

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГЕНІВ СТІЙКОСТІ ДО ЖОВТОЇ ІРЖІ АЗІЙСЬКОГО ПОХОДЖЕННЯ У СОРТІВ І ЛІНІЙ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ

Я.В. ПІРКО¹, А.В. КАРЕЛОВ^{1,3}, Н.О. КОЗУБ^{1,3}, Б.В. ІВАЦУК¹, І.О. СОЗІНОВ³,
Т.В. ТОПЧІЙ¹, В.В. МОРГУН², Я.Б. БЛЮМ¹

¹ Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, 04123, Україна, м. Київ, вул. Осиповського, 2 а

² Інститут фізіології рослин та генетики НАН України, 03022, Україна, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17

³ Інститут захисту рослин НААН, 03022, Україна, м. Київ, вул. Васильківська, 33

E-mail: cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net

Жовта іржа, збудником якої є гриб *Puccinia striiformis* West. (синонім – *P. glumarum* Erikss. et Henn.), є небезпечним чинником, що призводить до суттєвих недоборів врожаю зерна пшениці м'якої та погіршення його якості. Останні дослідження свідчать про експансію високовірulentних штамів жовтої іржі з пригімалайського регіону та витіснення ними менш патогенних європейських рас *P. striiformis*, що становить реальну небезпеку для аграрного сектору Європи, в тому числі і України, оскільки, ймовірно, більша частина сортів пшениці, стійких до місцевих рас *P. striiformis*, є чутливими до високовірulentних штамів цього регіону. У зв'язку з цим проведено оцінку стійкості до збудника жовтої іржі 558 сортів і ліній озимої м'якої пшениці, зокрема, на інфекційному фоні – 171 та на природньому фоні 387. Зразки озимої пшениці в колекційному сортівипробуванні походили з 17 країн, але більшість були української селекції. У результаті проведеного скринінгу стійкості сортів і ліній пшениці озимої до жовтої іржі виявлено, що лише 19 (або 3 %) зразків проявили відповідну стійкість. У результаті аналізу за допомогою молекулярних маркерів стійких до жовтої іржі зразків пшениці на наявність генів *Yr10* та *Yr36* не було виявлено жодного зразку, який би містив хоча б один з цих генів. В той же час результати скринінгу за допомогою молекулярних маркерів *Xbarc8*, *S23M41-310*, *S23M41-140*, *dp269* свідчать про наявність фрагментів ДНК різних довжин, асоційованих з алелями стійкості генів *Yr5*, *Yr15* та *YrSp*, у чотирьох сортозразків української селекції.

Ключові слова: пшениця м'яка, жовта іржа, азійські раси, гени стійкості, *Yr10*, *Yr36*, *Yr5*, *Yr15*, *YrSp*, молекулярні маркери, ПЛР, скринінг.

Вступ. З-поміж існуючих грибних хвороб пшениці декілька видів іржі продовжують залишатися одними з найбільш спустошливих рослинних патогенів у світі, що призводять до ре-

гулярної втрати врожайності. Втрати врожаю зерна через ураження грибними збудниками варіюють від 10 до 70 % та можуть сягати навіть 100 %. Останнім часом вони все частіше з'являються і в Україні, зокрема, жовта іржа, збудником якої є гриб *Puccinia striiformis* West. (синонім – *P. glumarum* Erikss. et Henn.) (Novmøller et al, 2016; Topchii et al, 2019). Історично ця хвороба була відома своїми епіфітотіями в Азії і Австралії, але останнім часом деякі патотипи жовтої іржі також поширюються по європейському континенту (Novmøller et al, 2016).

Пригімалайський регіон є центром розвитку популяцій *P. striiformis* зі статеву рекомбінацією, де виникають нові високовірulentні патотипи, звідки вони і поширюються по всьому світу. Після 2011 р. в Європі було виявлено три високовірulentних патотипи жовтої іржі неєвропейського походження: «Warrior», «Kranich» і «Triticale aggressive», які витісняють місцеві штами (Liu, 2010; Xia, 2010). В Європі на сьогоднішній день переважаючою расою жовтої іржі є Warrior(-). Раси Triticale 2006 і Triticale 2016, які в цілому не вражають європейську озиму пшеницю, були ідентифіковані на тритикале та ярій пшениці, і викликали 100 % загибель нестійких сортів. Також в Європі була виявлена нова раса жовтої іржі – AF2012, вперше ідентифікована в 2012–2013 рр. в Азербайджані. Ця раса стала причиною епіфітотій в Ефіопії. За даними Глобального довідкового центру з питань іржі (GRRC), в Україні вже виявлено раси Warrior-, Triticale2006 і Triticale2015 (Wang, 2009; Dong, 2011). На відміну від *P. graminis* і *P. triticina*, вид *P. striiformis* більш пристосований до низьких температур ранньої весни, що може вплинути на його подальше поширення в Європі в зв'язку зі зміною клімату (Zhang et al, 2008).

© Я.В. ПІРКО, А.В. КАРЕЛОВ, Н.О. КОЗУБ,
Б.В. ІВАЦУК, І.О. СОЗІНОВ, Т.В. ТОПЧІЙ,
В.В. МОРГУН, Я.Б. БЛЮМ, 2021

За кліматичними умовами в Україні 72 % площ посівів пшениці сприятливі для розвитку жовтої іржі, проте проявляється вона лише на 42 % всіх посівів. У зв'язку з біологічними особливостями збудник жовтої іржі має найкращі умови для розвитку хвороби в зонах із вологим кліматом. Тому в Україні, найбільшої шкоди хвороба завдає в основному в західних областях поліської і лісостепової зон. У цих районах інфекція успішно розвивається на посівах високосприйнятливих сортів озимої пшениці, утворюючи осередки сильно уражених рослин, що сприяє її подальшому поширенню (Babaian and Chusovitina, 2011; Nargan, 2015; Torchii et al, 2019). Однак помірні епіфітотії в степовій зоні України за останні 20 років також спостерігали в 1991, 2001, 2005, 2006 і 2007 рр. Якщо раніше жовта іржа уражувала злакові двічі-тричі на десять років, то за останні 20 років частота її епіфітотій в Укра-

їні значно збільшилась (п'ять-шість) (Torchii et al, 2019).

