

УДК 633.11+581.1.035.2:526

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ЭФФЕКТЫ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА *Ppd-B1* ПО ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫМ ПРИЗНАКАМ РЕКОМБИНАНТНО-ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ

В.И. ФАЙТ, Е.А. ПОГРЕБНЮК, И.А. БАЛАШОВА, А.Ф. СТЕЛЬМАХ

Селекционно-генетический институт—Национальный центр семеноведения и
сортовидчения Национальной академии аграрных наук Украины
65036 Одесса, Овидиопольская дорога, 3
e-mail: faygen@ukr.net

Идентифицированы генотипы 64 рекомбинантно-инбредных линий F_9 пшеницы Оренбургская 48//Cappelle Desprez/2B Chinese Spring по аллелям гена *Ppd-B1*, исследовано влияние аллельных различий данного гена на скороспелость, урожай и его компоненты. У 39 рекомбинантно-инбредных линий и у линии Cappelle Desprez/2B Chinese Spring был выявлен доминантный аллель *Ppd-B1c*, у 22 линий и сорта Оренбургская 48 — рецессивный аллель *Ppd-B1b*. Установлено, что наличие в генотипе доминантного аллеля *Ppd-B1c* способствует сокращению продолжительности периода до колошения, формированию достоверно больших показателей коэффициента хозяйственного использования, морозостойкости в январе и марте, массы зерна с колоса, массы тысячи зерен и урожая зерна.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., рекомбинантно-инбредные линии, фотопериод, аллель *Ppd-B1c*, генотип, колошение, урожай.

Фотопериодическая чувствительность является одним из важнейших факторов, определяющих различия пшеницы по адаптивности и продуктивности в конкретных регионах выращивания [21, 22, 27]. В климатических условиях Среднего Запада США генотипы со слабой фотопериодической чувствительностью имели преимущество по адаптивности и ряду агрономических признаков по сравнению с сильно чувствительными [25]. В условиях Южной Европы (бывшая Югославия) слабая чувствительность к фотопериоду обеспечивала повышение урожая на 35 %, Центральной Европы (Германия) — на 15 %, а в Англии данный показатель варьировал от + 9 в более сухое и теплое лето до -8 % при типичном прохладном и влажном лете [29]. В степи Причерноморья слабая фотопериодическая чувствительность способствовала более полному использованию весенних запасов влаги, интенсивному накоплению биологического урожая, его более полной реализации [5], а также «уходу» от поражения бурой ржавчиной [3]. В условиях Лесостепи Украины слабо-чувствительные сорта, в отличие от сильночувствительных, избегают засуху в период налива зерна и повреждение жуком кузькой [9]. Вместе с тем слабая фотопериодическая чувствительность приводит к снижению адаптивного потенциала генотипа к условиям осенне-зимнего периода, что выражается в снижении морозостойкости сортов такого типа во всех зонах Украины [4, 13], а в зоне Лесостепи, кроме того, увеличивается вероятность поражения корневыми гнилями [8]. Указанные факты свиде-

© В.И. ФАЙТ, Е.А. ПОГРЕБНЮК, И.А. БАЛАШОВА, А.Ф. СТЕЛЬМАХ, 2017

тельствуют о важной роли чувствительности к продолжительности освещения в определении различий по адаптивности и продуктивности в разных регионах выращивания пшеницы.

В контроле различий по реакции на продолжительность освещения показано участие трех главных генов: *Ppd-A1*, *Ppd-B1*, *Ppd-D1*, которые локализованы на коротких плечах хромосом второй гомеологической группы — соответственно 2A, 2B и 2D [18]. Принято считать, что ген *Ppd-D1* в большей мере способствует сокращению продолжительности периода до колошения по сравнению с геном *Ppd-B1*, а тем более с *Ppd-A1* [26, 29]. Вместе с тем, по мнению ряда авторов, эффект гена *Ppd-B1* или *Ppd-A1* может быть равен таковому *Ppd-D1* [13, 17, 28].

Доминантный аллель гена *Ppd-D1* (*Ppd-D1a*), обеспечивающий существенное снижение реакции на фотопериод, отличается от рецессивного аллеля (*Ppd-D1b*) делецией в промоторе 2089 пн, выявляемой с помощью аллельспецифической полимеразной цепной реакции (ПЦР) [16].

Снижение чувствительности к фотопериоду у доминантных по гену *Ppd-B1* растений обусловлено наличием в геноме нескольких функциональных копий данного гена, что приводит к количественным изменениям в характере его суточной экспрессии [19]. Указанный ген имеет один, два, три или четыре аллеля (копии), которые обозначаются соответственно *Ppd-B1b*, *Ppd-B1d*, *Ppd-B1a*, *Ppd-B1c*. Ген, представленный одной копией, является рецессивным, а при наличии двух, трех и четырех копий — доминантным.

