

УДК 575+577.1: 633.1

МАРКЕРИ ГЕНІВ СТІЙКОСТІ ДО СТЕБЛОВОЇ ІРЖІ *Sr39* ТА *Sr40* ДЛЯ ДОБОРУ СЕЛЕКЦІЙНИХ ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ

Я.В. ПІРКО^{1*}, Н.О. КОЗУБ^{1,2*}, А.М. РАБОКОНЬ¹, О.М. ШИША¹, І.О. СОЗІНОВ²,
А.В. КАРЕЛОВ¹, О.І. СОЗІНОВА^{1,2}, А.І. ЄМЕЦЬ^{1*}, Я.Б. БЛЮМ^{1*}

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

² Інститут захисту рослин НААН, вул. Васильківська, 33, Київ, 03022, Україна

E-mail: yarvp1@gmail.com; natalkozub@gmail.com; yemets.alla@nas.gov.ua; cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net

Автор для кореспонденції – Пірко Я.В., e-mail: yarvp1@gmail.com

Впровадження генів, що забезпечують стійкість до *Puccinia graminis*, вважається найкращим методом захисту пшениці від із стеблової іржі. З метою маркерного добору озимих селекційних ліній пшениці м'якої з геном стійкості до стеблової іржі *Sr39* або *Sr40* проведено тестування молекулярних маркерів для ідентифікації цих генів. Було використано такі молекулярні маркери, як BE500705, Xmag2090, Xmag464, Xcn1158, Xwtc25, *Sr39*#50, *Sr39*#22, BCD260, Xwtc344. Серед мікросателітних маркерів поліморфізм виявляли Xmag2090, Xwtc25, Xwtc344 при аналізі ампліконів шляхом електрофорезу в поліакриламідному гелі та фарбуванні сріблом. Маркери *Sr39*#50 та *Sr39*#22 давали подібні амплікони у контрольних ліній RL5711 з *Sr39* та RL6089 з *Sr40*, тоді як у досліджених сортів амплікони були відсутні. Ці маркери були використані для маркерного добору ліній з відповідними генами стійкості серед ліній F_2 від схрещення Хуторянка $\times$ RL6089 (*Sr40*) та F_4 від схрещення Соломія $\times$ RL5711 (*Sr39*). За маркером *Sr39*#50 серед нащадків F_2 комбінації Хуторянка $\times$ RL6089 маркер гена *Sr40* виявлено у 46 % зразків. Серед ліній F_4 Соломія $\times$ RL5711 частота генотипів з поєднанням маркерних ампліконів *Sr39*#50 та *Sr39*#22 складала лише 11 %. Водночас у додаткових 33 % ліній F_4 був присутній амплікон завдовжки біля 800 п.н. з маркером *Sr39*#22 при відсутності маркерів стійкості з *Sr39*#50. Знижена частота носіїв генів *Sr39* та *Sr40* пов'язана, можливо, зі зниженням виживання генотипів з інтрогресією на хромосому 2В при озимому посіві. Відібрані озимі лінії пшениці з генами *Sr39* або *Sr40* можуть бути використані як вихідний матеріал для подальшої селекції.

Ключові слова: пшениця, *Puccinia graminis*, стійкість до стеблової іржі, гени стійкості, раса Ug99, молекулярні маркери, маркерний добір.

Вступ. Стеблова іржа, яку спричиняють гриби виду *Puccinia graminis* Pers., є хворобою пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L.), що впливає на врожай у всьому світі (Simon et al, 2021). Наприклад, найнебезпечніші раси цього фітопатогена можуть спричинити втрати врожаю на рівні 70 % або навіть 100 % (Schumann and Leonard, 2000; Leonard and Szabo, 2005; Loughman et al, 2005; Olivera et al, 2015). Про значні втрати врожаю пшениці від стеблової іржі в Австралії, США, Центральній та Південній Європі, країнах Скандинавії, Індії та інших країнах Азії повідомляли в різні періоди часу в 20-му сторіччі (McIntosh et al, 1995; Schumann and Leonard, 2000). Група рас стеблової іржі із загальним позначенням Ug99 (першу з яких, TTKSK, вперше виявлено в 1999 в Уганді) розглядалась як одна з найсерйозніших загроз виробництву пшениці в усьому світі (Pretorius et al, 2000). Було виявлено інші раси групи, які, незважаючи на карантинні заходи, поширились усім східним узбережжям Африки (Singh et al, 2015). Також расу Ug99 було виявлено в Іраку в 2019 р. (Nazari et al, 2021). Ці раси призвели до значних втрат урожаю всюди, де їх було визначено (Fetch et al, 2021; Olivera et al, 2015; Soko et al, 2018).