Звичайно, основним методом для ідентифікації генів стійкості до жовтої іржі, дослідження механізмів стійкості та цілеспрямованої передачі цих генів для створення стійких форм пшениці є використання молекулярно-генетичних маркерів (Philomin et al, 2020). На даний момент відомі 78 генів стійкості до жовтої іржі (Yr-гени), (<https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2017.pdf>), що дозволяє більш ефективно використовувати арсенал різних молекулярних маркерів. Зокрема, велику кількість методик з ідентифікації потрібних послідовностей ДНК розроблено на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Спираючись на інформацію про бібліотеки кДНК урединоспор різних рас жовтої іржі та повногеномне секвенування високпатогенних рас жовтої іржі знайдено гени кандидати пов'язані

Таблиця 1. Молекулярні маркери для детекції алельних станів генів *Yr10*, *Yr15*, *Yr5*, *YrSp*, *Yr36*

Ген	Праймери	Розмір амплікону п.о.	Алельний стан	
<i>Yr5</i>	S19M93-140 (Smith et al., 2007) 5'-TAATTGGGACCGAGAGAC-3' 5'-TTCTTGACGCTCCAAAACCT-3'	100	+	
	S23M41-310 (Smith et al., 2007) 5'-TCAACGGAACCTCCAATTTTC-3' 5'-AGGTAGGTGTTCCAGCTTGC-3'	275 210	+ -	
	<i>Yr10</i>	Власний дизайн 5'-GTAGCTAAAGAGTGCTCAAAGCACA-3' 5'-CTTCTTGACTTGGGATTATACCACGA-3'	1630	+
		A1 5'-TCAAAGACATCAAGAGCCGC-3' A2 5'-TGGCCTACATGAACTCTGGAT-3'	543	+
(Singh et al., 2009) B1 5'-GTGATGATTACCCACTTCCTC-3' B2 5'-TTGGAATTGGCGACAAGCGT-3'		753	+	
<i>Yr15</i>	Xbarc8 (Somers et al., 2004) 5'-GCGGGAATCATGCATAGGAAAACAGAA-3' 5'-GCGGGGGCGAAACATACACATAAAAACA-3'	222 257	+ -	
	<i>YrSp</i>	dp269 (Feng et al., 2015) 5'-CTGCTGTCACCGCTCTCC-3' 5'-AGTCACACGCCCTACTCTCC-3'	198	+
<i>Yr36</i>	Власний дизайн 5'-CTC TAA AGC AGC ATC ACA TGG TCA-3' 5'-GAG GTT ACA TGG ATC CAG AAC ACA T-3'	484	BbsI	

зі стійкістю до *P. striiformis*. Розроблено також маркери для таких генів-кандидатів: *TabZIP1*, *NAC TaNAC4* (Walter et al, 2016), *HSP70* пшениці *TaHSC70* (Wang et al, 2009), *TaGlu* (Uauy et al, 2005), *TaPR5* (Li GQ et al, 2006) і *PstSP2C7*, *PstSP11L10* і *PstSP11P10* (Rosewarne et al, 2013).

Нові дані також дозволяють розробляти власні молекулярні маркери та використовувати їх у дослідженнях сортів, для яких інформація по цих генах відсутня. На даний час також існують молекулярні маркери для наступних генів: *YrZak*, *YrC51*, *Yr18*, *YrH52* та *Yr15* (Luo et al, 2008), *Yr26* (Sui et al, 2009), *Yr24* (Cheng et al, 2010), *Yr36* (Li et al, 2011), *YrCH42* (Herrera-Foessel et al, 2014), *Yr29* (Bansal et al, 2011), *YrAlp* (Lowe et al, 2011), *Yr41* (Walter et al, 2016), *Yr44* (Bariana et al, 2006), *Yr43* (Xie et al, 2003), *Yr45* (Li et al, 2009), *Yr46*, *Yr47*, *Yr48*, *Yr1*, *Yr5*, *Yr 10* (Walter et al, 2016).

Одним із найважливіших підходів, на якому ґрунтується селекція культурних рослин на стійкість, у тому числі і пшениці, є вивчення генофонду їх колекційних зразків різного еколого-географічного походження та на інфекційному фоні задля пошуку ефективних джерел стійкості. Причому що різноманітніший склад генів стійкості донорів, то ефективніша селекція на імунітет (Торчії et al, 2019). Метою роботи був аналіз наявності деяких генів стійкості до жовтої іржі серед стійких до жовтої іржі зразків озимої м'якої пшениці, відібраних на інфекційному фоні в польових умовах Лісостепу України.

Матеріали і методи. Колекційні зразки озимої м'якої пшениці з 17 країн світу вирощували на дослідних ділянках ІФРГ НАН України (с. Глеваха, Київська обл.), у тому числі на інфекційному фоні збудника жовтої іржі в 2016–2017 рр. Ураження рослин збудником жовтої іржі визначали окомірно на трьох верхніх листках у фазах від цвітіння до молочно-воскової стиглості зерна. Для визначення інтенсивності ураження рослин та оцінки стійкості жовтою іржею *P. striiformis* застосовували 9-бальну інтегральну шкалу, прийняту в країнах Центральної та Східної Європи (Trybel et al, 2010).

Відібрані стійкі зразки пшениці аналізували за допомогою молекулярних маркерів для низки *Yr*-генів. Для ідентифікації маркерної послідовності, асоційованої з генами стійкос-

ті, було використано праймери, послідовності яких наведені у табл. 1.

Геномну ДНК ізлювали з проростків насіння досліджуваних сортів і ліній пшениці, зокрема, УК 979 (Спасівка), УК 8402/10, УК 298, УК 3436/11, УК 26/21, УК 203 (Злука), УК 976, УК 3085 А, УК 1501, УК 297, ВБ-1/15, ВБ-4/15, Даринка Київська, Fan mai 803, Fan mai 7030, Fan mai 8, Смуглянка, НІС 064688 СА, УК 1501 (приблизно по 5–8 зерен кожного зразка) за допомогою методу ЦТАБ (цетил-триметиламонія бромід) (Sambrook et al, 2001). Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 («Applied Biosystems», США).

Таблиця 2. Частка сортів і ліній озимої пшениці різного походження, в колекційному сортопробуванні (ІФРГ НАН України, 2017 р.)