Слабая фотопериодическая чувствительность большинства сортов озимой пшеницы в Европе [23] и на юге Степи Украины [10] контролируется доминантным аллелем *Ppd-D1a*. Аллельные различия по гену *Ppd-D1* обусловливали до 58 % фенотипического разнообразия по продолжительности периода до колошения в наборе сортов озимой пшеницы Европы [23] и 33 % — в наборе рекомбинантно-инбредных линий (РИЛ) в условиях Степи Северного Причерноморья Украины [12]. В то же время аллельные различия гена *Ppd-B1* обусловливали лишь 3,2 % фенотипического разнообразия по указанному признаку в наборе сортов озимой пшеницы Европы, а количество сортов-носителей доминантных аллелей данного гена было незначительным [23]. Среди сортов озимой пшеницы Украины доминантный аллель *Ppd-B1c* выявлен только у сорта Бригантина, который одновременно является и носителем гена *Ppd-D1a* [1]. Вместе с тем наличие в генотипе сорта доминантного гена *Ppd-B1* в условиях Англии обеспечивало прирост урожая на 6 % по сравнению с таковым у сортов с аллелем *Ppd-D1a* [29]. Отмечается, что использование в селекции доминантных аллелей гена *Ppd-B1* будет способствовать созданию более адаптированных и продуктивных сортов озимой пшеницы и в Степи Северного Причерноморья Украины по сравнению с распространенными сегодня в регионе сортами-носителями аллеля *Ppd-D1a* [11].

С учетом вышесказанного, целью данного исследования являлись идентификация рекомбинантно-инбредных линий комбинации скрещивания Оренбургская 48//Cappelle Desprez/2B Chinese Spring и оценка эффектов аллелей *Ppd-B1c*, *Ppd-B1b* по ряду хозяйствственно-ценных признаков.

Методика

В качестве исходного материала использовали 64 РИЛ F_9 от скрещивания сорта Оренбургская 48 и рекомбинантно-замещенной по 2B хромо-

соме линии сорта Cappelle Desprez. Сорт Оренбургская 48 и линия Cappelle Desprez/2B Chinese Spring различались в полевых условиях по высоте растений, дате колошения, количеству колосков главного колоса, опушению колосковых чешуй и другим признакам [7]. Из более 190 РИЛ, созданных методом ОСП (одного семени потомство, SSD — single seed descent), при предварительном изучении были отобраны 64 линии, сочетающие во всех возможных комбинациях указанные различия, для дальнейшего изучения степени влияния таковых на формирование элементов структуры урожая и других хозяйствственно-ценных признаков в естественных условиях.

С целью изучения эффектов различий аллелей гена *Ppd-B1* семена РИЛ и родительских форм высевали в 2010—2012 гг. (22, 12 и 4 октября соответственно) на делянках площадью 3 м² по 500 всхожих зерен на 1 м² на опытном участке отдела общей и молекулярной генетики СГИ. Повторность опыта трехкратная. Во время вегетации отмечали дату колошения при наличии на делянке 75 % выколосившихся растений, которую затем трансформировали в продолжительность периода до колошения. Точной отсчета служила календарная дата 1 мая. При уборке у 30 растений каждой линии (по 10 с повторности) учитывали: высоту растений, продуктивную кустистость, количество и массу зерен колоса, массу 1000 зерен, массу зерна и соломы с растения для расчета $K_{хоз}$, а также количество продуктивных стеблей на единицу площади и урожай зерна с делянки.

Морозостойкость оценивали на стадии проростков при -12 °С, а также путем промораживания при температуре $-13\ldots-14$ °С раскустившихся в полевых условиях растений [15]. В последнем случае во второй декаде января или в первой декаде марта (в зависимости от наличия снежного покрова) отбирали в поле по 75—90 растений каждой линии генотипа (по 25—30 растений из каждой повторности). Зимостойкость (процент перезимовавших растений) определяли подсчетом растений на стадии трех листьев осенью и весной после возобновления вегетации.

Для оценки уровня фотопериодической чувствительности семена 64 РИЛ, сорта Оренбургская 48 и линии Cappelle Desprez/2B Chinese Spring проращивали при комнатной температуре. Пятисуточные проростки подвергали 50-суточной яровизации в камере КНТ-1 при 2 °С и освещении в течение 12 ч светом интенсивностью 3 клк. После завершения яровизации проростки 26 апреля высаживали в 5 л сосуды, по десять растений в каждом, и выращивали на вегетационной площадке в условиях естественной продолжительности дня (от 14 ч 20 мин до 15 ч 46 мин) и в условиях искусственно сокращенного до 10 ч дня. Для определения продолжительности периода до колошения отмечали колошение индивидуальных растений при появлении верхушки главного колоса из влагалища флагового листа. Критерием оценки степени фотопериодической чувствительности служила разница (d) между продолжительностью периода до колошения конкретного образца в условиях искусственно сокращенного и естественного дней.

Для идентификации генотипов родительских сортов и 64 РИЛ по аллелям генов *Ppd-D1* и *Ppd-B1* использовали мультиплексную ПЦР (табл. 1), разработанную на основе полиморфизма ДНК промоторной зоны гена *Ppd-D1*. Маркером наличия делеции 2089 пн и соответственно аллеля *Ppd-D1a* является фрагмент ДНК размером 288 пн, а интактного промотора и аллеля *Ppd-D1b* — 414 пн [16]. Маркирование аллелей

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ЭФФЕКТЫ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА *Ppd-B1*

ТАБЛИЦА 1. Праймеры для проведения ПЦР-анализа и размер фрагментов амплификации для маркирования аллелей *Ppd-D1a*, *Ppd-D1b*, *Ppd-B1a*, *Ppd-B1c*

Аллель	Праймер	Последовательность	Размер фрагмента, пн
<i>Ppd-D1a/Ppd-D1b</i>	Ppd-D1_F	acgcctcccactactgt	288/414
	Ppd-D1_R1	cactggtagctgagatt	
	Ppd-D1_R2	tgtggtaaacagagagc	
<i>Ppd-B1c</i>	PpdB1_2copyL	taactgctcgatcacaagtgc	425
	PpdB1_2copyR	ccggaaacctgaggatcatc	
<i>Ppd-B1a</i>	PpdBson_L	ccaggcgagtgtatcacaca	223
	PpdBson_R	gggcacgttaacacacctt	

Ppd-B1a и *Ppd-B1c* проводится при использовании двух ПЦР-тестов. Первый дает возможность выявить наличие трехкопийного мутанта, второй разработан для детекции четырехкопийного *Ppd-B1c*. Маркером аллеля *Ppd-B1a* является фрагмент размером 223 пн, аллеля *Ppd-B1c* — 425 пн [19].