На сьогодні також вже відомі і інші шкодо-чинні раси *P. graminis*, наприклад, раса TTRTF, що походить із Грузії та поширилась до ба-

гатьох європейських країн, де з 2016 р. вона суттєво знижувала врожай пшениці (Olivera et al, 2022a, 2022b; Skolotneva et al, 2020). Втрати врожаю, які спричиняє стеблова іржа, окрім високої мутабельності гриба, асоціюють з його життєвим циклом та фізіологією: він може використовувати інші злаки як проміжних господарів, формувати спори, що дозволяють переклати несприятливі погодні умови (Leonard and Szabo, 2005; Stokstad, 2007; Singh et al, 2011, Olivera et al, 2015, 2017, 2019, 2022a, 2022b, Patpour et al, 2022).

Впровадження генів, що забезпечують стійкість до *P. graminis* (позначених як *Sr*), вважають найкращим методом боротьби із стебловою іржею (Schumann and Leonard, 2000; McIntosh et al, 1995). З огляду на високу здатність гриба до мутацій та широке впровадження генів стійкості без відповідних запобіжних заходів, більшість власних *Sr* генів пшениці, що забезпечують расоспецифічну стійкість, а також багато інтрогресованих генів є неефективними проти сучасних рас стеблової іржі (McIntosh et al, 1995; Singh et al, 2011; 2015; Pretorius et al, 2012; Fetch et al, 2016). Расонеспецифічні гени стійкості забезпечують помірний рівень стійкості, однак у полі ці гени самі по собі не є достатньо ефективними (McIntosh et al, 1995).

Деякі з *Sr* генів від споріднених видів пшениці є досі ефективними проти сучасних рас стеблової іржі, включно з Ug99. Хоча інтрогресований ген *Sr31* на плечі хромосоми 1RS від жита, який використовувався з середини 1950-х, і не забезпечує стійкості проти Ug99, він все ще залишається відносно ефективним, оскільки існує не так багато рас, вірулентних до цього гена (Olivera et al, 2022, Patpour et al, 2022). Ген *Sr22* на хромосомі 7AL походить від *T. monosocum* ssp. *boeoticum* і є ефективним проти оригінальної раси Ug99, але на транслокації є інші гени, які негативно впливають на агрономічні ознаки пшениці (Kerber and Dyck, 1973; Olson et al, 2010; Steuernagel et al, 2016). Ген *Sr26*, перенесений від *Thynopyrum ponticum*, забезпечує стійкість до Ug99, однак транслокація з цим геном призводить до зменшення урожайності пшениці на близько 9 % (The et al, 1988; Dundas et al, 2007; Singh et al, 2015; Zhang et al, 2021, Wu et al, 2020, 2023). Ген *Sr32* від *Aegilops speltoides* Tausch,

що забезпечує стійкість до всіх рас групи Ug99, не був широко впроваджений з огляду на зчеплену ознаку «прилиплих» лусок (Friebe et al, 1996; Mago et al, 2013; Singh et al, 2015, Wu et al, 2020, 2023). Ген *Sr33* було вперше ідентифіковано у дикого родича пшениці *Ae. tauschii* Coss.; він надає стійкість до всіх рас стеблової іржі, окрім ТКНБК (Jones et al, 1991; Periyannan et al, 2013; Singh et al, 2015; Patpour et al, 2016; Wu et al, 2020, 2023, Olivera et al, 2022b). Ген стійкості *Sr35*, інтрогресований від *T. monosocum* (McIntosh et al, 1984), надає стійкість проти раси стеблової іржі ТТКСК та її варіантів ТТКСТ та ТТТСК (Pretorius et al, 2000; Jin et al, 2007; Olivera et al, 2022a, Wu et al, 2020, 2023). Ген *Sr38*, перенесений від *Ae. ventricosa* Tausch разом з генами стійкості до бурої іржі *Lr37* та стійкості до жовтої іржі *Yr17*, забезпечує стійкість до більшості сучасних рас стеблової іржі, хоча повідомляють також про раси, вірулентні до цього гена (Bariana and McIntosh, 1993; Boshoff et al, 2002, Wu et al, 2020, 2023). Іншими ефективними генами стійкості є ген *Sr51* від *Ae. searsii* Feldman and Kislev ex K. Hammer (Liu et al, 2011a), *Sr52* від *Dasyphyrum villosum* (L.) Borbas (Qi et al, 2011; Li et al, 2019), *Sr53* від *Ae. geniculata* Roth (Liu et al, 2011b), *Sr59* від *S. cereale* (Rahmatov et al, 2016), *Sr62* від *Ae. sharonensis* Eig (Yu et al, 2022), *SrAmigo* (*Sr1RSAmigo*) на 1AL1RS від сорту аргентинського жита Insave (Rabinovich, 1998), а також гени *Sr39* та *Sr40* (Kerber and Dyck, 1990; Dyck, 1992; Singh et al, 2015).

