

УДК 577.21

ПЛР-АНАЛІЗ ДІЛЯНКИ ПРОМОТОРУ ГЕНА *PPD-B1* У ТЕТРАПЛОЇДНОЇ ПШЕНИЦІ ВИДІВ *T. TURGIDUM*, *T. POLONICUM*, *T. CARTHLICUM*

О. Мутерко, І. Балашова, Ю. Сиволап

*Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення, Овідіопольська дорога, 3, Одеса 65036, Україна
e-mail: muterko@gmail.com*

Чутливість пшениці до фотоперіоду визначається алельним станом генів системи *Ppd-1*. Запропоновано ДНК-маркер для ідентифікації гаплогрупи, гаплотипів і ряду мутацій на ділянці промотору гена *Ppd-B1*. З використанням методів біоінформатичного аналізу за комбінаціями мутантних та інтактних алелей визначені відповідні гаплотипи. Розраховані міжалельні асоціації та досліджена філогенетична структура гаплотипів. Методом ПЛР-аналізу досліджували ділянку промотору гена *Ppd-B1* у 58 зразків трьох видів тетраплоїдної пшениці: *T. turgidum*, *T. polonicum* та *T. carthlicum* із 36-ти країн світу. Встановлена гаплогрупа та частота розповсюдженості гаплотипів за геном *Ppd-B1* у досліджуваних видів.

Ключові слова: тетраплоїдна пшениця, ген *Ppd-B1*, ПЛР-аналіз, гаплотипи, філогенез.

Чутливість пшениці до фотоперіоду є однією з найважливіших господарсько-цінних ознак, яка визначає адаптивність культури до навколишнього середовища, а саме забезпечує проходження певної фази індивідуального розвитку за найсприятливіших умов. У пшениці чутливість до тривалості світлового дня визначається алельним станом генів локусу *Ppd-1*, які локалізовані в коротких плечах хромосом другої гомеологічної групи [3, 18]. Гени *Ppd-1* належать до родини, представники якої кодують білки-регулятори відповіді типу PRR (pseudo-response regulator) [3]. Наявність CCT-домени зумовлює здатність білків *Ppd-1* конкурентно взаємодіяти з білками PRR, ZCCT та CO за зв'язування з НАР-комплексом (НАР2-НАР3-НАР5), заміщуючи у ньому субодиницю НАР2 [13, 25]. Утворений білковий комплекс *Ppd*-НАР безпосередньо зв'язується з ССААТ-боксом афекторних генів і бере участь у регуляції активності їхньої експресії, зокрема і активності локусу *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) [25], продукти експресії якого залучені в індукцію зацвітання [24].

У наш час генофонд малопоширених видів голозерної тетраплоїдної пшениці, таких як *Triticum carthlicum* Nevski., *Triticum polonicum* L. та *Triticum turgidum* L., активно використовується селекційними центрами світу як джерело багатьох агрономічно-цінних ознак. Зокрема, ці види можуть залучатися в селекційний процес як постачальник генів стійкості до ураження фузаріозом колоса [16, 20, 22], борошнистою россою [27], гесенською мухою [5, 15] тощо. Для використання певного виду як селекційного матеріалу треба володіти максимально можливою кількістю інформації стосовно генетичної різноманітності за генами, що визначають адаптивність рослини до умов навколишнього середовища. Одними з таких генів є гени системи *Ppd-1*. Наявність у геномі тетраплоїдної пшениці домінантних алелів *Ppd-B1a* або *Ppd-A1a* супроводжується зниженням фотоперіодичної чутливості рослин, у той час як гомозиготність за рецесивними алелями *ppd-B1b* та *ppd-A1b* зумовлює високу чутливість до фотоперіоду [21]. Зниження чутливості до фотоперіоду

у рослин домінантних за геном *Ppd-B1* може бути зумовлена наявністю мутацій на ділянці його промотору [14] або наявністю в геномі кількох функціональних копій цього гена [6]. Якщо мутації у промоторі вражають регуляторні сайти, то вони спричинюють якісні зміни в характері добової експресії гена *Ppd-B1* [14], тоді як збільшення кількості функціональних копій цього гена зумовлює кількісні зміни [6]. Тому актуальним є дослідження ділянки промотору гена *Ppd-B1* на предмет присутності мутацій, наявність яких може позначитися на регуляції експресії цього гена. У зв'язку з цим метою роботи є молекулярно-генетичний аналіз ділянки промотору гена *Ppd-B1* у тетраплоїдній пшениці видів: *T. carthlicum*, *T. polonicum*, *T. turgidum*.

Матеріали та методи

Генетичним матеріалом дослідження слугували 58 зразків трьох культурних голозерних тетраплоїдних видів пшениці: *Triticum turgidum* L. (25 зразків), *Triticum polonicum* L. (20 зразків) та *Triticum carthlicum* Nevski (13 зразків), які є представниками різних еколого-географічних зон із 36-ти країн світу. Як контроль використовували сорт м'якої пшениці Chinese Spring. Генетичний матеріал наданий Національним центром зародкової плазми рослин (National Plant Germplasm System) (США) та Національним центром генетичних ресурсів рослин України.

