

МОЛЕКУЛЯРНИЙ АНАЛІЗ СТРУКТУРИ ГЕНІВ *PPD-1* СОРТІВ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ СЕЛЕКЦІЇ БІЛОЦЕРКІВСЬКОЇ ДОСЛІДНО-СЕЛЕКЦІЙНОЇ СТАНЦІЇ

Філімонов В.М.¹, Бакума А.О.¹, Чеботар Г.О.¹,
Бурденюк-Тарасевич Л.А.², Чеботар С.В.¹

¹ Одеський національний університет імені І.І. Мечникова

² Білоцерківська дослідно-селекційна станція, с. Мала Вільшанка, Україна

Гени *Ppd-1* обумовлюють чутливість рослин до довжини дня. Рецесивні алелі *b* генів *Ppd-A1*, *Ppd-B1*, *Ppd-D1* присутні в генотипах рослин, які характеризуються сильною чутливістю до фотоперіоду, зазвичай такі рослини проявляють високу адаптивність до жорстких погодних умов зимівлі, при цьому мають низькі темпи розвитку навесні, а також спостерігається зниження продуктивності таких генотипів у порівнянні з сучасними сортами інтенсивного типу [Бакума та ін., 2016]. Згідно даних молекулярно-генетичного аналізу, мутації, що призводять до зменшення чутливості рослин до фотоперіоду знаходяться в генах *Ppd-A1* та *Ppd-D1* і пов'язані з делеціями 1085 п.н. та 2089 п.н. в області промотора, відповідно. Інсерція транспозонного елемента 308 п.н. в області промотора [Nishida et al., 2013] призвела до появи *Ppd-B1a* алелю. Також для цього гену характерний поліморфізм за числом копій (CNV), який в даній роботі не досліджувався. Окрім зазначених мутацій в структурі гену *Ppd-D1* наявні інші мутації, наприклад вставка TE в 1 інтроні, делеція розміром 5 п. н. в сьомому екзоні та інсерція розміром 16 п. н. у восьмому екзоні, які також можуть впливати на чутливість рослин до фотоперіоду. Комбінації зазначених мутацій дозволили розробити класифікацію і відносити рослини до тих чи інших гаплотипів за геном *Ppd-D1* [Beales et al., 2007; Guo et al., 2010; Chen et al., 2013].

Сучасні українські сорти пшениці зазвичай характеризуються наявністю хоча б одного домінантного алеля – *Ppd-D1a*, переважно. В наших попередніх дослідженнях [Філімонов та ін., 2017] у 13 сортів пшениці Білоцерківської дослідно-селекційної станції: Водограй білоцерківський, Білоцерківська напівкарликова, Олеся, Перлина лісостепу, Ясочка, Елегія, Либідь, Царівна, Лісова пісня, Романтика, Відрада, Щедра нива, Чародійка білоцерківська детектовано *Ppd-A1b*, *Ppd-B1b*, *Ppd-D1a* алелі. В цьому дослідженні вибірка сортів була розширена – додано ще три сорти: Дріада-1, Русса та Легенда білоцерківська.

Метою даної роботи було дослідження алельного стану генів системи *Ppd-1* у сортів м'якої озимої пшениці селекції Білоцерківської дослідно-селекційної станції та визначення гаплотипів за геном *Ppd-D1*. ДНК виділяли з етиольованих паростків за допомогою СТАВ-буферу [Сиволап та ін., 1999]. Для детекції алелів генів фотоперіодичної чутливості та гаплотипів за геном *Ppd-D1* використовували алель-специфічні праймери розроблені Beales et al. [2007], Guo et al. [2010] та Chen et al. [2013]. Фракціонування та візуалізацію продуктів ампліфікації проводили в 2 % агарозному та 7 % поліакриламідному гелях.

При проведенні ПЛР з алель-специфічними праймерами до гену *Ppd-A1* у сортів Дріада-1, Русса та Легенда білоцерківська, були отримані фрагменти розміром 299 п.н., що свідчить про відсутність делеції, в області промотора, і

відповідає рецесивному алелю *Ppd-A1b*. У зазначених сортів також детектований *Ppd-B1b* алель. Продукт ПЛР 1292 п.н. свідчить про відсутність вставки в промоторному регіоні цього гена. За геном *Ppd-D1* у сорта Легенда білоцерківська з алель-специфічними праймерами детектовано фрагмент ампліфікації 414 п.н., що відповідає рецесивному алелю *b*. У сортів Русса та Дріада-1 тестували фрагмент ампліфікації розміром 288 п.н., що свідчить про наявність делеції 2089 п.н. перед кодуючою ділянкою. Наявність цієї делеції є мажорним маркером нечутливості до фотоперіоду.

В нашому дослідженні проводили також визначення мутацій в інших регіонах гену *Ppd-D1* та визначали гаплотипи цього гена на основі класифікації запропонованої Beales et al. [2007], Guo et al., [2010] та Chen et al., [2013]. Так, при проведенні ПЛР з праймерами *Ppd-P3*, отримані продукти ампліфікації розміром 320 п. н., що свідчить про відсутність інсерції розміром 16 п.н. у восьмому екзоні в генотипах досліджених сортів. З праймерами *Ppd-P5* лише у сорта Легенда білоцерківська детектували продукт ампліфікації розміром 1005 п.н., що на молекулярному рівні відповідає відсутності TE інсерції в першому інтроні.

В результаті гніздової ПЛР з праймерами *Ppd-P6* та *Ppd-P7*, у всіх сортів крім сорту Легенда білоцерківська, тестували продукти ампліфікації однакового розміру – 184 п.н., що свідчить про відсутність делеції розміром 5 п.н. в 7 екзоні гену *Ppd-D1*. У сорта Легенда білоцерківська детектовано фрагмент розміром 179 п.н., тобто наявна делеція розміром 5 п.н. у сьомому екзоні кодуючої частини гена *Ppd-D1*.

На основі даних ПЛР-аналізу 15 сортів м'якої озимої пшениці селекції БДСС, були віднесені до VII гаплотипу за геном *Ppd-D1*, для якого характерна наявність TE й інсерція 5 п.н. у 7 екзоні, відсутність 16 п.н. у 8 екзоні та делеція 2089 п.н. перед кодуючим регіоном. Сорту Легенда білоцерківська притаманна відсутність 16 п.н. у 8 екзоні, відсутність TE інсерції та делеція 5 п.н. у 7 екзоні гену *Ppd-D1*, що дозволило віднести його до IV гаплотипу.