Ген *Sr39* знаходиться на транслокації фрагмента хромосоми 2S *Ae. speltoides* на хромосому 2B (T2B/2S#2) (Kerber and Dyck, 1990). На тому самому плечі на відстані 3 сМ було локалізовано ген *Lr35*, що забезпечує стійкість до бурої іржі (Gold et al, 1999; Labuschagne et al, 2002; Mago et al, 2009). Ген *Sr39* експресується в проростках, а також у дорослих рослинах, і забезпечує стійкість/помірну стійкість до всіх відомих рас стеблової іржі, включно з Ug99 (Jin et al, 2007, Singh et al, 2015). Борошно лінії з цією транслокацією RL6082 та інших джерел цього гена характеризується підвищеною абсорбцією води і вмістом білку (Labuschagne et al, 2002). Загалом, транслокація хромосоми 2S включає довге плече і 85 % короткого плеча (Yu et al, 2010).

Для ідентифікації *Sr39* (та *Lr35*) було розроблено молекулярні маркери з парами праймерів BCD260F1/35R2 (Seyfarth et al, 1999) та *Sr39F2/R3* (Gold et al, 1999). У подальших дослідженнях було зроблено спроби зменшити інтрогредований фрагмент, але залишити гени *Sr39* та *Lr35* (Mago et al, 2009; Niu et al, 2011). На основі лінії RL5711 з транслокацією 2B-2S було створено лінії #220 та #247 з генами інтересу, а на основі цих ліній було розроблено молекулярні маркери *Sr39#50s* та *Sr39#22r* (Mago et al, 2009). Niu et al (2011) на основі лінії RL6082 за допомогою покращеного методу хромосомної інженерії створили лінії пшениці RWG1, RWG2 and RWG3 з суттєвим зменшенням фрагменту хромосоми 2S. Крім того, маркери *Xrws27*, *Xrws28* та *Xrws29* було запропоновано як більш зручні для селекції (Niu et al, 2011). Пізніше у ході валідації маркерів для гена *Sr39* було відзначено маркери *Sr39#50s* та *Sr39#22r* як точні й зручні, а для маркерів *Xrws27*, *Xrws28* та *Xrws29* показано, що вони продукують фрагменти, які складно розділити у гелі або ж не є точними; крім того, як діагностичний для *Sr39* було також запропоновано мікросателітний маркер *Xwmc474* (Bernardo et al, 2013).

Ген *Sr40* було інтрогредовано від *T. timopheevii* subsp. *armeniicum* (Jakubcz.) Slageren на транслокації 2B-2G#2S (Dyck, 1992; Wu et al, 2009). Лінія RL6088 з геном *Sr40* є стійкою проти всіх рас стеблової іржі, включно з Ug99 (Jin et al, 2007). Лінія може бути використана як джерело гена, а мікросателітні маркери *Xgwm319*, *Xwmc344*, *Xwmc474*, *Xwmc477*, *Xgwm374* та *Xwmc661* запропоновано як діагностичні для гена *Sr40* (Wu et al, 2009). Жоден з наведених маркерів не валідували в пізніших дослідженнях, натомість Bernardo et al (2013) запропонували для використання маркер *Xsr39#22r* у випадку, якщо в селекційному матеріалі, куди переносять ген *Sr40*, завідомо відсутній ген *Sr39*. Фрагмент хромосоми з геном *Sr40* також містить фактори, що впливають на агрономічні властивості пшениці (Wu et al, 2009).

Враховуючи попередні дослідження з валідації маркерів нами було проведено тестування молекулярних маркерів для ідентифікації генів *Sr39* та *Sr40* та маркерний добір озимих селекційних ліній з цими генами серед мате-

ріалу від схрещування між комерційними сортами пшениці м'якої та якими лініями — носіями генів інтересу.

Матеріали та методи. У роботі використовували канадські ярі лінії — носії генів *Sr39* (RL5711) та *Sr40* (RL6089), ярі лінії-потенційні носії цих генів (DH31, 35H2-3), комерційні сорти (озимі і дворучки) та раніше створений гібридний матеріал пшениці м'якої з колекції Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України, отриманий від схрещування комерційних сортів з лініями-носіями ефективних генів стійкості до небезпечних рас стеблової іржі різних поколінь після схрещування. Вихідними батьківськими формами для створення селекційних ліній були сорт-дворучка Хуторянка і озимий сорт Соломія. Зерно сортів було люб'язно надано Національним центром генетичних ресурсів рослин України НААН (Харків). Зерно F_1 від схрещування ярих ліній з сортами висівали навесні. Зерно F_2 та подальші покоління висівали восени. Аналізували зерна з окремих колосів F_2 комбінації схрещування Хуторянка $\times$ RL6089 (*Sr40*) та зерна з колосів F_4 комбінації схрещування Соломія $\times$ RL5711 (*Sr39*).