Геномну ДНК виділяли з 3-денних паростків СТАВ-методом: лізис у СТАВ-буфері (3% СТАВ, 1.7М NaCl, 30mM Na₃EDTA, 100mM Tris-HCl (pH8.0)), депротейнізація хлороформом (1 об'єм), осадження ДНК 96% етанолом (1,5 об'єму). ПЛР-аналіз проведено з використанням пари праймерів TaPpd-B1proinF1 (CAGCTCCTCCGTTTGCTTCC) – 206bp_del_25_R1 (CCTGACTCCAAGAGGAAACATG) [23]. Реакційна суміш об'ємом 12 мкл містила: 20 mM Tris-HCl (pH 8.8); 10 mM (NH₂)₂SO₄; 2.4 mM MgCl₂; 1mM KCl; 0.1% Triton X-100; 250mкM dNTPs; 0.5mM кожного праймера; 1,5% ДМСО; 1 Од Таq-полімерази. Для запобігання випаровуванню реакційної суміші у пробірки додавали по 20 мкл парафінової олії. Для ампліфікації використовували прилад «Терцик» («ДНК-технологія», Росія) з такими параметрами: 94°C (2 хв), 30 циклів: денатурація 94°C (10 с), відпал 64°C (15 с), елонгація 74°C (50 с), 3 цикли: 64°C (15 с), 74°C (50 с) та фінальна елонгація 72°C (3 хв). Продукти ампліфікації фракціонували методом електрофорезу в 6% неденатуруючому поліакриламідному гелі в буфері TBE при напрузі 13 В/см упродовж 2,3 години. Візуалізацію продуктів ампліфікації у ПАА гелях проводили шляхом їх фарбування 0,15% AgNO₃ [4].

Для проведення філогенетичного аналізу та побудови мережі гаплотипів використовували програму Network 4.6.1.1. (<http://fluxus-engineering.com>). Візуалізацію деревоподібних графів проводили у програмі Dendroscope 2.5 [12].

Результати і їхнє обговорення

Попередні дослідження молекулярної структури гена *Ppd-B1* серед видів тетраплоїдної пшениці [23] виявили на ділянці його промотору кілька нових мутацій, для чотирьох з яких були розроблені відповідні ДНК-маркери. Проте на разі відсутня інформація щодо молекулярно-генетичних маркерів, які можна було би використати для аналізу водночас кількох мутацій у промоторі гена *Ppd-B1*.

Зниження чутливості до фотоперіоду, що зумовлене наявністю домінантного алеля *Ppd-B1a1*, може бути визначене методом ПЛР-аналізу з використанням пари праймерів TaPpd-B1proinF1–TaPpd-B1proinR1 [14], яка фланкує ділянку промотора -892 – -580 та детектує інсерцію розміром 308 п.н. Пара праймерів 206bp_del_25_F2–206bp_del_25_R1 [23] фланкує ділянку -427 – -18 та детектує делецію у 206 п.н. У зв'язку з цим виникло припущення щодо можливості використання комбінації прямого праймера з першої пари (TaPpd-B1proinF1) та зворотного з другої (206bp_del_25_R1) для ампліфікації ділянки промотору

-892 - -18, що дало би змогу дослідити промотор гену *Ppd-B1* відразу за восьма мутаціями, а за розміром відповідних продуктів ампліфікації визначити їх комбінації.

Щоби встановити можливість використання пари праймерів TaPpd-B1proinF1–206bp_del_25_R1 для детекції мутацій на ділянці -892 – -18 гену *Ppd-B1* та прогнозування розмірів відповідних продуктів ампліфікації, розробили комп'ютерну програму та провели віртуальний ПЛР-аналіз (ПЛР *in silico*) 166 зразків нуклеотидних послідовностей генів *Ppd-B1* (*PRR-2B*) восьми видів пшениці (7-тетраплоїдних (156 зразків) та *T. aestivum* (10 зразків)) [7]. Виявлений у результаті аналізу поліморфізм у довжині продуктів ампліфікації досліджували шляхом вирівнювання послідовностей нуклеотидів, що характеризують амплікони певного розміру (рис. 1, А). Серед поліморфних за довжиною ампліконів для подальшого аналізу відбирали тільки такі, що відрізнялися на два або більше нуклеотидів. За референтну послідовність, відносно якої визначали тип мутації (делеція або інсерція), прийнята нуклеотидна послідовність гену *PRR-2B* сорту Chinese Spring. Необхідність у референтній послідовності зумовлена потребою в уніфікації досліджуваних зразків для їх подальшого аналізу. Сорт Chinese Spring утримує домінуючий алель *Ppd-B1a*, проте зниження чутливості до фотоперіоду зумовлене не мутаціями у структурі гену *PRR-2B*, а наявністю в геномі кількох функціональних копій цього гену [6]. Сама ж нуклеотидна послідовність функціональних копій гену *PRR-2B* у сорту Chinese Spring ідентична аналогічним послідовностям у сортів, які є носіями рецесивних алелів *ppd-B1* [3, 6].