Походження	Всього, %
Україна	82,7
Німеччина	3,4
Китай	0,3
Чехія	3,4
Росія	3,2
Австрія	1,8
Туреччина	1,3
Угорщина	0,9
Румунія	0,6
Шотландія (Велика Британія)	0,5
Франція	0,5
Кіпр	0,3
Велика Британія	0,3
Сербія	0,2
США	0,2
Нідерланди	0,2
Азербайджан	0,2

Таблиця 3. Сумарне оцінювання сортів і ліній озимої пшениці на стійкість до збудника жовтої іржі (дослідне поле ІФРГ НАНУ, 2017 р.)

Розсадник	Оцінено сортозразків, шт.	Всього за 2017 рік, стійкі сортозразки (бал 7–6) до хвороб, шт.
Колекція	387	8
Інфекційний фон	171	11
Всього	558	19

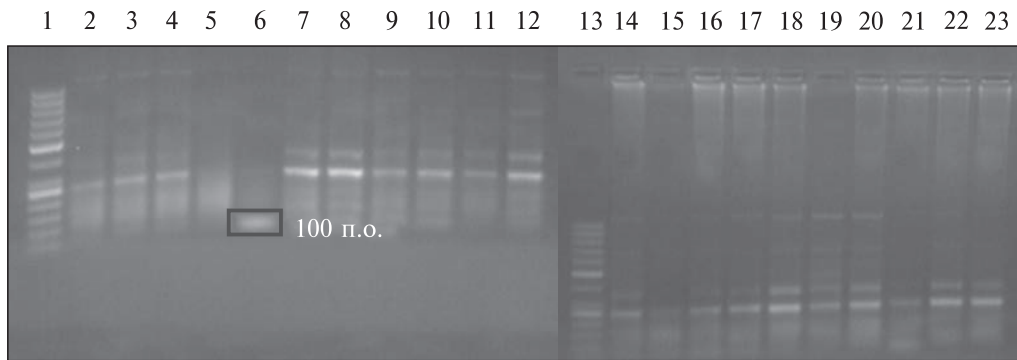


Рис. 1. Аналіз алельних станів гена *Yr5* з допомогою молекулярного маркера S19M93-140: 1, 13 – молекулярний маркер, 2 – контроль для алеля стійкості – Avocet*6/*Yr5*, 3 – Fan mai 8, 4 – УК 979 (Спасівка), 5 – УК 8402/10, 6 – Fan mai 803, 7 – УК 298, 8 – НІС 064688 СА, 9 – УК 26/21, 10 – УК 203 (Злука), 11 – УК 3085 А, 12 – УК 297, 14 – ВБ-1/15, 15 – Даринка Київська, 16 – УК 3436/11, 17 – Fan mai 7030, 18 – Смуглянка, 19 – УК 976, 20 – УК 1501 (767), 21 – УК 1501 (1028), 22 – Avocet, 23 – ВБ-4/15

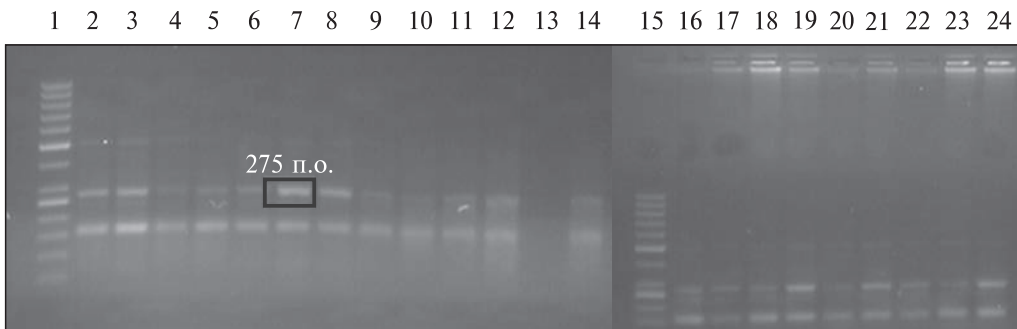


Рис. 2. Аналіз алельного стану гена *Yr5* з допомогою молекулярного маркера S23M41-310: 1, 15 – молекулярний маркер, 2 – контроль для алеля стійкості – Avocet*6/*Yr5*, 3 – Fan mai 8, 4 – УК 979 (Спасівка), 5 – УК 8402/10, 6 – УК 3436/11, 7 – УК 298, 8 – НІС 064688 СА, 9 – УК 26/21, 10 – УК 203 (Злука), 11 – УК 3085 А, 12 – УК 297, 13 – ВБ-1/15, 14 – Даринка Київська, 16 – Fan mai 803, 17 – Fan mai 7030, 18 – Смуглянка, 19 – УК 976, 20 – УК 1501 (767), 21 – УК 1501 (1028), 22 – MORO, 23 – Avocet, 24 – ВБ-4/15

Реакційна ПЛР суміш об'ємом 25 мкл містила буфер з 10 мМ Tris-HCl, 50 мМ KCl, 0,8 % (v/v) Nonidet P40, 2,5 мМ MgCl₂, 2 пМ реверсного праймеру, 2 пМ форвардного праймеру, 2 одиниці Taq полімерази, 0,2 мМ кожного з трифосфатів (ТТФ, ГТФ, АТФ, ЦТФ) та до 1 мкг геномної ДНК.

Для дослідження наявності генів стійкості та визначення їх алельних станів було застосовано власний температурний режим проведення ПЛР, специфічний для кожного окремого молекулярного маркера. Кожну ПЛР проводили як мінімум у трикратній повторності з використанням негативного контролю. Розділення отриманих фрагментів ДНК здійснювали за допомогою електрофорезу в 1,5%-ному ага-

розному гелі з додаванням бромистого етидію. Після електрофорезу гель розміщували у УФ-транслюмінаторі і фотографували.

Результати і обговорення. Оцінка стійкості до збудника жовтої іржі сортів і ліній пшениці м'якої озимої в умовах Лісостепу України. Було проведено оцінку стійкості до збудника жовтої іржі 558 сортів і ліній озимої м'якої пшениці, зокрема, на інфекційному фоні – 171 та на природньому фоні 387 (табл. 2). Зразки озимої пшениці в колекційному сортовипробуванні походили з 17 країн, але більшість були української селекції (табл. 3).