ДНК экстрагировали из проростков или зерен методом СТАВ [2]. Амплификацию осуществляли на приборе Терцик («ДНК-технология», Россия). Параметры проведения STS-ПЦР — согласно публикациям [16, 20].

Состав реакционной смеси объемом 20 мкл для STS-анализа: 50 мМ KCl; 20 мМ *tris*-HCl, pH 9,0; 1,5 мМ MgCl₂; 0,01 % Твин-20; 0,15 мМ каждого NTP; 0,2 мКМ каждого праймера; 10–20 нг ДНК; 0,8–1 ед. Таq-полимеразы. Продукты амплификации фракционировали в 10 %-м полиакриламидном геле. Визуализацию продуктов амплификации в ПААГ проводили путем их окрашивания 0,012 М AgNO₃. Молекулярную массу продуктов амплификации определяли относительно маркеров pUC18/MspI.

Статистическую обработку данных выполняли по общепринятым методикам расчета среднеарифметической, *t*-критерия и дисперсионного анализа [6].

Метеорологические условия за период проведения исследований включали весь спектр лимитирующих факторов среды, распространенных в Степи Украины, что обеспечило объективную оценку исходного материала по усредненной адаптивности к данным условиям.

Результаты и обсуждение

Сопоставление продолжительности периода до колошения (ПДК) родителей и 64 РИЛ комбинации Оренбургская 48//Cappelle Desprez/2B Chinese Spring дает основание утверждать о существенных различиях исследуемых генотипов по указанному признаку в условиях естественного и укороченного дней (табл. 2). Так, в условиях естественного дня колошение растений сорта Оренбургская 48 отмечали на 59,6±0,81 сут, а линии Cappelle Desprez/2B Chinese Spring — на 47,8±1,56 сут, что на 11,8±1,76 сут раньше от первого родителя. В условиях укороченного дня колошение линии Cappelle Desprez/2B Chinese Spring наблюдали на 61,7±0,73 сут, а растения сорта Оренбургская 48 даже не формировали трубки до окончания эксперимента (98 сут). В то же время фотoperиод

ТАБЛИЦА 2. Генотипы по аллелям гена *Ppd-B1*, фотопериодическая чувствительность (*d*) и продолжительность периода до колошения рекомбинантно-инбредных линий Оренбургская 48//*Cappelle Desprez/2B Chinese Spring* при выращивании растений в условиях естественного (ЕД) и укороченного (УД) дня, сут

Линия, сорт	Генотип	УД	ЕД	<i>d</i>
CD	<i>Ppd-B1c</i>	61,7±0,73	47,8±1,56	13,9±1,72
Ор.	<i>Ppd-B1b</i>	н/к	59,6±0,81	38,4±0,81
10	<i>Ppd-B1c</i>	65,4±0,60	46,8±0,20	18,6±0,63
59	<i>Ppd-B1c</i>	73,7±1,46	54,8±0,58	18,9±1,57
23	<i>Ppd-B1c</i>	71,7±0,18	52,6±1,03	19,1±1,05
148	<i>Ppd-B1c</i>	72,0±0,77	52,6±0,24	19,4±0,81
96	<i>Ppd-B1c</i>	66,6±1,17	46,2±0,58	20,4±1,31
14	<i>Ppd-B1c</i>	72,0±0,32	50,8±0,20	21,2±0,38
92	<i>Ppd-B1c</i>	73,0±0,63	51,8±0,49	21,2±0,80
121	<i>Ppd-B1c</i>	77,2±0,20	56,0±1,30	21,2±1,32
24	<i>Ppd-B1c</i>	72,0±0,00	50,0±0,32	22,0±0,32
29	<i>Ppd-B1c</i>	72,0±0,45	49,8±0,49	22,2±0,67
108	<i>Ppd-B1c</i>	81,0±0,95	58,8±0,49	22,2±1,07
112	<i>Ppd-B1c</i>	77,0±0,00	54,4±1,50	22,6±1,50
71	<i>Ppd-B1c</i>	75,0±1,10	52,3±0,18	22,7±1,11
65	<i>Ppd-B1c</i>	74,7±0,48	51,3±0,19	23,4±0,52
40	<i>Ppd-B1c</i>	73,4±1,99	50,0±0,00	23,4±1,99
50	<i>Ppd-B1c</i>	71,0±0,32	47,2±0,37	23,8±0,49
57	<i>Ppd-B1c</i>	77,3±0,18	53,3±0,19	24,0±0,26
44	<i>Ppd-B1c</i>	69,3±0,58	45,2±0,20	24,1±0,61
45	<i>Ppd-B1c</i>	72,6±1,17	48,4±0,51	24,2±1,28
13	<i>Ppd-B1c</i>	74,4±1,29	50,2±0,20	24,2±1,31
60	<i>Ppd-B1c</i>	72,0±1,38	47,8±0,20	24,2±1,39
131	<i>Ppd-B1c</i>	72,8±0,66	48,4±0,75	24,4±1,00
33	<i>Ppd-B1c</i>	75,0±0,63	50,3±0,37	24,7±0,73
136	<i>Ppd-B1c</i>	72,6±2,29	47,8±0,58	24,8±2,36
94	<i>Ppd-B1c</i>	73,3±1,02	48,4±0,68	24,9±1,23
181	<i>Ppd-B1c</i>	85,0±0,63	60,0±0,45	25,0±0,77
56	<i>Ppd-B1c</i>	73,3±0,73	48,2±0,37	25,1±0,82
133	<i>Ppd-B1c</i>	76,4±0,24	51,2±0,20	25,2±0,31
111	<i>Ppd-B1c</i>	74,8±1,24	49,6±0,40	25,2±1,30
5	<i>Ppd-B1c</i>	73,3±1,50	47,6±0,24	25,7±1,52
28	<i>Ppd-B1c</i>	74,8±1,36	49,0±0,45	25,8±1,43
124	<i>Ppd-B1c</i>	82,0±0,55	56,1±1,62	25,9±1,71
161	<i>Ppd-B1c</i>	79,8±0,46	53,8±1,24	26,0±1,32
90	<i>Ppd-B1c</i>	90,0±1,26	64,0±0,95	26,0±1,58
105	<i>Ppd-B1c</i>	77,0±0,32	50,8±0,58	26,2±0,66