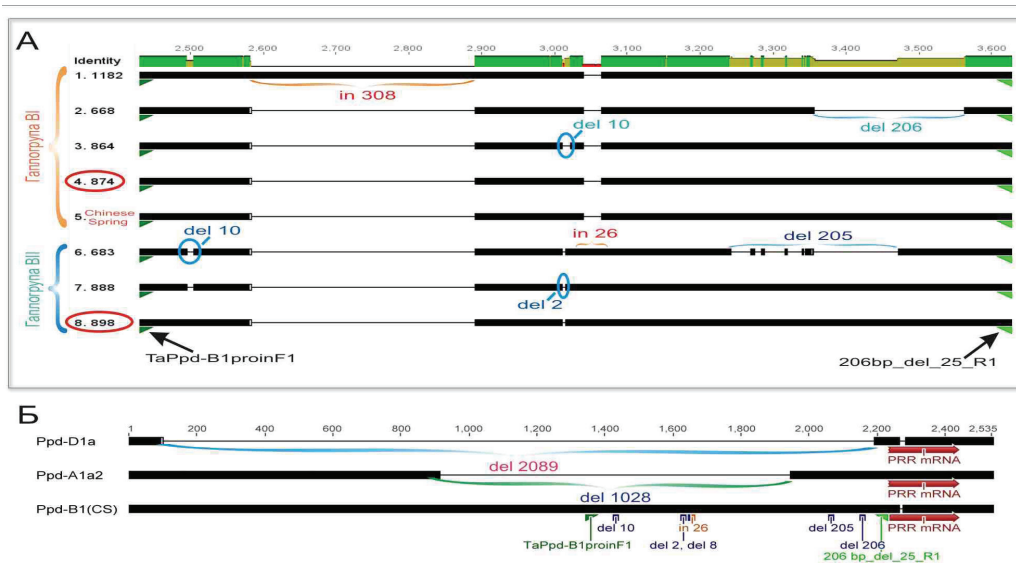


Рис. 1. А. Зіставлення вирівняних поліморфних ампліконів, виявлених під час віртуального ПЛР-аналізу. Б. Схематичне зображення делецій на ділянці промотору генів *Ppd-D1* і *Ppd-A1*, що спричиняють зниження чутливості до фотоперіоду та мутацій на аналогічній ділянці гену *Ppd-B1*.

Уперше гени *Ppd-B1* були розподілені на дві гаплогрупи (BI та BII) залежно від складу 30-нуклеотидної послідовності, що локалізована на ділянці -586 – -616 [23]. Отже, згідно з даними ПЛР *in silico* для кожної з гаплогруп можна виділити найбільш характерні продукти ампліфікації, що детектуються методом ПЛР із парою праймерів TaPpd-B1proinF1–206bp_del_25_R1, для гаплогрупи BI – це амплікон довжиною 874 п.н. (частота зустрічі у групі становить 95%), а для гаплогрупи BII – 898 п.н., з частотою зустрічі у групі 95,3%.

Під гаплотипом розуміють специфічну комбінацію алелей, які сумісно успадковуються (входять до складу однієї групи зчеплення). Під час дослідження встановлено, що більшість продуктів ампліфікації детектують не окремі мутації, а їхні певні комбінації (табл. 1). Так, згідно з результатами аналізу ПЛР *in silico* відсутні амплікони, які би засвідчували наявність окремо таких мутацій як делеції у 2, 10, 205 п.н. або інсерція у 26 п.н. в позиціях гена *PRR-2B*: -611, -811, -180 та -586 відповідно. Усі вищезазначені мутації траплялися тільки в комбінаціях між собою, що свідчить про вірогідну відсутність рекомбінаційних процесів на цій ділянці ДНК. Отже, виявлені комбінації з мутацій відповідають певним гаплотипам. Припускаємо, що оскільки мутації входять до складу однієї рекомбінаційної одиниці, то виникнення чергової мутації буде завжди асоційоване з мутаціями, які вже були присутні на цій ділянці на час дивергенції. Таким чином, зіставляючи й аналізуючи комбінації з мутацій у різних гаплотипах, можна вирахувати асоціативні зв'язки між окремими мутаціями та встановити філогенетичну структуру мережі гаплотипів.

Таблиця 1
Відповідність між довжиною продукту ампліфікації з парою праймерів TaPpd-B1proinF1–206bp_del_25_R1 та мутаціями на ділянці промотору гена *Ppd-B1*

| Розмір амлікону (п.н.) та частота | Тип мутації («-»– делеція; «+»– інсерція) відносно послідовності CS* | Локалізація мутації відносно стартового кодона послідовності CS* | Гаплогрупа |
|-----------------------------------|--|--|----------------------|
| 864 (0,6%) 874 (69,28%) | -10 – | -601 – | Гаплогрупа VI |
| 668 (2,41%) 1182 (0,6%) | -206 +308 | -88 -733 | |
| 898 (24,1%) | -2 +26 | -611 -586 | |
| 888 (0,6%) | -10 -2 +26 | -811 -611 -586 | |
| 683 (0,6%) | -10 | -811 | |
| | -2 | -611 | |
| | +26 | -586 | |
| | -205 | -180 | |

Примітка. *CS – сорт Chinese Spring.