У результаті проведеного моніторингу стійкості сортів і ліній пшениці озимої до жовтої іржі було виявлено, що лише 19 (або 3%) зраз-

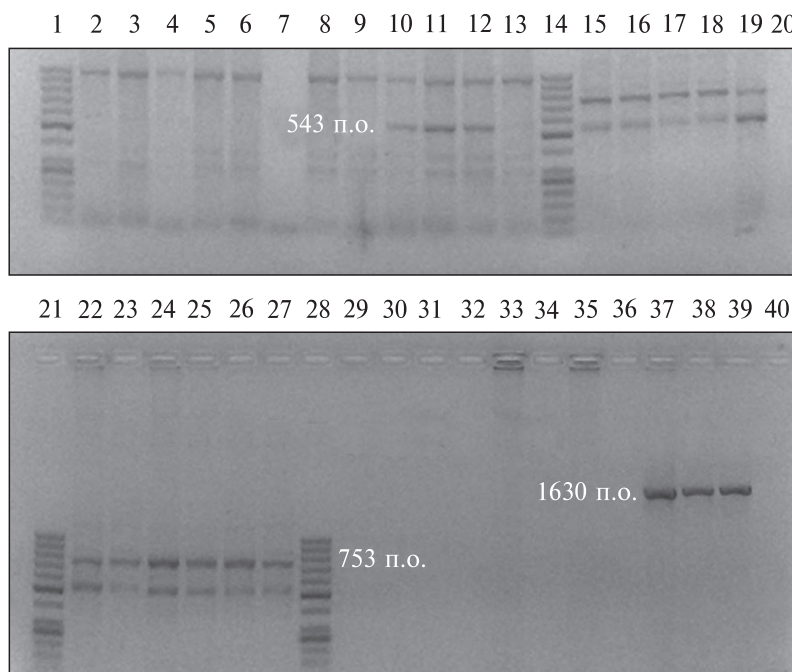


Рис. 3. Аналіз наявності гена *Yr10* в досліджуваних зразках пшениці: 1, 14, 21, 28 – ДНК-маркер, 2 – Fan mai 8, 3 – Смуглянка, 4 – Fan mai 7030, 5 – Fan mai 803, 6 – УК 298, 7 – НІС 064688 СА, 8 – УК 26/21, 9 – *T. spelta*, 10 – РІ 178383, 11 – *Yr10/6**АОС, 12 – MORO, 13 – Avocet. 15-27 та 29–40 – зразки повторюються в тому ж порядку

ків проявили стійкість (табл. 3). Зокрема, стійкими до жовтої іржі виявились зразки УК 979 (Спасівка), УК 8402/10, УК 298, УК 3436/11, УК 26/21, УК 203 (Злука), УК 976, УК 3085 А, УК 1501, УК 297, ВБ-1/15, ВБ-4/15, Даринка Київська, Fan mai 803, Fan mai 7030, Fan mai 8, Смуглянка, НІС 064688 СА, УК 1501 (1028). Останнім часом подібні дослідження проводяться на таких же великих колекціях пшениці в різних частинах світу, наприклад, колекції ярої пшениці з 616 сортів та селекційних ліній у США, оскільки жовта іржа становить ту ж саму загрозу, що і Європі (Liu et al., 2020). Для подальшого дослідження генів стійкості в цій колекції було розроблено більше 2000 SNP маркерів, нами ж було прийняте рішення використати молекулярні маркери для визначення генів, які є найбільш критичними для забезпечення стійкості до жовтої іржі азійського походження, а саме генів *Yr10*, *Yr15*, *Yr5*, *Yr36* та *YrSp*.

Детекція за допомогою молекулярно-генетичних маркерів алельних станів генів *Yr10*, *Yr15*, *Yr5*, *YrSp*, *Yr36* у вибірці стійких сортів і ліній

пшениці. Для дослідження генетичної природи стійкості до збудника жовтої іржі відібраних зразків було проведено їх аналіз з використанням молекулярних маркерів таких *Yr*-генів, як *Yr10*, *Yr36*, *Yr5*, *Yr15*, *YrSp*.

Аналіз наявності гена *Yr5*. Ген *Yr5*, який локалізований на хромосомі 2BL (Weng, 2005; Xia, 2007), походить від *Triticum spelta* var. *album* і забезпечує стійкість до великої кількості рас жовтої іржі (Li et al, 2006). Для ідентифікації цього гена використовували пару маркерів S19M93-140 та S23M41-310 (Smith et al, 2007). При використанні молекулярного маркера S19M93-140 було виявлено, що майже всі досліджувані зразки характеризуються наявністю неспецифічного фрагменту довжиною 250 п.о. Фрагмент довжиною 100 п.о., асоційований з алелем стійкості гена *Yr5*, виявлено лише у сорту Fan mai 803 (рис. 1).

За допомогою молекулярно-генетичного маркера S23M41-310 для детекції алельного стану гена *Yr5* було визначено, що зразки пшениці Fan mai 8, УК 298, НІС 064688 СА, УК 976, УК 1501, ВБ 4/15 демонструють наявність

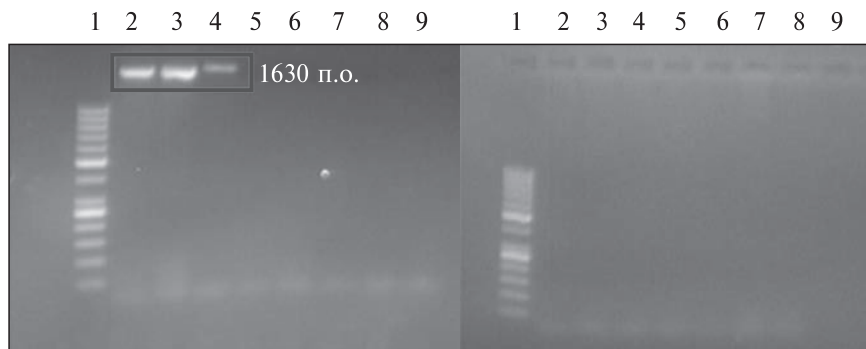


Рис. 4. Аналіз наявності гена *Yr10* в досліджуваних зразках пшениці: 1, 10 – ДНК-маркер, 2–4 – PI 178383, Yr10/6*АОС, MORO, 5–9 – УК 1501 (1028), УК 203 (Злука), Дарина Київська, УК 3085, 8402/10, 11–17 – УК 979 (Спасівка), УК 976, УК 3436/11, УК 1501 (767), ВБ 1/15, УК 297, ВБ 4/15