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ЭФФЕКТЫ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА *Ppd-B1*

Окончание табл. 2

Линия, сорт	Генотип	УД	ЕД	<i>d</i>
17	<i>Ppd-B1c</i>	74,8±0,20	48,8±0,16	26,0±0,26
139	<i>Ppd-B1c</i>	75,0±0,32	48,6±0,40	26,4±0,51
36	<i>Ppd-B1c</i>	80,5±1,11	52,6±0,40	27,9±1,18
122	<i>Ppd-B1c</i>	н/к	63,7±2,41	33,3±2,41
98	<i>Ppd-B1b</i>	77,4±0,40	57,0±1,05	20,4±1,12
117	<i>Ppd-B1b</i>	79,8±4,60	57,2±0,20	22,6±4,60
146	<i>Ppd-B1b</i>	78,8±1,11	56,0±0,32	22,8±1,16
109	<i>Ppd-B1b</i>	76,8±0,58	53,2±0,76	23,6±0,96
165	<i>Ppd-B1b</i>	84,2±0,73	59,8±0,49	24,4±0,88
89	<i>Ppd-B1b</i>	83,2±3,29	57,5±0,27	25,7±3,30
140	<i>Ppd-B1b</i>	82,0±1,22	55,0±1,05	27,0±1,61
39	<i>Ppd-B1b</i>	75,8±1,66	48,8±0,37	27,0±1,70
35	<i>Ppd-B1b</i>	86,3±3,10	59,0±0,32	27,3±3,12
164	<i>Ppd-B1b</i>	83,5±3,93	55,8±0,73	27,7±4,00
118	<i>Ppd-B1b</i>	86,8±4,60	58,2±0,37	28,6±4,61
80	<i>Ppd-B1b</i>	87,2±4,44	58,4±0,60	28,8±4,48
185	<i>Ppd-B1b</i>	88,0±4,10	59,0±0,63	29,0±4,15
31	<i>Ppd-B1b</i>	80,8±1,16	51,6±0,40	29,2±1,23
143	<i>Ppd-B1b</i>	88,0±4,48	57,0±0,00	31,0±4,48
74	<i>Ppd-B1b</i>	87,4±4,39	55,8±1,66	31,6±4,69
97	<i>Ppd-B1b</i>	87,8±4,90	54,7±0,66	33,1±4,94
153	<i>Ppd-B1b</i>	н/к	63,7±0,80	34,3±0,80
166	<i>Ppd-B1b</i>	н/к	63,6±1,17	34,4±1,17
177	<i>Ppd-B1b</i>	н/к	59,2±1,28	34,6±3,53
38	<i>Ppd-B1b</i>	н/к	59,3±0,66	38,7±0,66
151	<i>Ppd-B1b</i>	н/к	57,0±0,63	41,0±0,63
58	<i>Ppd-B1c/Ppd-B1b</i>	61,6±1,08	46,0±0,00	15,6±1,08
77	<i>Ppd-B1c/Ppd-B1b</i>	76,3±0,37	53,0±1,58	23,3±1,62
152	<i>Ppd-B1c/Ppd-B1b</i>	н/к	63,0±1,00	35,0±1,00

П р и м е ч а н и е. CD — Capelle Desprez/2B Chinese Spring; Ор. — Оренбургская 48
н/к — растения в данном варианте опыта не колосились.

дическая чувствительность (*d* — разница между продолжительностью ПДК в условиях укороченного и естественного дней) линии Capelle Desprez/2B Chinese Spring составляла 13,9±1,72, сорта Оренбургская 48 — более 38,4 сут.