Назви гаплотипів складаються з великої літери «В» (запропоновано авторами, які вперше дослідили гаплогрупи за геном *Ppd-B1* [23]) та цифр, що позначають розмір відповідного амплікону. До структури гаплотипів входять сім алелів, кожному з яких відповідає певна позиція промотору гена *Ppd-B1*, на якій виявлено поліморфізм у вихідній вибірці ампліконів. Для кожного гаплотипу характерна наявність мутантного або інтактного алеля. Уніфікація алелів – визначення інтактного або мутантного стану – проведена стосовно референтного гаплотипу В874 (носієм якого є сорт Chinese Spring), всі алелі якого були прийняті як інтактні. Гаплотип В874 було обрано спеціально, задля збереження типу мутацій, який встановлювали під час уніфікації нуклеотидних послідовностей досліджуваних ампліконів із референтною послідовністю амплікону сорту Chinese Spring. Назви алелів складаються з цифр, що позначають відстань від поліморфної ділянки до стартового кодона референтної послідовності гена *Ppd-B1* та великих літер, які вказують на інтактний («І») або мутантний («М») стан. Автори, які вперше дослідили гаплогрупи за геном *Ppd-B1*, за гаплотипи вважали окремі алелі поліморфних позицій цього гена [23]. Однак, наприклад, для таких алелів як 180М або 811М, у вихідній вибірці не виявлено інших комбінацій, окрім як з алелями 586М, 611М, оскільки асоційовані з ними виникли послідовно в одній філетичній лінії (рис. 2, А) в одній одиниці рекомбінації.

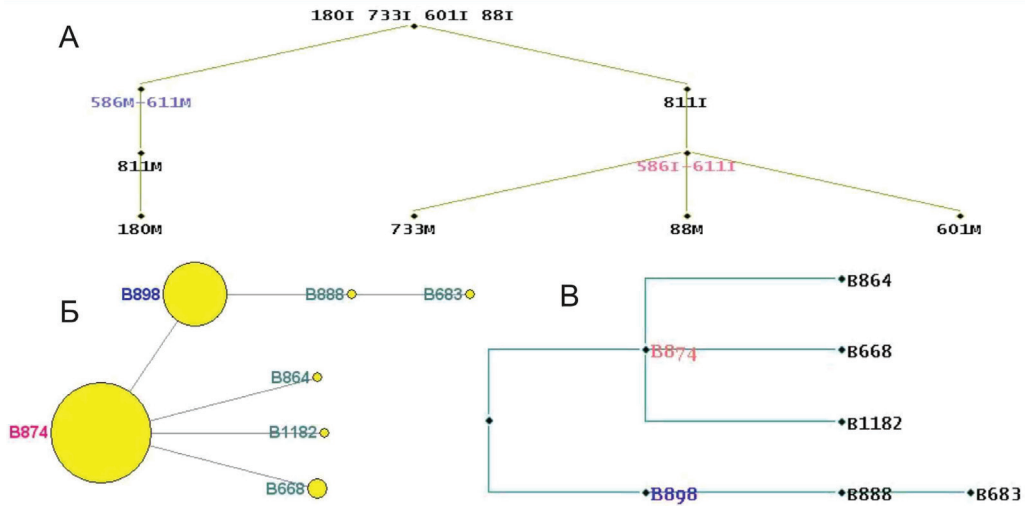


Рис. 2. Міжалельні асоціації та філогенетична структура гаплотипів за геном *Ppd-B1*: А – ієрархія міжалельних асоціацій; Б – мережа гаплотипів; В – дерево гаплотипів.

Асоціативні зв'язки між окремими алелями відображені у вигляді деревоподібного графа. Структуру міжалельних асоціацій визначали за такою технологією. Розрахунок бінарної матриці суміжності, яка відображає залежність між окремими алелями, базується на принципі, що даний алель асоційований з іншим алелем, якщо у вихідній вибірці гаплотипів він завжди трапляється тільки в комбінації з ним. Для більш наочного відображення міжалельних асоціацій матрицю суміжності представлено в аналітичному вигляді – як зв'язний ациклічний граф (дерево) з коренем. Ярусність вузлів (ієрархія вузлових рівнів) і їх упорядкування розраховане за таким алгоритмом: у перебігу ітерації вибірки всіх алелів (вузлів), згідно з матрицею суміжності порівнюються вузли, рівень яких не встановлено або він є поточним. До одного рівня зараховуються вузли, які не є початком дуги до вузлів невизначеного рівня (більш високого) або мають суміжний вузол поточного рівня. Таке упорядкування вузлів забезпечує спрямованість орієнтації ребер у напрямку кореня – дуги з верхніх ярусів спрямовані до нижніх ярусів. Дерево розраховане методом рекурсивного спуску (низхідний розбір) від вузлів вищого рівня до кореня. Корінь дерева утворений шляхом об'єднання вузлів нижчого рівня (нульового ярусу). Якщо цього не зробити, то граф буде представлено як множина компонентів зв'язності (ліс). Таким чином, асоціативний зв'язок між алелями виражений у напрямку від вузлів до кореня, в якому розташовані алелі, що об'єднують окремі дерева (компоненти зв'язності), коренем у котрих є одна з мутацій нульового ярусу.

