect on heading time», Molecular Breeding, 31, pp. 27–37.
29. Pervaiz Z. H., Turi N. A., Khaliq I., Rabbani M. A., Malik S. A. (2011) «A modified method for high-quality DNA extraction for molecular analysis in cereal plants», Genet. Mol. Res, 10 (3), pp. 1669 – 1673.
30. Pugsley A. T. (1971) «A genetic analysis of the spring–winter habit of growth in wheat», Australian Journal of Agricultural Research, 22 (1), pp. 21–31.
31. Shcherban A. B., Börner A., Salina E. A. (2014) «Effect of *VRN1* and *PPDD1* genes on heading time in European bread wheat cultivars», Plant Breeding, 134 (1), pp. 49 – 55.
32. Whittall A., Kaviani M., Graf R., Humphreys G., Navabi A. (2018) «Allelic variation of vernalization and photoperiod response genes in a diverse set of North American high latitude winter wheat genotypes», PLoS ONE, 13(8): e0203068.
33. Wilhelm E. P., Turner A. S., Laurie D. A. (2009) «Photoperiod insensitive *Ppd-A1a* mutations in tetraploid wheat (*Triticum durum* Desf.)», Theor Appl Genet, 118, 2, pp. 285–294.
34. Worland A. J., Börner A., Korzun V., Li W. M., Petrovic S., Sayers E. J. (1998) «The influence of photoperiod genes on the adaptability of European winter wheats», Euphytica, 100, pp. 385–394.
35. Worland A. J. (1996) «The influence of the flowering time genes on environmental adaptability in European wheats», Euphytica, 89, pp. 49–57.
36. Würschum T., Langer S. M., Longin C., Tucker M. R., Leiser W. L. (2018) «A three component system incorporating *Ppd D1*, copy number variation at *Pp dB1*, and numerous small effect quantitative trait loci facilitates adaptation of heading time in winter wheat cultivars of worldwide origin», Plant Cell Environ, 41, 6, pp. 1407–1416.
37. Xiao J., Xu S., Li C., Xu Y., Xing L. et al. (2014) «O-GlcNAc-mediated interaction between *VER2* and *TaGRP2* elicits *TaVRN1* mRNA accumulation during vernalization in winter wheat», Nature Communications, 5, (4572).
38. Zhang X. K., Gao M., Wang S., Chen F., Cui D. (2015) «Allelic variation at the vernalization and photoperiod sensitivity loci in Chinese winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.)», Front Plant Sci, 6, pp. 470.