ДНК виділяли із зерен (подрібнені окремі зернівки або наважка 50–100 мг суміші трьох подрібнених зерен) або з 3-добових проростків. При виділенні ДНК з проростків для успішного пророщування насіння стерилізували, щоб уникнути зараження грибами. Для цього насіння промивали під проточною водою з використанням рідкого господарського мила та поверхнево стерилізували за схемою: 2 хв $\approx$ 70%-ний спирт, 15 хв — гіпохлорит натрію та багаторазове промивання стерильною дистильованою водою. Після цього насіння розміщували на стерильний фільтрувальний папір у чашки Петрі для пророщування в термостаті.

Для виділення ДНК застосовували методику з використанням ЦТАБ або за допомогою набору NeoPrep_100 («Неоген™», Україна), що базується на використанні SiO_2 (силіцій (IV) оксид). Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використовували готову суміш для ПЛР (PCR Master Mix) (Неоген™, Україна) або готували суміш з компонентів. Послідовності праймерів, використані для аналізу, наведено в табл. 1.

Таблиця 1. Послідовності праймерів, використаних для ідентифікації генів *Sr39* та *Sr40*

Ген	Маркер	Послідовність праймерів	Посилання
<i>Sr39</i>	<i>BE500705</i>	F: 5'-atctgtggcagtgctcct-3' R: 5'-tcctgcaaatgctgtcgtt-3'	https://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Sr39
<i>Sr39, Sr40</i>	<i>Xmag2090</i>	F: 5'-aaaggtgtaagcgtggcatc-3' R: 5'-acacgcataatgcactccag-3'	Hu et al, 2012
<i>Sr39, Sr40</i>	<i>Xmag464</i>	F: 5'-cttgtgaggagggttcttg-3' R: 5'-cacaccacgaagctgtgtt-3'	
<i>Sr39, Sr40</i>	<i>Xcnl158</i>	F: 5'-ctcatccaccaccaccac-3' R: 5'-ccctgaagaagtcgaacacg-3'	
<i>Sr39, Sr40</i>	<i>Xwmc25</i>	F: 5'-tctggccaggatcaatattact-3' R: 5'-taagatacatagatccaacacc-3'	Zhang et al, 2006
<i>Sr39</i>	<i>Sr39#50</i>	F: 5'-ccaataggagatcaaaacaacc-3' R: 5'-tagcaaggaccaagcaatcttg-3'	Mago et al., 2009
	<i>Sr39#22</i>	F: 5'-agagaagataagcagtaaacatg-3' R: 5'-tgctgtcatgagaggaactctg-3'	
	<i>BCD260</i>	F: 5'-ttttgagaatcagtcacac-3' R: 5'-gaagttaaagaggtcttgac-3'	Seyfarth et al, 1999
<i>Sr40</i>	<i>Xwmc344</i>	F: 5'-atttcagtcataattagcgttg-3' R: 5'-aacaagaacataattaacccc-3'	Wu et al, 2009

Для проведення ПЛР з обраними праймерами до генів *Sr39* та *Sr40* кожна ПЛР-суміш об'ємом 10 мкл містила: буфер з 10 мМ Tris-HCl, 50 мМ KCl, 0,8 % (v/v) Nonidet P40, 2,5 мМ MgCl₂, 1 пМ реверсного праймера 1 пМ форвардного праймера, 0,5 од. DreamTaq полімерази, 0,1 мМ кожного з трифосфатів (ТТФ, ГТФ, АТФ, ЦТФ) та приблизно 50 нг геномної ДНК.

Продукти ампліфікації з маркерами до *Sr39* та *Sr40* розділяли за допомогою вертикального неденатуруючого електрофорезу в 6%-ному поліакриламідному гелі (ПААГ) на пластинах розміром 200 × 200 × 1 мм (Sambrook and Russell, 2001). Фрагменти ДНК в ПААГ візуалізували шляхом фарбування нітратом срібла (Benbouza et al, 2006). Забарвлені гелеві пластини фотографували цифровою відеокамерою. Аналіз зображень проводили з використанням програми GelAnalyzer (<http://www.gelanalyzer.com/>). Довжину відтворюваних і найбільш чітких фрагментів визначали, використовуючи ДНК-маркер (O'Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; «ThermoFisher», США). Також використовували 2%-ний агарозний гель з додаванням бромистого етидію (Sambrook and Russell, 2001). Після електрофорезу гель розміщу-

вали на УФ-фільтрі транслюмінатора і фотографували.

Результати. У ході проведених досліджень було протестовано низку ДНК-маркерів для детекції генів *Sr39* і *Sr40* та підбрано умови проведення ПЛР з обраними маркерами. Для ідентифікації гена *Sr39* і маркерного добору ліній було використано молекулярні маркери *Sr39#50*, *Sr39#22*, *BCD260* та *BE500705* (рис. 1).

За результатами підбору умов проведення ПЛР зупинилися на температурних протоколах, відображених в табл. 2.