У структурі дерева міжалельних асоціацій (рис. 2, А) можна виділити дві пари суміжних вузлів (586I-611I та 586M-611M), що означає наявність двох пар взаємозалежних алелів, утворення яких зумовлене їх одночасним виникненням або відсутністю гаплотипів у вихідній вибірці, які відповідають перехідним формам. Дерево міжалельних асоціацій дає змогу за наявністю певного алеля (мутації) прогнозувати наявність ряду інших алелів, з якими він асоційований. Велика вірогідність цього твердження базується на якості вихідної вибірки гаплотипів, відсутності рекомбінаційних процесів на ділянці локалізації алелів, за якими формують гаплотипи, та філогенетичних взаємозв'язках між досліджуваними алелями. Наприклад, алель 180M асоційований щонайменше з трьома алелями (811M, 611M, 586M), тож за наявністю делеції у 205 п.н в позиції -180 (алель 180M), мож-

на прогнозувати делеції 10 і 2 п.н. в позиціях -811 і -611 відповідно та інсерцію 26 п.н. в позиції -586 гену *Ppd-B1*. Окрім того, дерево міжалельних асоціацій надає інформацію, яка в подальшому використовується для розрахунку філогенетичної структури множини гаплотипів, дослідження їх генеалогії та вирахування гіпотетичного напрямку еволюції.

Для дослідження філогенетичних відносин між гаплотипами часто використовують їх відображення у вигляді «мережі гаплотипів» [11]. Невкорінена квазімедіанна сітка гаплотипів (рис. 2, Б) розрахована згідно з алгоритмом медіанних зв'язків (MJ) [2] та оптимізована методом максимальної парсимонії (MP) [17]. Аналогічним до мережі гаплотипів є дерево гаплотипів (рис. 2, В). Дерево гаплотипів відповідне дереву алелей, оскільки поява нової мутації (нового алеля) супроводжується виникненням нової комбінації з мутацій (алелів), а отже, і нового гаплотипа. Проте дерево неорієнтоване, оскільки не містить кореня, тому відображає лише філогенетичні відносини між гаплотипами, їх генеалогічну структуру.

У гаплогрупи об'єднують гаплотипи за наявністю спільного алеля (мутації). Тож, теоретично, вибірку гаплотипів можна розділити на дві гаплогрупи за будь-яким алелем, ґрунтуючись на його наявності або відсутності. Згідно з дивергентною моделлю еволюції, поява нової мутації (або одночасно кількох зчеплених мутацій) у вихідній послідовності супроводжується її дивергенцією на дві філогенетичні гілки (біфуркація), одна з яких утримує інтактний алель, а інша – мутантний [1]. Подальша дивергенція послідовностей супроводжується розгалуженням цих двох гілок. У зв'язку з цим за гаплогрупи прийняті дві філогенетичні гілки, що утворилися під час першої дивергенції вихідного гаплотипу (кореня). Відповідно, множина гаплотипів розподіляється по гаплогрупах залежно від наявності інтактного або мутантного алеля, за яким відбулася первинна дивергенція. Оскільки вихідний гаплотип є одним із гаплотипів первинної дивергенції, то визначити корінь, ґрунтуючись лише на філогенетичній структурі, неможливо, адже усі філогенетичні гілки беруть початок від гаплотипів первинної дивергенції. Визначення кореня базується на виявленні напрямку еволюції гаплотипів. Гіпотетичний напрям еволюції визначено відповідно до гіпотези «молекулярного годинника еволюції» [28]. Актуальність використання цієї гіпотези щодо реконструкції напрямку еволюції гаплотипів полягає в тому, що оскільки в гаплотипах відповідні алелі представлені аналогічними ділянками геному, носіями яких є представники таксонів одного (до того ж низького) рангу (рід, вид), перебувають у відносно однорідних умовах еволюції (однаковий тиск мутацій і вплив природного добору) [8], то припускається, що темп еволюції досліджуваних гаплотипів також однаковий. Отже, чим більше часу минуло з моменту виникнення гаплотипу, тим більшу він має розповсюдженість і кількість похідних гаплотипів (за однакових умов дії еволюційних факторів). Таким чином, найбільша розповсюдженість і кількість похідних гаплотипів буде притаманна саме гаплотипам, від яких утворилися гаплогрупи під час первинної дивергенції. Це твердження вірне, якщо найрозповсюдженіші гаплотипи відрізняються між собою за одним алелем або кількома зчепленими алелями, тобто розійшлися в результаті біфуркації одного вузла та мають найбільше похідних гаплотипів. Дійсно, гаплотипи В874 та В898, яким притаманна найбільша розповсюдженість і кількість похідних гаплотипів, відрізняються між собою за парою взаємопов'язаних алелей (586І-611І / 586М-611М). У зв'язку з цим припускаємо, що саме В874 та В898 є гаплотипами первинної дивергенції, в результаті якої утворилися гаплогрупи VI та VII, відповідно. Це ствердження узгоджується з попереднім встановленням гаплогруп за геном *Ppd-B1* [23]. Якщо темп еволюції гаплотипів однаковий, то серед гаплотипів первинної дивергенції вихідний гаплотип має більшу розповсюдженість і кількість похідних форм. Згідно з цим припущенням, найбільш вірогідним кандидатом загального предка (корінь дерева гаплотипів) є гаплотип В874, оскільки саме для нього