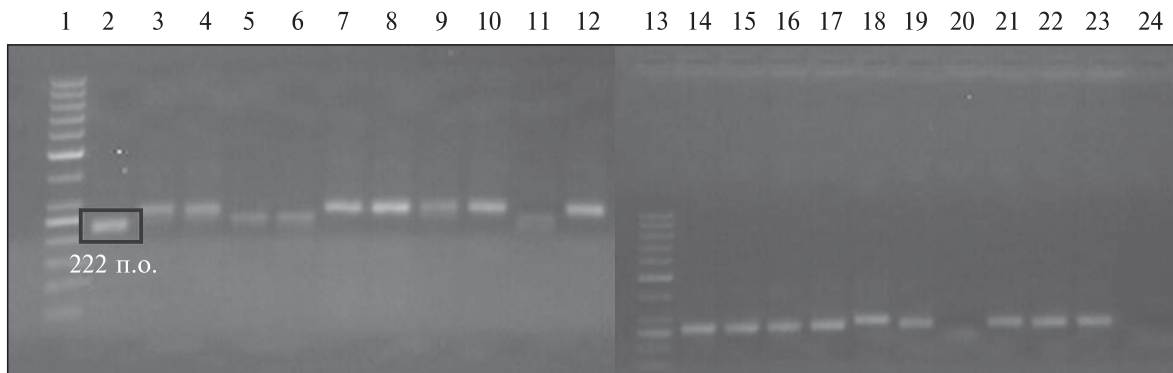


Рис. 5. Аналіз алельного стану гена *Yr15* за допомогою молекулярного маркера *Xbarc8* в досліджуваних зразках пшениці: 1, 13 – молекулярний маркер, 2 – контроль для алеля стійкості – Avocet-*Yr15*, 3 – УК 979 (Спасівка), 4 – УК 8402/10, 5 – Fan mai 7030, 6 – Fan mai 803, 7 – УК 26/21, 8 – УК 203 (Злука), 9 – Avocet, 10 – УК 976, 11 – УК 1501 (767), 12 – УК 1501 (1028), 14 – УК 297, 15 – ВБ-1/15, 16 – ВБ-4/15, 17 – Даринка Київська, 18 – УК 3436/11, 19 – УК 298, 20 – Fan mai 8, 21 – Смуглянка, 22 – НІС 064688 СА, 23 – УК 3085 А

фрагмента довжиною 275 п.о., асоційованого з алелем стійкості гена *Yr5* (рис. 2).

Аналіз наявності гена *Yr10*. Результати аналізу з використанням однієї з пар праймерів, описаних раніше (Singh et al, 2009) (продукт ПЛР – 543 п.о.) свідчать проте, що ген *Yr10* присутній лише в зразках-позитивних контролях PI 178383, Yr10/6*АОС, MORO (контрольні зразки – носії *Yr10*). Водночас, аналіз сортозразків 15–27 за допомогою іншої пари праймерів, також описаних Singh et al, 2009 (ПЛР продукт 753 п.о.) демонструє псевдопозитивний результат (рис. 3). Для детекції алельних станів гена *Yr10* також було використано ген-специфічні праймери власної розробки (табл. 1), які не продукували неспецифічних

продуктів (рис. 4). Результати аналізу з праймерами власного дизайну вказують на те, що ген *Yr10* присутній лише в контрольних зразках – PI 178383, Yr10/6*АОС та MORO.

Аналіз наявності гена *Yr15*. При використанні молекулярного маркера *Xbarc8* для детекції алельних станів гена *Yr15* було встановлено, що наявність фрагмента довжиною 222 п.о., асоційованого з алелем стійкості гена *Yr15*, демонструють лише зразки Fan mai 7030, Fan mai 803 та УК 1501, а решта зразків характеризуються наявністю фрагмента довжиною 257 п.о., асоційованого з алелем чутливості гена *Yr15* (рис. 5). *Yr15* є геном стійкості до жовтої іржі, виявленого у сортозразка G25 *T. dicoccoides*; згодом він був картований на хромосомі 1BS (Yan et

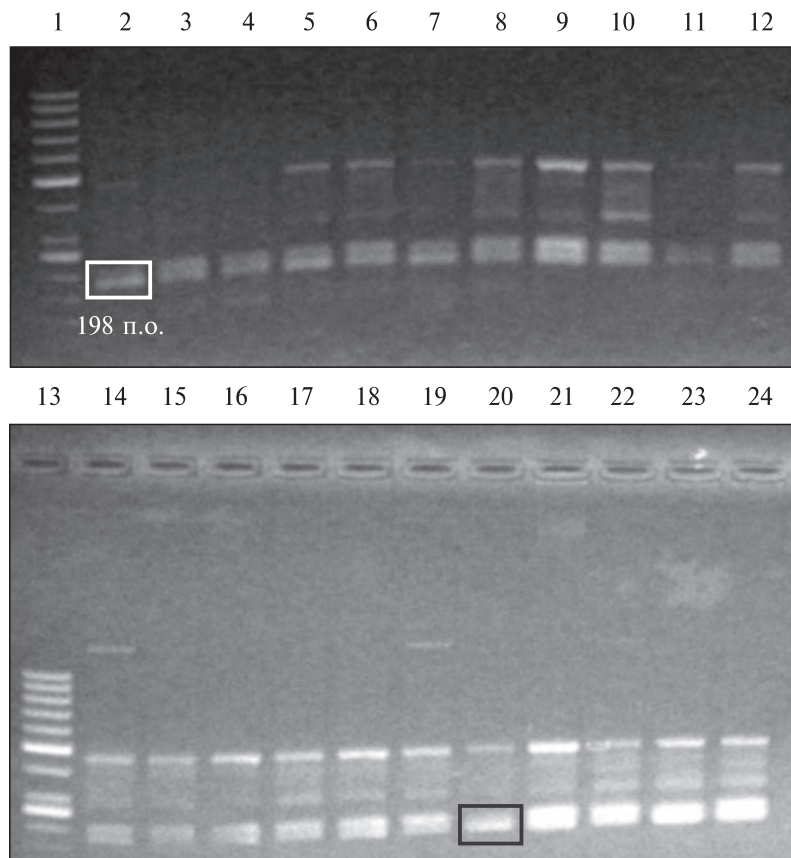


Рис. 6. Аналіз алельних станів гену *YrSp* за допомогою молекулярного маркера *dp269* в досліджуваних зразках пшениці: 1, 13 – молекулярний маркер, 2 – контроль для алеля стійкості – Spaldings Prolific, 3 – Fan mai 8, 4 – УК 979 (Спасівка), 5 – УК 8402/10, 6 – УК 1501 (767), 7 – УК 298, 8 – НІС 064688 СА, 9 – УК 26/21, 10 – УК 203 (Злука), 11 – УК 3085 А, 12 – УК 297, 14 – ВБ-1/15, 15 – Даринка Київська, 16 – Fan mai 803, 17 – Fan mai 7030, 18 – Смуглянка, 19 – УК 976, 20 – УК 3436/11, 21 – УК 1501 (1028), 22 – MORO, 23 – Avocet, 24 – ВБ-4/15