Як видно з отриманих електрофореграм, інформативними виявилися лише три маркери, а саме *Sr39#50*, *Sr39#22* та *BCD260*, при цьому *Sr39#50* і *Sr39#22* давали однакові маркерні смуги у зразків RL5711 та RL6089 (рис. 1). У цих зразків за двома ДНК-маркерами виявлено амплікони, що відповідають гену стійкості *Sr39*, зокрема розміром біля 310 п.н. для *Sr39#50* і біля 800 п.н для *Sr39#22*. Амплікон завдовжки 931 п.н. з маркером *BCD260* отримано лише у лінії RL5711. У зразка 35H2-3 ген стійкості *Sr39* виявлено лише за маркером *Sr39#22*. Отримані дані узгоджуються з попередніми дослідженнями, адже саме зразки 35H2-3 та RL5711 використовувалися як дже-

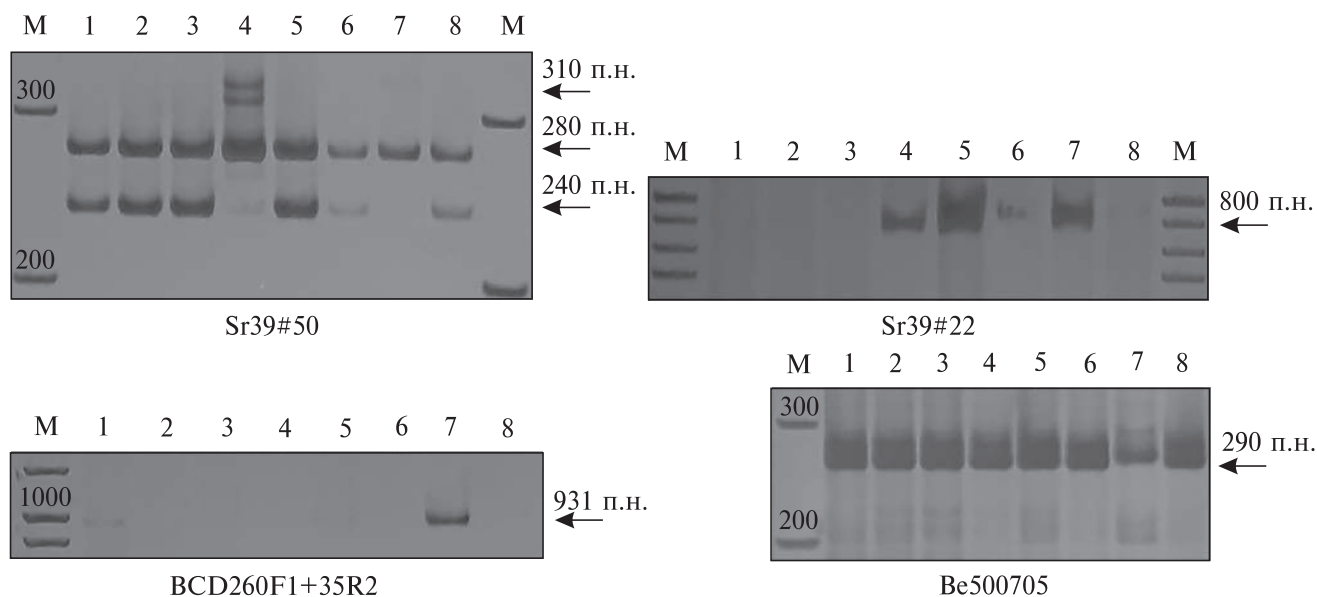


Рис. 1. Продукти ПЛР з праймерами, що фланкують маркер *Sr39*, та ДНК сортів Хуторянка (1), Соломія (2), Афін (3), ліній RL6089 (4), 35H2-3 (5), DK20 (6), RL5711 (7) та DH31(8); М – маркер (100 bp DNA Ladder) (електрофорез в ПААГ)

рело гена *Sr39*. Зразок RL6089 виступав як контроль наявності гена *Sr40*, а тому отримані дані свідчать про те, що маркери *Sr39#50* та *Sr39#22* можуть бути ефективними для детектування не лише гена *Sr39*, а й гена *Sr40*, що підтверджує дані Bernardo et al (2013).

Також було протестовано SSR-маркери, які б могли бути корисними для детекції генів *Sr39/Sr40*: *Xmag2090*, *Xmag464*, *Xcnl158*, *Xwmc25* (рис. 2). Поліморфізм спостерігався лише за використання двох маркерів – *Xmag2090* та

Xwmc25. Однак, спираючись на аналіз отриманих результатів для контрольних зразків, подальше використання цих маркерів можливе лише у поєднанні з іншими ДНК-маркерами, оскільки вони не дозволяють однозначно диференціювати стійкі та нестійкі генотипи, тобто з наявними або відсутніми генами *Sr39/Sr40*.