характерна найбільша розповсюдженість (69,28%) (табл. 1) і кількість похідних гаплотипів (B864, B668, B1182). У зв'язку з цим припускаємо, що первинна дивергенція відбулася одночасно за алелями 586І та 611І і спричинена виникненням делеції 2 та інсерції 26 п.н. у позиціях -611 і -586 відповідно.

Отримані в результаті віртуального ПЛР-аналізу дані засвідчили можливість використання пари праймерів TaPpd-B1proinF1-206bp_del_25_R1 для детекції гаплотипів, гаплогрупи та ряду мутацій на ділянці промотору гена *Ppd-B1*, а також надали інформацію щодо розмірів відповідних ампліконів. У зв'язку з цим проведено аналіз промотору гена *Ppd-B1* у 58 зразків трьох видів голозерної тетраплоїдної пшениці та ідентифікацію їх за гаплотипом і гаплогрупою цього гена (рис. 3).

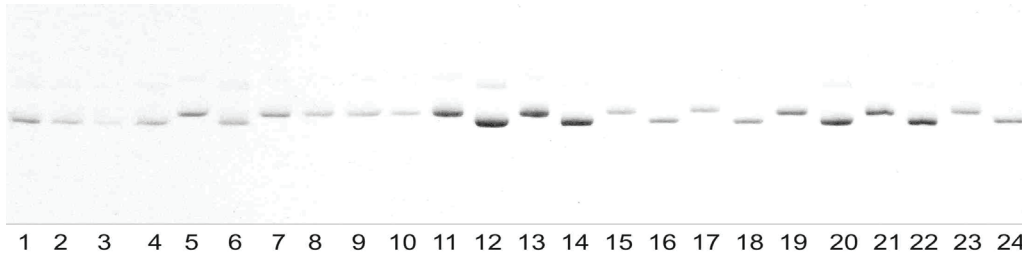


Рис. 3. Електрофореграма розподілу продуктів ампліфікації ділянки промотору гена *Ppd-B1* у тетраплоїдних видів пшениці. Зразки гаплогрупи VI (874 п.н.): 1–4, 6, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24. Зразки гаплогрупи VII (898 п.н.): 5, 7–11, 13, 15, 17, 19, 21, 23.

Встановлено, що всі досліджені зразки пшениці виду *T. carthlicum* за геном *Ppd-B1* належать до гаплогрупи VI (гаплотип B874). Однак замала вибірка (13 зразків) не дає змогу зробити висновок про те, що для даного виду характерна лише гаплогрупа VI. Більш того, попередні дослідження (вибірка 5 зразків) виявили один генотип *T. Carthlicum*, який належить до гаплогрупи VII [23]. Види *T. polonicum* і *T. turgidum* виявилися гетерогенними (табл. 2). Так вид *T. polonicum* за гаплогрупою гена *Ppd-B1* розщеплюється майже в рівному співвідношенні: 11 зразків належать до гаплогрупи VI (B874), 9 – до VII (B898). Серед зразків виду *T. turgidum* 88% утримують гаплотип B874 (VI), а 12% – B898 (VII).

Таблиця 2

Молекулярно-генетичний аналіз зразків голозерних тетраплоїдних видів пшениці за гаплогрупою гена *Ppd-B1*

| Назва виду | Ідентифікатор зразка | Довжина амплікона (п.н.) | Гаплогрупа |
|----------------------------|---|--------------------------|------------|
| <i>Triticum carthlicum</i> | PI 115817, PI 168672, PI 182471, PI 190949, PI 272521, PI 283887, PI 286070, PI 341800, PI 349040, PI 352279, PI 532502, PI 532505, PI 532512 | 874 | VI |
| <i>Triticum polonicum</i> | PI 134945, PI 167622, PI 185309, PI 208911, PI 223171, PI 306548, PI 352487, PI 352489, PI 384265, PI 585015, UA0300219 | 874 | VI |
| | PI 210845, PI 245663, PI 254214, PI 266846, PI 272564, PI 29447, PI 349052, PI 352488, IU035200 | 898 | VII |
| <i>Triticum turgidum</i> | CItr 13712, CItr 7688, PI 191579, PI 208912, PI 210372, PI 211705, PI 213571, PI 220356, PI 221422, PI 223173, PI 264954, PI 266851, PI 272496, PI 278596, PI 286075, PI 28655, PI 306561, PI 32039, PI 323440, PI 345413, PI 347135, PI 350154 | 874 | VI |
| | CItr 14445, PI 264991, PI 295011 | 898 | VII |