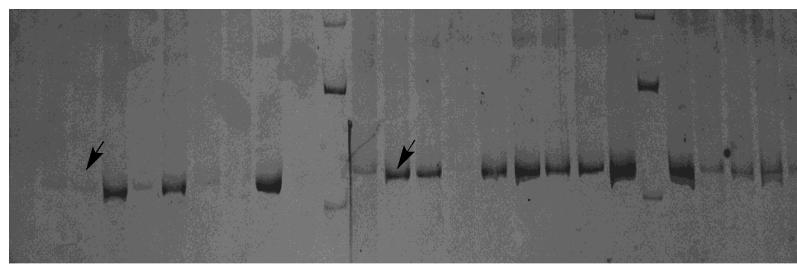
Колошение РИЛ, полученных от скрещивания двух указанных генотипов, отмечали в условиях естественного фотопериода от 45,2±0,20 (РИЛ 44) до 64,0±0,95 (РИЛ 90) сут. Следовательно, размах варьирования составлял 18,8 сут и значительно превышал таковой между родителями. Сокращение продолжительности дня до 10 ч приводило к задерж-

ке колошения и увеличению разнообразия по этому признаку. Более скороспелые линии в данном варианте колосились на $61,6 \pm 1,08$ (РИЛ 58), а более поздние (РИЛ 90) — на $90,0 \pm 1,26$ сут или вообще не колосились (линии 38, 122, 151, 152, 153, 166, 177). Размах варьирования в условиях укороченного дня составлял более 28,4 сут. Реакция (*d*) линий на сокращение продолжительности дня составляла от $15,6 \pm 1,08$ (РИЛ 58) до 41,0 сут (РИЛ 151), что находится в пределах значений признака родителей. Следует отметить, что ПДК в условиях укороченного дня коррелирует с таковой в условиях естественного дня ($r = 0,88$ при $P = 0,01$) и с уровнем фотопериодической чувствительности *d* ($r = 0,89$ при $P = 0,01$). Связь ПДК в условиях естественного дня и фотопериодической чувствительности *d* была значительно меньше ($r = 0,57$ при $P = 0,01$).

Маркерным анализом выявлено наличие в генотипе обоих родителей РИЛ — сорта Оренбургская 48 и линии Cappelle Desprez/2B Chinese Spring — рецессивного аллеля гена *Ppd-D1*. У сорта Оренбургская 48 не выявлены мутантные аллели гена *Ppd-B1*, в то время как у линии Cappelle Desprez/2B Chinese Spring детектирован аллель *Ppd-B1c* (рисунок), донором которого является сорт Chinese Spring.

Таким образом, различия по фотопериодической реакции РИЛ, полученных скрещиванием указанных двух генотипов, скорее всего обусловлены влиянием аллелей гена *Ppd-B1*. Согласно результатам маркерного анализа, исследованные линии можно разделить на три группы. В частности, у 39 линий (5, 10, 13, 14, 17, 23, 24, 28, 29, 33, 36, 40, 44, 45, 50, 56, 57, 59, 60, 65, 71, 90, 92, 94, 96, 105, 108, 111, 112, 121, 122, 124, 131, 133, 136, 139, 148, 161, 181) выявлен четырехкопийный аллель *Ppd-B1c*. Соответственно 22 линии (31, 35, 38, 39, 74, 80, 89, 97, 98, 109, 117, 118, 140, 143, 146, 151, 153, 164, 165, 166, 177, 185) являются носителями однокопийного *Ppd-B1b*. Три линии (58, 77, 152) оказались полиморфными по локусу *Ppd-B1*, поскольку у индивидуальных растений данных линий наблюдали как наличие маркерного продукта 425 пн, так и отсутствие такового. Полиморфизм по некоторым морфологическим признакам у отдельных РИЛ изученного набора отмечали и ранее [7].

В среднем линии-носители аллеля *Ppd-B1c* колосились на $51,5 \pm 0,70$ и $75,4 \pm 0,94$ сут соответственно в условиях естественного и укороченно-



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26

Электрофорограммы продуктов амплификации ДНК родителей и рекомбинантно-инбредных линий Оренбургская 48//Cappelle Desprez/2B Chinese Spring с использованием STS-ПЦР:

1 — РИЛ 118; 2 — РИЛ 117; 3 — Оренбургская 48; 4 — РИЛ 50; 5 — РИЛ 80; 6 — РИЛ 181; 7 — РИЛ 185; 8 — РИЛ 97; 9 — РИЛ 36; 10 — РИЛ 35; 11, 21 — маркер pUC19/MspI; 12 — РИЛ 136; 13 — Cappelle Desprez/2B Chinese Spring; 14 — РИЛ 57; 15 — РИЛ 146; 16 — РИЛ 40; 17 — РИЛ 92; 18 — РИЛ 124; 19 — РИЛ 133; 20 — РИЛ 148; 22 — РИЛ 122; 23 — РИЛ 105; 24 — РИЛ 71; 25 — РИЛ 23; 26 — РИЛ 29; стрелками указано наличие фрагмента длиной 425 пн и отсутствие такового