al, 2003). Було показано, що стійкість, яку забезпечує ген *Yr15*, є ефективною проти 24-х рас Pst з 18 країн всього світу, а також 26 китайських рас Pst. Сучасні дослідження вказують на те, що ген *Yr15* є ефективним також проти рас Pst, які нещодавно були виявлені в США, Австралії та Індії. Ці дані підтверджують, що *Yr15* є цінним джерелом стійкості до жовтої іржі (Yan et al, 2003).

Аналіз наявності гену *YrSp*. Ген *YrSP* першопочатково походить з пшениці сорту «Spaldings Prolific» і забезпечує стійкість до значного кола рас жовтої іржі (Yan et al, 2003). Застосовуючи молекулярний маркер *dp269* для детекції алельних станів гену *YrSp* було визначено, що позитивний контроль Spaldings Prolific та зразок УК

3436/11 характеризуються наявністю фрагменту довжиною 198 п.о., асоційованого з алелем стійкості гену *YrSp*. Решта зразків показує наявність двох фрагментів – 198 та 209 п.о. (рис. 6).

Аналіз наявності гену *Yr36*. Для детекції алельних станів гену *Yr36* в колекції досліджуваних зразків пшениці було використано генспецифічні праймери власної розробки (табл.1). Лише позитивний контроль демонструє наявність фрагмента довжиною 484 п.о., асоційованого з наявністю гену *Yr36* (рис. 7).

Таким чином, за результатами проведеного польового аналізу виявлено, що стійкими до збудника жовтої іржі є зразки пшениці м'якої озимої вітчизняної селекції УК 1501, УК 298, УК 976 та УК 3436/11 та зарубіжної селекції Fan

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

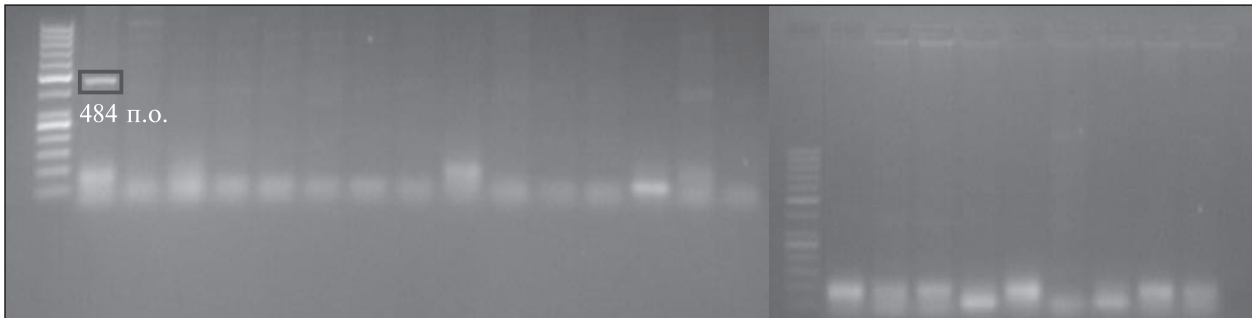


Рис. 7. Ідентифікація гена *Yr36* за допомогою праймерів власного дизайну в досліджуваних зразках пшениці. 1, 17 – молекулярний маркер, 2 – контроль для алеля стійкості – *T. diccoides*, 3 – Fan mai 8, 4 – УК 979 (Спасівка), 5 – УК 8402/10, 6 – УК 1501 (767), 7 – УК 298, 8 – НІС 064688 СА, 9 – УК 26/21, 10 – УК 203 (Злука), 11 – УК 3085 А, 12 – УК 297, 14 – ВБ-1/15, 15 – Даринка Київська, 16 – Fan mai 803, 17 – Fan mai 7030, 18 – Смуглянка, 19 – УК 976, 20 – УК 3436/11, 21 – УК 1501 (1028), 22 – MORO, 23 – Avocet, 24 – ВБ-4/15, 25 – PI 178383, 26 –Yr10/6*АОС

mai 7030, Fan mai 803, НІС 064688 СА, ВБ 4/15, Fan mai 8. У результаті аналізу за допомогою молекулярних маркерів вказаних зразків пшениці озимої на наявність генів *Yr10* та *Yr36* не було виявлено жодного зразку, який би містив хоча б один з цих генів. Однак результати скринінгу за допомогою молекулярних маркерів *Xbarc8*, S23M41-310, S23M41-140, *dp269* свідчать про наявність фрагментів ДНК різних довжин, асоційованих з алелями стійкості генів *Yr5*, *Yr15* та *YrSp*.

З огляду на те, що всі сорти та лінії пшениці, у яких були виявлені маркери алелів стійкості названих генів, проявили польову стійкість до жовтої іржі, можна зробити певні висновки про расовий склад цього патогена на території України. Так можна припустити, що зразки, які брали участь у дослідженні, не були інфіковані расою Warrior, оскільки ця раса є вірулентною до гена *YrSp* (Mert et al, 2016). Гени *Yr5* та *Yr15* забезпечують широкий спектр стійкості до рас жовтої іржі, поширених у світі, однак є раси, що проявляють вірулентність до цих генів (Ali et al, 2009, Ali et al, 2017). Також можна припустити, що ці раси не представлені на території України. Загалом у світовому генофонді, незважаючи на їх ефективність, гени *Yr5*, *Yr15* та *YrSp* не є особливо поширеними (Ali et al, 2017). Це зокрема призводить до регулярних епіфітотій і втрат урожаю від жовтої іржі (Afzal et al, 2007). Тому зразки пшениці з цими генами можуть бути використані для створення сортів, у яких

будуть зацікавлені не тільки українські, але й світові насінневі центри.