Мутації, що локалізовані на ділянці промотору гена *Ppd-B1*, можуть мати різноманітний вплив на фенотип рослини, і хоча вплив цей досі не досліджувався (окрім інсерції розміром 300 п.н. [14]), вони, безперечно, володіють великим потенціалом цінного генетичного ресурсу в селекції пшениці. Так, усі виявлені мутації локалізовані в критичній ділянці промотору гена *Ppd-B1* (рис. 1, Б), тобто зміни у нуклеотидній послідовності в аналогічних ділянках генів ортологічної серії *Ppd-1* викликають зміну в чутливості до фотоперіоду [3, 14, 26]. Не виключена також і плеїтропна дія мутацій на фенотип, подібно до того, як це спостерігалось у дослідженні гаплотипів за геном *Ppd-D1* [9, 10]. Тому при встановленні ефектів впливу кожного з гаплотипів можна використовувати їх для «тонкого налаштування» генотипу пшениці до умов навколишнього середовища конкретного регіону.

Слід зауважити, що пара праймерів TaPpd-B1proinF1–206bp_del_25_R1 не дає змоги детектувати делецію 914 п.н. на ділянці промотору гена *Ppd-B1* [23], оскільки ця делеція поглинає сайт праймування TaPpd-B1proinF1.

Встановлена можливість використання ПЛІР із парою праймерів TaPpd-B1proinF1–206bp_del_25_R1 для детекції маркерних фрагментів, що ідентифікують гаплотипи, гаплогрупи за геном *Ppd-B1* та мутації на ділянці його промотору. Досліджена структура міжжальних асоціацій і філогенетичні взаємозв'язки між окремими гаплотипами. Проаналізовано ділянку промотору гена *Ppd-B1* у 58 зразків трьох видів голозерної тетраплоїдної пшениці. Встановлена гаплогрупа та частота розповсюдженості гаплотипів за геном *Ppd-B1* у представників видів *T. carthlicum*, *T. polonicum* та *T. turgidum*. Ґрунтуючись на даних розповсюдженості гаплотипів В874 та В898, припускаємо можливість використання даної пари праймерів як поліморфного, кодомінантного ДНК-маркера в молекулярно-генетичному аналізі представників виду *T. polonicum*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Павлинов И. Я. Введение в современную филогенетику (кладогенетический аспект). М.: КМК, 2005. 192 с.
2. Bandelt H. J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. Vol. 16. N 1. P. 37–48.
3. 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. Vol. 115. P. 721–733.
4. Budowle B., Chakraborty R., Giusti A. M. et al. Analysis of the VNTR locus *DIS80* by the PCR followed by high-resolution PAGE // Am. J. Hum. Genet. 1991. Vol. 48. N 1. P. 137–144.
5. Carlson S. K., Patterson F. L., Gallun R. L. Inheritance of resistance to Hessian fly derived from *Triticum turgidum* L. // Crop Science. 1978. Vol. 18. N 6. P. 1011–1014.
6. 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. Vol. 7. N 3. e33234.
7. GenBank: is the NIH genetic sequence database, an annotated collection of all publicly available DNA sequences. – Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
8. Gillespie J. H. The Causes of Molecular Evolution. Oxford University Press. 2002. 352 p.
9. Guo Z., Song Y., Zhou R. et al. Discovery, evaluation and distribution of haplotypes of the wheat *Ppd-D1* gene // New Phytologist. 2010. Vol. 185. P. 841–851.
10. Huang L., Wang Q., Zhang L. Q. et al. Haplotype variations of gene *Ppd-D1* in *Aegilops tauschii* and their implications on wheat origin // Genet Resour Crop Evol. 2012. Vol. 59. P. 1027–1032.