На підставі аналізу раніше отриманих даних для детекції алеля стійкості гена *Sr40* використовували маркер *Xwmc344*. Тестування різних умов проведення ПЛР зі згаданим марке-

Таблиця 2. Умови ПЛР для маркерів генів *Sr39* і *Sr40*

Маркер	Умови ПЛР
<i>Sr39#50s</i>	1 цикл: 95 °C – 4 хв 30 циклів: 95 °C – 30 с, 56 °C – 30 с, 72 °C – 60 с, 1 цикл: 72 °C – 7 хв
<i>Sr39#22r</i>	1 цикл: 95 °C – 4 хв, 35 циклів: 95 °C – 30 с, 57 °C – 45 с, 72 °C – 60 с, 1 цикл: 72 °C – 7 хв
<i>BCD260</i>	1 цикл: 94 °C – 3 хв, 35 циклів: 94 °C – 45 с, 58 °C – 45 с, 72 °C – 1 хв, 1 цикл: 72 °C – 5 хв
<i>BE500705</i>	1 цикл: 94 °C – 3 хв, 35 циклів: 94 °C – 30 с, 56 °C – 30 с, 72 °C – 40 с, 1 цикл: 72 °C – 10 хв
<i>Xmag2090</i>	1 цикл: 94 °C – 3 хв, 30 циклів: 94 °C – 30 с, 52 °C – 30 с, 72 °C – 40 с, 1 цикл: 72 °C – 10 хв
<i>Xmag464</i>	1 цикл: 94 °C – 4 хв, 30 циклів: 94 °C – 30 с, 52 °C – 30 с, 72 °C – 40 с, 1 цикл: 72 °C – 10 хв
<i>Xcnl158</i>	1 цикл: 94 °C – 3 хв, 35 циклів: 94 °C – 30 с, 52 °C – 30 с, 72 °C – 40 с, 1 цикл: 72 °C – 10 хв
<i>Xwmc25</i>	1 цикл: 94 °C – 4 хв, 35 циклів: 94 °C – 30 с, 55 °C – 45 с, 72 °C – 50 с, 1 цикл: 72 °C – 10 хв
<i>Xwmc344</i>	1 цикл: 95 °C – 4 хв, 4 цикли: 95 °C – 30 с, 55 °C – 30 с, 72 °C – 60 с, 4 цикли: 95 °C – 30 с, 54 °C – 30 с, 72 мC – 60 с, 25 циклів: 95 °C – 30 с, 55 °C – 30 с, 72 °C – 60 с, 1 цикл: 72 °C – 7 хв

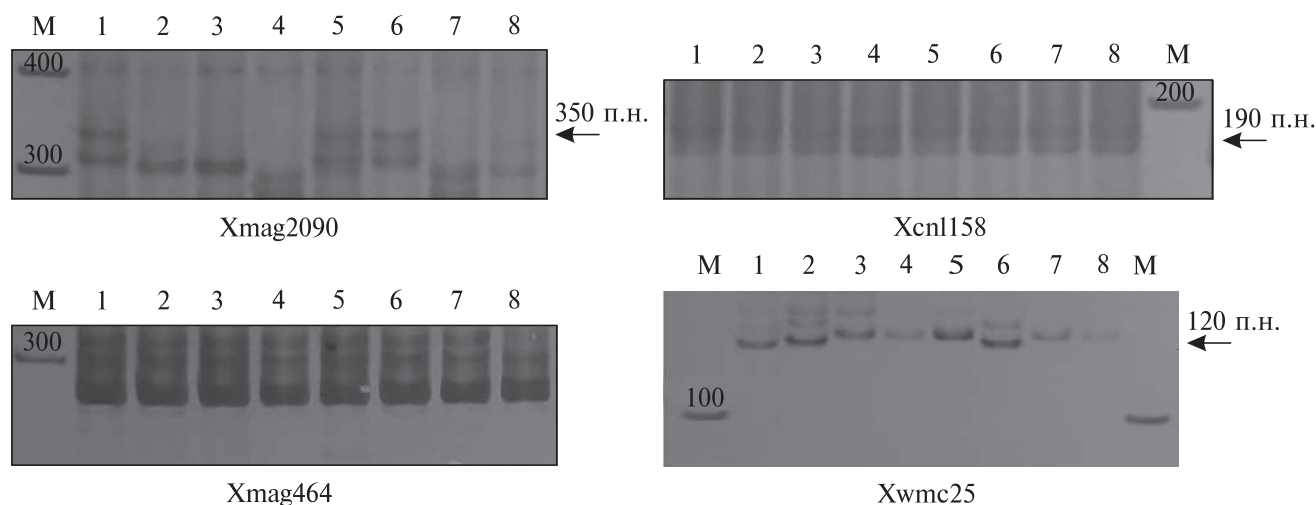


Рис. 2. Продукти ПЛР з праймерами, що фланкують мікросателітні маркери, та ДНК сортів Хуторянка (1), Соломія (2), Афіна (3), ліній RL6089 (4), 35H2-3 (5), DK20 (6), RL5711 (7) та DH31 (8); М – маркер (100 bp DNA Ladder) (електрофорез в ПААГ)