го дня. Колошение линий, рецессивных по *Ppd-B1b*, отмечали соответственно на $57,1 \pm 0,72$ и $86,5 \pm 1,57$ сут. В то же время отдельные линии с аллелем *Ppd-B1c* в генотипе колосились в условиях как естественного, так и укороченного дня значительно позже некоторых линий носителей *Ppd-B1b*. Разница по ПДК между указанными группами линий в условиях естественного дня составляла $5,6 \pm 1,00$ из 18,8 сут общих различий между линиями, а укороченного — $11,1 \pm 1,83$ из более 28,4 сут в данном варианте опыта. Вместе с тем фотопериодическая чувствительность (разница по ПДК между естественным и укороченным днем) у линий с четырехкопийным *Ppd-B1c* составляла в среднем $23,9 \pm 0,45$ сут, у носителей однокопийного *Ppd-B1b* — $29,2 \pm 1,12$ сут. Согласно полученным данным, задержка колошения в условиях укороченного дня у *Ppd-B1b*-генотипов составляла от 20,4 до более 41 сут, у *Ppd-B1c*-генотипов — от 18,6 до 33,3 сут. Следовательно, у ряда исследованных линий уровни фотопериодической чувствительности сопоставимы, независимо от наличия доминантного или рецессивного гена *Ppd-B1*. Можно предположить, что фенотипическое проявление признака обусловлено сочетанием разных аллелей по всем трем генам *Ppd*, принимающим участие в контроле различий по реакции на продолжительность дня. Так, у сорта Оренбургская 48 в локусе *Ppd-D1* выявлен рецессивный аллель *Ppd-D1d*, который отличается от *Ppd-D1b* наличием мутации в экзоне 7 [1]. У сорта Cappelle Desprez рецессивный аллель гена *Ppd-D1* имеет инсерцию транспозона в инtronе 1, что влияет на активность кодируемого протеина. В локусе *Ppd-A1* данного сорта выявлена мутация в 5–6 экзонах, которая приводит к образованию нефункционального *Ppd-A1*-белка [24]. В какой мере указанные мутации локусов *Ppd-D1* и *Ppd-A1* влияют на темпы развития до колошения до настоящего времени детально не изучено. Несомненно, идентификация линий с помощью маркерного анализа даст возможность в дальнейшем оценить эффекты различных мутаций генов *Ppd-1* и в более полной мере охарактеризовать различия РИЛ по продолжительности периода до колошения.

Сопоставление линий изученного набора свидетельствует о существенной роли аллелей *Ppd-B1c* и *Ppd-B1b* в определении различий по комплексу хозяйственно-ценных признаков. С помощью дисперсионного анализа полученных данных выявлено достоверное влияние ($P < 0,001$) климатических условий года на все изучаемые признаки. Вместе с тем влияние генотипа (генетических различий между субнаборами линий с аллелями *Ppd-B1c* или *Ppd-B1b*) существенно ($P < 0,001$) для пяти оцениваемых признаков: ПДК, масса зерна с колоса, масса тысячи зерен, коэффициент хозяйственного использования, урожай зерна. Взаимодействие факторов «год» и «генотип» было достоверным ($P \leq 0,05$) для двух признаков: количество зерен с колоса и масса тысячи зерен.

Наличие в генотипе РИЛ доминантного аллеля *Ppd-B1c* достоверно приводило к сокращению ПДК на 2,7 сут (табл. 3), увеличению массы зерна с колоса на 0,10 г, массы тысячи зерен на 2,6 г, повышению коэффициента хозяйственного использования на 0,05 по сравнению с *Ppd-B1b*-генотипами. Урожай зерна РИЛ — носителей аллеля *Ppd-B1c* составлял $0,342 \text{ кг}/\text{м}^2$ и превышал таковой на $0,035 \text{ кг}/\text{м}^2$ у линий с аллелем *Ppd-B1b* ($0,307 \text{ кг}/\text{м}^2$).

При искусственном промораживании раскустившихся растений, отобранных с поля в январе 2011 и 2013 гг. (-14°C) и марте 2011 г. (-13°C) для РИЛ с аллелем *Ppd-B1c* характерна достоверно большая мо-

ТАБЛИЦА 3. Средние значения хозяйствственно-ценных признаков групп рекомбинантно-инбредных линий Оренбургская 48//Cappelle Desprez/2B Chinese Spring — носителей различных аллелей гена *Ppd-B1*

Генотип	Зим., %	ПДК, сут	ВР, см	ПК, шт.	КЗК, шт.	МЗК, г	МТЗ, г	КПС, шт/м ²	$K_{\text{хоз}}$	УЗ, кг/м ²
<i>Ppd-B1c</i>	80,1	15,0	110	1,7	26,7	0,96	33,5	426	0,51	0,342
<i>Ppd-B1b</i>	75,4	17,7	108	1,7	26,0	0,86	30,9	439	0,46	0,307
$F_{\text{расч}}$	2,52	92,30	1,09	0,93	1,87	23,53	43,64	2,14	11,29	19,57
$HCP_{0,05}$		0,56				0,04	0,79		0,03	0,02

П р и м е ч а н и е. Зим. — зимостойкость; ПДК — продолжительность периода до колошения (от даты 1 мая); ВР — высота растений; ПК — продуктивная кустистость; КЗК — количество зерен с колоса; МЗК — масса зерна с колоса; МТЗ — масса тысячи зерен; КПС — количество продуктивных стеблей; $K_{\text{хоз}}$ — коэффициент хозяйственного использования биомассы; УЗ — урожай зерна; $F_{\text{табл}} = 3,84$, достоверно при $P \leq 0,05$.

ТАБЛИЦА 4. Морозостойкость (%) живых растений) групп рекомбинантно-инбредных линий Оренбургская 48//Cappelle Desprez/2B Chinese Spring — носителей различных аллелей гена *Ppd-B1*

Фаза развития	Год	$t, ^\circ\text{C}$	Генотип		$F_{\text{расч}}$	$HCP_{0,05}$
			<i>Ppd-B1c</i>	<i>Ppd-B1b</i>		
Кущение	январь	2011	-14	39,5	18,4	13,42
		2013	-14	71,3	34,1	26,05
	март	2011	-13	53,5	36,2	10,08
		2012	-13	84,4	82,8	0,22
Проростки		2012	-12	15,2	13,0	0,54
		2013	-12	11,7	8,4	3,27

П р и м е ч а н и е: $F_{\text{табл}} = 3,99$ при $P \leq 0,05$.