11. Huson D., Rupp R., Scornavacca C. Phylogenetic Networks. Concepts, Algorithms and Applications. Cambridge University Press. 2010. 375 p.
12. Huson D. H., Richter D. C., Rausch C. et al. Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees // BMC Bioinformatics. 2007. Vol. 8. N 1. P. 460–466.
13. Li C., Distelfeld A., Comis A., Dubcovsky J. Wheat flowering repressor VRN2 and promoter CO2 compete for interactions with NUCLEAR FACTOR-Y complexes // Plant. 2011. Vol. 67. N 5. P. 763–773.
14. Nishida H., Yoshida T., Kawakami K. et al. 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. 2013. Vol.31. N 1. P. 27–37.
15. Nsarellah N., Amri A., Nachit M. M. et al. New durum wheat with Hessian fly resistance from *Triticum araraticum* and *T. carthlicum* in Morocco // Plant Breeding. 2008. Vol. 122. N 5. P. 435–437.
16. Oliver E. R., Cai X., Friesen L. T. et al. Evaluation of fusarium head blight resistance in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) // Crop. Sci. 2008. Vol 48. P. 213–222.
17. Polzin T., Daneschmand S. V. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs // Operations Research Letters. 2003. Vol. 31. P. 12–20.
18. Scarth R., Law C. N. The control of day-length response in wheat by the group 2 chromosomes // Z Pflanzenzuchtung. 1984. Vol. 92. P. 140–150.
19. Seki M., Chono M., Matsunaka H. et al. Distribution of photoperiod-insensitive alleles *Ppd-B1a* and *Ppd-D1a* and their effect on heading time in Japanese wheat cultivars // Breeding Science. 2011. Vol. 61. P. 405–412.
20. Singh A. K., Knox R. E., Clarke F. R. et al. Fusarium head blight QTL mapping in durum wheat and *Triticum carthlicum* sources of resistance. 11th International Wheat Genetics Symposium 2008 // Sydney University Press. 2008. P. 845–848.
21. Snape J., Laurie D., Worland A. Understanding the genetics of abiotic stress responses in cereals and possible strategies for their amelioration // Aspects of Applied Biology. 1998. Vol. 50. P. 9–14.
22. Somers D. J., Fedak G., Clarke J., Cao W. Mapping of FHB resistance QTLs in tetraploid wheat // Genome. 2006. Vol. 49. P. 1586–1593.
23. Takenaka S., Kawahara T. Evolution and dispersal of emmer wheat (*Triticum* sp.) from novel haplotypes of *Ppd-1* (photoperiod response) genes and their surrounding DNA sequences // Theor Appl Genet. 2012. Vol. 125. N 5. P. 999–1014.
24. Turck F., Fornara F., Coupland G. Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage // Annu Rev. Plant Biol. 2008. Vol. 59. P. 573–594.
25. Wenkel S., Turck F., Singer K. et al. CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis* // The Plant Cell. 2006. Vol. 18. P. 2971–2984.
26. Wilhelm E. P., Turner A. S., Laurie D. A. Photoperiod insensitive *Ppd-A1a* mutations in tetraploid wheat (*Triticum durum* Desf.) // Theor Appl Genet. 2009. Vol. 118. N 2. P. 285–294.
27. Zhu Z., Zhou R., Kong X., Dong Y., Jia J. Microsatellite markers linked to 2 powdery mildew resistance genes introgressed from *Triticum carthlicum* accession PS5 into common wheat // Genome. 2005. Vol. 48. N 4. P. 585–590.
28. Zuckerkandl E., Pauling L. B. Molecular disease, evolution, and genetic heterogeneity. In edit Kasha M., Pullman B. Horizons in Biochemistry, 1962. P. 189–225.

Стаття: надійшла до редакції 24.09.13

доопрацьована 28.10.13

прийнята до друку 29.10.13

PCR-ANALYSIS OF PROMOTER AREA *PPD-B1* GENE IN TETRAPLOID WHEAT SPECIES *T. TURGIDUM*, *T. POLONICUM*, *T. CARTHLICUM*

A. Muterko, I. Balashova, Yu. Sivolap

*Plant Breeding and Genetics Institute
National Center of Seed and Cultivar Investigation
3, Ovidiopolska Road, Odessa 65036, Ukraine
e-mail: muterko@gmail.com*

The photoperiod insensitive of wheat is defined by allelic states of genes the *Ppd-1* system. The DNA-marker for identification of haplogroup, haplotypes and mutations in promoter area *Ppd-B1* gene has been proposed. By method of bioinformatic analysis on combination of mutants and intact alleles to respectively haplotypes have been defined. Inter-alleles associations and the phylogenetic structure of haplotypes has been studied. Is investigated of promoter area *Ppd-B1* gene by PCR-analysis in 58 accessions of tetraploid wheat: *T. turgidum*, *T. polonicum* and *T. carthlicum* from 36 countries have been analysed. Haplogroup and spread frequency of haplotypes in species are investigated was defined.

Keywords: tetraploid wheat, *Ppd-B1* gene, PCR analysis, haplotypes, phylogeny.

ПЦР-АНАЛИЗ УЧАСТКА ПРОМОТОРА ГЕНА *PPD-B1* У ТЕТРАПЛОИДНОЙ ПШЕНИЦЫ ВИДОВ *T. TURGIDUM*, *T. POLONICUM*, *T. CARTHLICUM*

A. Мутерко, И. Балашова, Ю. Сиволап

*Селекционно-генетический институт – Национальный центр
семеноведения и сортоизучения
Овидиопольская дорога, 3, Одесса 65036, Украина
e-mail: muterko@gmail.com*

Чувствительность пшеницы к фотопериоду определяется аллельным состоянием генов системы *Ppd-1*. Предлагается ДНК-маркер для идентификации гаплогруппы, гаплотипов и ряда мутаций на участке промотора гена *Ppd-B1*. Методами биоинформатического анализа, по комбинациям мутантных и интактных аллелей определены соответствующие гаплотипы. Рассчитаны межаллельные ассоциации и исследована филогенетическая структура гаплотипов. Методом ПЦР-анализа исследовали участок промотора гена *Ppd-B1* у 58 образцов трёх видов тетраплоидной пшеницы: *T. turgidum*, *T. polonicum* и *T. carthlicum* из 36 стран. Установлена гаплогруппа и частота распространения гаплотипов гена *Ppd-B1* у исследованных видов.

Ключевые слова: тетраплоидная пшеница, ген *Ppd-B1*, ПЦР-анализ, гаплотипы, филогенез.