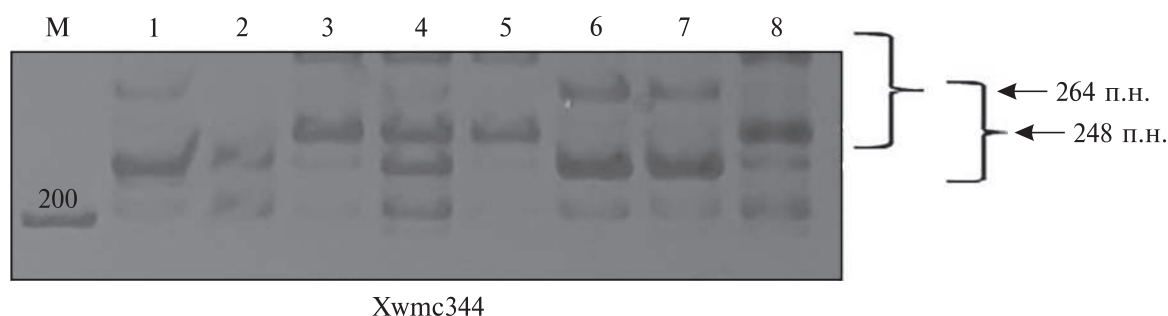


Рис. 3. Продукти ПЛР з праймерами, що фланкують мікросателітний маркер Xwmc344 та ДНК сортів Хуторянка (1), Соломія (2), Афіна (3), ліній RL6089 (4), 35H2-3 (5), DK20 (6), RL5711 (7) та DH31(8); М – маркер (100 bp DNA Ladder) (електрофорез в ПААГ)

ром дозволило зупинитись на температурному протоколі, наведеному в табл. 2. Для цього маркера у лінії RL6089 з геном *Sr40* спостерігається поєднання двох ампліконів розміром 264 та 248 п.н., що, очевидно, відповідає алелю стійкості (рис. 3). Однак решта досліджених ліній або сортів у спектрі ампліконів характеризуються наявністю інтенсивної смуги одного з цих ампліконів: 248 або 264 п.н. (рис. 3). Більше того, деякі зразки, наприклад сорт Афіна, мають подібну комбінацію маркерних смуг, хоча і з меншою інтенсивністю фрагмента завдовжки 248 п.н. Тому цей маркер не можна вважати надійним для детекції носіїв *Sr40*.

Базуючись на результатах проведеного тестування маркерів для аналізу селекційного матеріалу від схрещування комерційних сортів пшениці з лініями, що містили гени *Sr39* або

Sr40, нами було вибрано маркери *Sr39#50* і *Sr39#22* як найбільш надійні. Результати аналізу вибірки зерен з окремих колосів F_2 від схрещування Хуторянка $\times$ RL6089 (*Sr40*) за маркером *Sr39#50* наведено на рис. 4.

Результати аналізу з маркером *Sr39#50* виявили алель стійкості у 23 зразків з 50 (зокрема, у гомозигот за маркером стійкості 104, 111, 116, 117, 119, 120, 121, 122, 123, 144, 147, 149) (рис. 4). У частини зразків визначали як алель стійкості *Sr40*, так і алель чутливості, що свідчить про гетерозиготний стан зразків. Загалом серед проаналізованої вибірки колосів F_2 від схрещування Хуторянка $\times$ RL6089 маркер гена *Sr40* виявлено у 46 % зразків.

З використанням праймерів *Sr39#50* і *Sr39#22* ідентифіковано носіїв гена *Sr39* серед колосів F_4 від схрещення Соломія $\times$ RL5711. Резуль-

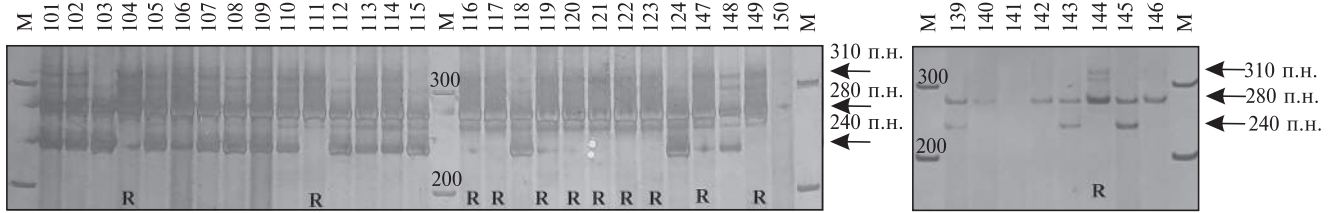


Рис. 4. Продукти ПЛР з праймерами, що фланкують маркер *Sr39#50*, та ДНК зерен з колосів F_2 від схрещування Хуторянка $\times$ RL6089 (електрофорез в ПААГ). Номери зверху – номери колосів. R – присутність *Sr40*