морозостойкость соответственно на 21,1; 37,2 и 17,3 % по сравнению с линиями генотипа *Ppd-B1b* (табл. 4). В марте 2012 г. и при промораживании проростков различия групп линий с различными аллелями гена *Ppd-B1* были недостоверными, но тенденция сохранялась.

Таким образом, идентифицированы рекомбинантно-инбредные линии F₉ комбинации скрещивания Оренбургская 48//Cappelle Desprez/2B Chinese Spring. В генотипе линии Cappelle Desprez/2B Chinese Spring и 39 РИЛ имеется аллель *Ppd-B1c*, сорта Оренбургская 48 и 22 РИЛ — аллель *Ppd-B1b*, 3 линии оказались полиморфными.

Наличие в генотипе РИЛ аллелей *Ppd-B1c* способствовало сокращению продолжительности периода до колошения на 5,6 сут в условиях удлиненного дня, на 11,1 сут в условиях укороченного дня, на 2,7 сут в полевых условиях, повышению коэффициента хозяйственного использования, морозостойкости в январе и марте, увеличению массы зерна с колоса, массы тысячи зерен и урожая зерна по сравнению с линиями, у которых указанные аллели отсутствуют. Аллельное состояние гена *Ppd-B1* у исследованных линий не влияло на высоту растений, продуктивную кустистость, количество зерен с колоса, количество продуктивных стеблей и зимостойкость.

1. Балашова І.А., Файт В.І. Ідентифікація алелів генів *Ppd-D1* і *Ppd-B1* пшениці м'якої за молекулярними маркерами: Методичні рекомендації. — Одеса: СГІ—НЦНС, 2015. — 16 с.
2. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях / Под ред. Ю.М. Сиволапа. — К.: Аграрна наука, 1998. — С. 34—40.
3. Лысенко С.Ф. Селекция сортов озимой пшеницы интенсивного типа в условиях юга Украины: Дис. ... д-ра с.-х. наук (в форме научного доклада): 06.01.05 / Лысенко Савелий Филиппович. — Одесса, 1988. — 47 с.
4. Моргун В.В., Ляшок А.К., Григорюк І.П. Сучасний стан проблеми терморезистентності озимої пшениці у зв'язку з глобальними змінами клімату // Физиология и биохимия культ. растений. — 2003. — 35, № 6. — С. 463—493.
5. Мусіч В.М., Пильнєв В.В., Нєфьодов О.В., Рабінович С.В. Фотоперіодична чутливість та адаптивність різних сортів озимої пшениці на півдні України // Реалізація потенційних можливостей сортів та гібридів Селекційно-генетичного інституту в умовах України. — Одеса, 1996. — С. 76—83.
6. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. — М.: Колос, 1973. — 327 с.
7. Стельмах А.Ф., Файт В.І., Погребняк О.О. Створення наборів рекомбінантно-інbredних ліній у озимої м'якої пшениці // Зб. наук. праць СГІ—НЦНС. — Одеса. — 2009. — Вип. 14 (54). — С. 9—18.
8. Тищенко В.Н., Чекалин Н.М., Москаленко В.И. Эколого-генетический подход к оценке зимостойкости озимой пшеницы в условиях Полтавщины // Зерновые и кормовые культуры. — Зерноград, 2002. — С. 253—255.
9. Удачин Р.А., Косов В.Ю. Биологические особенности озимой мягкой пшеницы в связи с селекцией на скороспелость и продуктивность // Рекомбинационная селекция в Сибири. — Новосибирск, 1989. — С. 44—54.
10. Файт В.І., Балашова І.А., Федорова В.Р., Бальвинская М.С. Ідентифікація генотипів *Ppd-1* сортів пшеници мягкої методами генетического і STS-ПЦР аналіза // Физиология растений и генетика. — 2014. — 46, № 4. — С. 325—336.
11. Файт В.І. Використання у селекції озимої пшениці домінантних алелів генів *Vrd2* та *Ppd-B1a* // Наука в Південному регіоні України. Важливі досягнення наукових установ Південного регіону України в галузі фундаментальних, прикладних досліджень та інноваційної діяльності / Під ред. С.А. Андронаті. — Одеса: Зовнішпрекламсервіс, 2010. — С. 52.
12. Файт В.І. Влияние аллелей генов *Vrd1*, *Ppd-D1* и *Rht8* на биологические и хозяйственno-ценные признаки у рекомбинантно-инbredных линий пшеницы // Зб. наук. праць СГІ—НЦНС. — Одеса. — 2011. — Вип. 18 (58). — С. 15—27.
13. Файт В.І. Морозостійкість і урожайність окремих сортів озимої м'якої пшениці // Вісн. аграрної науки. — 2005. — № 11. — С. 25—29.
14. Файт В.І., Федорова В.Р., Балашова І.А., Стельмах А.Ф. Продолжительность периода до колошения и тест на аллелизм *Ppd*-линий различного происхождения // Цитология и генетика. — 2006. — 40, № 1. — С. 27—36.
15. Феоктістов П.О., Гаврилов С.В., Ляшок А.К. та ін. Методологічні принципи оцінки озимої пшениці на терморезистентність у умовах півдня України: Методичні рекомендації. — К.: Видавничий центр НАУ, 2006. — 36 с.
16. Beales J., Turner A., Griffiths S. et al. A pseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. — 2007. — 115. — P. 721—733.
17. Bentley A.R., Horsnell R., Werner C.P. et al. Short, natural, and extended photoperiod response in BC2F4 lines of bread wheat with different Photoperiod-1 (*Ppd-1*) alleles // J. Exp. Bot. — 2013. — 64 (7). — P. 1783—1793.
18. Borner A., Worland A.J., Plaschke J. et al. Pleiotropic effects of genes for reduced height (Rht) and day-length insensitivity (Ppd) on yield and its components for wheat grown in middle Europe // Plant Breed. — 1993. — 111. — P. 204—216.
19. Diaz A., Zikhali M., Turner A. et al. Copy number variation affecting the Photoperiod-B1 and Vernalization-A1 genes is associated with altered flowering time in wheat (*Triticum aestivum*) // PLoS One. — 2012. — 7, N 3. — P. 33—34.
20. Feng Chen, Manxia Gao, Jianghua Zhang et al. Molecular characterization of vernalization and response genes in bread wheat from the Yellow and Huai valley of China // Plant Biol. — 2013. — 13. — P. 1—12.
21. Karen Cane, Eagles H.A., Laurie C. et al. *Ppd-B1* and *Ppd-D1* and their effects in southern Australian wheat // Crop. Pasture Sci. — 2013. — 64. — P. 100—114.
22. Kolev S., Ganeva G., Christov N. et al. Allele variation in loci for adaptive response and plant height and its effect on grain yield in wheat // Biotechnol. — 2010. — 24 (2). — P. 1807—1813.