Таким чином, відібрані сортозразки озимої пшениці можуть бути рекомендовані для подальшого використання у селекційному процесі як джерела генів стійкості *Yr5*, *Yr15*, *YrSp*, що дозволить у разі виникнення загрози поширення високовірулентних штамів жовтої іржі, у тому числі гімалайського чи азійського походження в Україні, мінімізувати можливі втрати врожаю пшениці.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить будь-яких досліджень за участю людей і тварин в якості об'єктів дослідження.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Дослідження проводились за рахунок коштів науково-технічних проектів НАН України: «Розроблення та впровадження молекулярно-генетичних методів виявлення генів стійкості до жовтої іржі у пшениці» (0116U006101) та «Впровадження у селекційний процес пшениці молекулярно-генетичних маркерів стійкості до високовірулентних патотипів жовтої іржі азійського походження» (0117U002730).

IDENTIFICATION OF RESISTANCE GENES TO YELLOW RUST OF ASIAN ORIGIN IN WINTER WHEAT VARIETIES AND LINES

Ya. V. Pirko, A.V. Karelov, N.O. Kozub,
B.V. Ivaschuk, I.A. Sozinov, T.V. Topchii,
V.V. Morgun, Ya.B. Blume

Institute of Food Biotechnology and Genomics,
National Academy of Sciences of Ukraine,
Osypovskoho str, 2 a, 04123, Kyiv-123, Ukraine
Institute of Plant Physiology and Genetics, National
Academy of Sciences of Ukraine, Vasylykivska str.,
31/17, 03022, Ukraine, Kyiv, Ukraine
Institute of Plant Protection of National Academy
of Agrarian Sciences of Ukraine, str. Vasylykivska, 33,
03022, Ukraine, Kyiv, Ukraine

Yellow rust caused by the fungus *Puccinia striiformis* West. (synonym – *P. glumarum* Erikss. et Henn.), is a dangerous factor that leads to significant shortages of soft wheat grain yield and deterioration of its quality. Recent studies indicate the expansion of highly virulent strains of yellow rust from the Prima Himalayan region and their displacement of less pathogenic European races of *P. striiformis*, which poses a real danger to the agricultural sector in Europe, including Ukraine, as most wheat varieties are resistant to local races of *P. striiformis*, are sensitive to highly virulent strains of this region. In this regard, the assessment of resistance to the yellow rust pathogen of 558 varieties and lines of winter soft wheat, in particular, on the infectious background – 171 and on the natural background – 387 were done. Samples of winter wheat in the collection came from 17 countries, but most of them were Ukrainian selection. As a result of screening of resistance of varieties and lines of winter wheat to yellow rust, it was found that only 19 (or 3 %) samples showed appropriate resistance. Analysis with molecular markers of the yellow rust-resistant wheat samples for the presence of the *Yr10* and *Yr36* genes did not reveal any sample containing at least one of these genes. At the same time, the results of screening using molecular markers *Xbarc8*, *S23M41-310*, *S23M41-140*, *dp269* indicate the presence of DNA fragments of different lengths associated with alleles of resistance of the *Yr5*, *Yr15* and *YrSp* genes in four cultivars of Ukrainian selection.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Ali S, Shah SJA, Khalil IH et al. (2009). Partial resistance to yellow rust in introduced winter wheat germplasm at the north of Pakistan. *Aust J Crop Sci* 3:37–43.
- Ali S, Rodriguez-Algaba J, Thach T et al. (2017) Yellow rust epidemics worldwide were caused by pathogen races from divergent genetic lineages. *Front Plant Sci* 20(8):1057. doi: 10.3389/fpls.2017.01057
- Afzal SN, Ul-Haque MI Ahmedani MS (2007) Assessment of yield losses caused by *Puccinia striiformis* triggering stripe rust in the most common wheat varieties. *Pakistan J Bot* 39(6): 2127–2134.
- Babaiants LT, Chusovitina NM (2011) Soft winter wheat variety resistance to yellow rust pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in the South of Ukraine. *Biuletenu Instytutu Zernovogo Hospodarstva* 40:94–97 (in Ukrainian).
- Bansal UK, Forrest KL, Hayden MJ et al (2011) Characterization of a new stripe rust resistance gene *Yr47* and its genetic association with the leaf rust resistance gene *Lr52*. *Theor Appl Genet* 122(8):1461–1466. doi: 10.1007/s00122-011-1545-4
- Bariana HS, Parry N, Barclay IR et al (2006) Identification and characterization of stripe rust resistance gene *Yr34* in common wheat. *Theor Appl Genet* 112: 1143–1148. doi: 10.1007/s00122-006-0216-3
- Liu B., Xue X, Cui S et al (2010) Cloning and characterization of a wheat beta-1,3-glucanase gene induced by the stripe rust pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Mol Biol Rep* 37(2):1045–1052. doi: 10.1007/s11033-009-9823-9
- Liu L, Wang M, Zhang Z et al. (2020) Identification of stripe rust resistance loci in U.S. spring wheat cultivars and breeding lines using genome-wide association mapping and *Yr* gene markers. *Plant Disease* doi: 10.1094/pdis-11-19-2402-re
- Cheng P, Chen XM (2010) Molecular mapping of a gene for stripe rust resistance in spring wheat cultivar IDO377s. *Theor Appl Genet*, 121(1):195–204. doi: 10.1007/s00122-010-1302-0
- Dong YL, Yin CT, Hulbert S, et al (2011) Cloning and expression analysis of three secreted protein genes from wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *World J Microbiol Biotechnol* 27(5): 1261–1265. doi: 10.1007/s11274-010-0565
- Feng JY, Wang MN, Chen XM, See DR, Zheng YL, Chao SM, Wan AM. (2015) Molecular mapping of *YrSP* and its relationship with other genes for stripe rust resistance in wheat chromosome 2BL. *Phytopathology* 105(9):1206–1213. doi: 10.1094/PHYTO-03-15-0060-R.
- Herrera-Foessel SA, Singh RP, Lillemo M, et al (2014) *Lr67/Yr46* confers adult plant resistance to stem rust and powdery mildew in wheat. *Theor Appl Genet* 127(4):781–789. doi: 10.1007/s00122-013-2256-9
- Hovmöller MS, Walter S, Bayles RA, et al (2016) Replacement of the European wheat yellow rust population by new races from the centre of diversity in the near-Himalayan region. *Plant Pathol* 65(3): 402–411. doi: 10.1111/ppa.12433
- Li GQ, Li ZF, Yang WY, et al (2006) Molecular mapping of stripe rust resistance gene *YrCH42* in Chinese wheat cultivar Chuanmai 42 and its allelism with *Yr24* and *Yr26*. *Theor Appl Genetics* 112(8):1434–1440. doi: 10.1007/s00122-006-0245
- Li Q, Chen XM, Wang MN et al (2011) *Yr45*, a new wheat gene for stripe rust resistance on the long arm of chromosome 3D. *Theor Appl Genetics* 122(1): 189–197. doi: 10.1007/s00122-010-1435-1