23. Langer Simon M., Friedrich C. H. Longin, Tobias Würschum. Flowering time control in European winter wheat // *Front. Plant Sci.* — 2014. — 5. — P. 1–11. doi: 10.3389/fpls.2014.00537
24. Lindsay M. Shaw, Adrian S. Turner, Laurence Herry et al. Mutant alleles of photoperiod-1 in wheat (*Triticum aestivum* L.) That confer a late flowering phenotype in long days // *PLoS One*, 2013 doi: 10.1371/journal.pone.0079459
25. Marshall L., Bush R., Cholick F. et al. Agronomic performance of spring wheat isolines differing for daylength response // *Crop Sci.* — 1989. — 29, N 3. — P. 752–757.
26. Scarth R., Law C.N. The control of the daylength response in wheat by the genes 2 chromosomes // *Z. Pflanzenzucht.* — 1984. — 92, N 2. — P. 140–150.
27. Sip V., Chrpova J., Zofajova A. et al. Effects of specific Rht and Ppd alleles on agronomic traits in winter wheat cultivars grown in middle Europe // *Euphytica.* — 2010. — 172, N 2. — P. 221–233.
28. Tanio M., Kato K. Development of near-isogenic lines for photoperiod-insensitive genes, *Ppd-B1* and *Ppd-D1*, carried by the Japanese wheat cultivars and their effect on apical development // *Breed Sci.* — 2007. — 57. — P. 65–72.
29. Worland A.J., Borner A., Korzun V. et al. The influence of photoperiod genes on the adaptability of European winter wheats // *Euphytica.* — 1998. — 100, N 1–3. — P. 385–394.

Получено 10.10.2016

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА ЕФЕКТИ АЛЕЛІВ ГЕНА *Ppd-B1* ЗА
ГОСПОДАРСЬКО-ЦІННИМИ ОЗНАКАМИ
РЕКОМБІНАНТНО-ІНБРЕДНИХ ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ

В.І. Файт, О.О. Погребнюк, І.А. Балашова, А.Ф. Стельмах

Селекційно-генетичний інститут—Національний центр насіннєзвства та сортовивчення
Національної академії аграрних наук України, Одеса

Ідентифіковано генотипи 64 рекомбінантно-інbredних ліній F_9 пшениці Оренбурзька 48//Cappelle Desprez/2B Chinese Spring за алелями гена *Ppd-B1*, досліджено вплив алельних відмінностей цього гена на скоростиглість, урожай та його компоненти. У 39 рекомбінантно-інbredних ліній та лінії Cappelle Desprez/2B Chinese Spring було виявлено домінантний алель *Ppd-B1c*, у 22 ліній та сорту Оренбурзька 48 — рецесивний алель *Ppd-B1b*. Встановлено, що наявність у генотипі домінантного алеля *Ppd-B1c* сприяє скороченню тривалості періоду до колосіння, формуванню вірогідно більших показників коефіцієнта господарського використання, морозостійкості в січні та березні, маси зерна з колоса, маси тисячі зернин та урожаю зерна.

IDENTIFICATION AND EFFECTS OF ALLELES OF *Ppd-B1* GENE ON
AGRONOMICALLY VALUABLE TRAITS IN RECOMBINANT-INBRED LINES OF
WHEAT

V.I. Fayt, E.A. Pogrebnyuk, I.A. Balashova, A.F. Stelmakh

Plant Breeding and Genetics Institute—National Center of Seed and Cultivars Investigation
National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine
3 Ovidiopolska road, Odesa, 65036, Ukraine

The genotypes of 64 recombinant-inbred F_9 lines of Orenbough 48//Cappelle Desprez/2B Chinese Spring wheat cross were identified by the allele *Ppd-B1* of photosensitivity gene and there was studied the influence of the allele differences of mentioned gene on the earliness, yield and its components. *Ppd-B1c* allele was present in 39 RILs and in line Cappelle Desprez/2B Chinese Spring, while 22 RILs and Orenbough 48 cultivar had recessive *Ppd-B1b* allele. The presence of dominant *Ppd-B1c* allele in any genotype influences earlier heading, formation of significantly greater harvest index, frost resistance in January and March, weight of 1000 and spike grains, grain yield.

Key words: *Triticum aestivum* L., recombinant-inbred lines, photoperiod, allele *Ppd-B1c*, genotype, heading, yield.