- Li Y, Niu YC, Chen XM (2009) Mapping a stripe rust resistance gene *YrC591* in wheat variety C591 with SSR and AFLP markers. *Theor Appl Genetics* 118(2):339–346. doi: 10.1007/s00122-008-0903-3
- Li ZF, Zhang TC, He ZH et al (2006) Molecular tagging of stripe rust resistance gene *YrZH84* in Chinese wheat line Zhou 8425B. *Theor Appl Genetics* 112(6): 1098–1103. doi: 10.1007/s00122-006-0211-8
- Lowe I, Jankuloski L, Chao SM, et al (2011) Mapping and validation of QTL which confer partial resistance to broadly virulent post-2000 North American races of stripe rust in hexaploid wheat. *Theor Appl Genetics* 123:143–157. doi: 10.1007/s00122-011-1573-0
- Luo PG, Hu XY, Ren ZL et al (2008) Allelic analysis of stripe rust resistance genes on wheat chromosome 2BS. *Genome* 51(11):922–927. doi: 10.1139/G08-079
- Mert Z, Nazari K, Karagöz E et al. (2016) First Incursion of the Warrior Race of Wheat Stripe Rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) to Turkey in 2014. *Plant Disease*. 100(2):528–528. doi: 10.1094/PDIS-07-15-0827-PDN
- Nargan TP (2015) Search for sources of resistance to leaf and stem diseases of bread winter wheat for use in breeding. *Genetichni Resursy Roslyn* (17):11–20 (in Ukrainian)
- Philomin J, Prakash SR, Huerta- EJ, et al (2020) Genome – wide mapping and allelic fingerprinting provide insights into the genetics of resistance to wheat stripe rust in India, Kenya and Mexico. *Sci Rep* 10:10908. doi: 10.1038/s41598-020-67874-x
- Rosewarne GM, Herrera-Foessel SA, Singh RP et al (2013) Quantitative trait loci of stripe rust resistance in wheat. *Theor Appl Genetics* 126(10):2427–2449. doi: 10.1007/s00122-013-2159-9
- Sambrook J, David WR (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, vol 2, Cold Spring Harbor, p 763
- Singh R, Datta D, Priyamvada, et al (2009) A diagnostic PCR based assay for stripe rust resistance gene in wheat. *Acta Phytopathol Entomol Hungarica*, 44(1): 11–18. doi: 10.1556/aphyt.44.2009.1.2
- Smith PH, Hadfield J, Hart NJ, et al (2007) STS markers for the wheat yellow rust resistance gene *Yr5* suggest a NBS-LRR-type resistance gene cluster. *Genome*, 50(3):259–265. doi: 10.1139/g07-004
- Somers DJ, Isaac P, Edwards K. (2004) A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genetics* 109:1105–1114. doi: 10.1007/s00122-004-1740-7
- Sui XX, Wang MN, Chen X (2009) Molecular mapping of a stripe rust resistance gene in spring wheat cultivar ‘Zak. *Phytopathology* 99:1209–1215. doi: 10.1094/PHTO-99-10-1209
- Topchii T, Morgyn B (2019) Yellow wheat rust. *Propositsiya* 1:120–122 (in Ukrainian)
- Trybel SO, Getman MV, Strygun OO, et al (2010) Methodology of evaluation of resistance of wheat to pests and pathogens. *Kyiv, Kolobig*; p 392 (in Ukrainian)
- Uauy C, Brevis JC, Chen X, et al (2005) High-temperature adult-plant (HTAP) stripe rust resistance gene *Yr36* from *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* is closely linked to the grain protein content locus Gpc-B1. *Theor Appl Genetics* 112(1):97–105. doi: 10.1007/s00122-005-0109-x
- Walter S, Ali S, Kemen E et al (2016) Molecular markers for tracking the origin and worldwide distribution of invasive strains of *Puccinia striiformis*. *Ecol Evol* 6: 2790–2804. doi: 10.1002/ece3.2069/abstract
- Wang X, Tang C, Deng L, et al (2009) Characterization of a pathogenesis-related traumatic-like protein gene TaPR5 from wheat induced by stripe rust fungus. *Physiol. Plant* 139(1):27–38. doi:10.1111/j.13993054.2009.01338.x
- Weng DX, Xu SC, Lin RM, et al (2005) Microsatellite marker linked with stripe rust resistant gene *Yr9* in wheat. *Acta Genetica Sinica* 32:937–941
- Xia N, Zhang G, Liu XY et al (2010) Characterization of a novel wheat NAC transcription factor gene involved in defense response against stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Mol Biol Rep* 37(8):3703–3712. doi: 10.1007/s11033-010-0023-4
- Xia X, Li Z, Li G, et al (2007) Stripe rust resistance in Chinese bread wheat cultivars and lines. *Devel. Plant Breed* 12:77–82
- Xie CJ, Sun Q, Ni Z, et al (2003) Chromosomal location of a *Triticum dicoccoides*-derived powdery mildew resistance gene in common wheat by using microsatellite markers. *Theor Appl Genetics* 106: 341–345. doi: 10.1007/s00122-002-1022-1
- Zhang Yi, Zhang G, Xia N, et al (2008) Cloning and characterization of a bZIP transcription factor gene in wheat and its expression in response to stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Physiol Mol Plant Pathol* 73(4–5):88–94. doi: 10.1016/j.pmpp.2009.02.002

Надійшла в редакцію 24.12.20
Після доопрацювання 01.02.21
Прийнята до друку 18.05.21