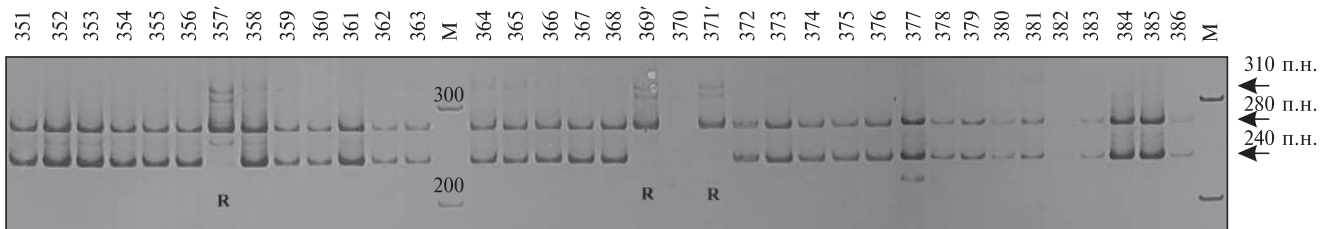


Рис. 5. Продукти ПЛР з праймерами, що фланкують маркер *Sr39#50*, та ДНК зерен з колосів F_4 від схрещування Соломія $\times$ RL5711 (електрофорез в ПААГ). Номери зверху – номери колосів. R – присутність *Sr39*



Рис. 6. Продукти ПЛР з праймерами, що фланкують маркер *Sr39#22*, та ДНК зерен з колосів F_4 від схрещування Соломія $\times$ RL5711 (електрофорез в ПААГ). Номери зверху – номери колосів. R – присутність *Sr39*

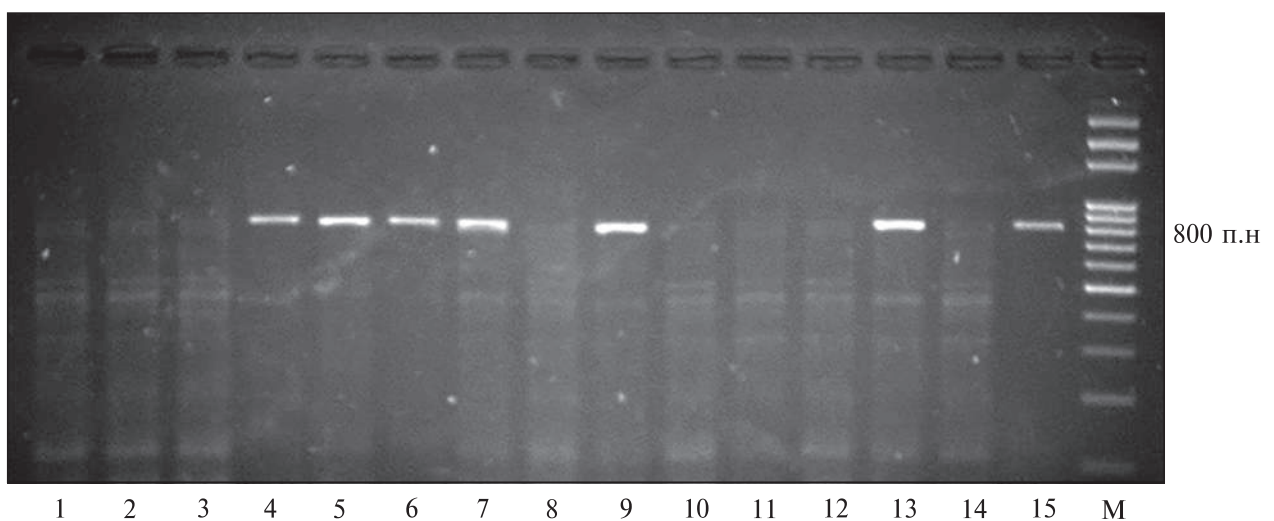


Рис. 7. Продукти ПЛР з праймерами, що фланкують маркер *Sr39#22*, та ДНК зерен з колосів F_4 від схрещування Соломія $\times$ RL5711 (1–14) при електрофорезі в агарозному гелі. 15 – лінія RL5711



Рис. 8. Колоси лінії F_5 від схрещування Соломія $\times$ RL5711 з *Sr39* (1) та лінії RL5711 (2)

тати аналізу за цільовим геном зерен з колосів F_4 Соломія $\times$ RL5711 показано на рис. 5 і 6.

Серед проаналізованих 36 зразків колосів F_4 від схрещування Соломія $\times$ RL5711 ген стійкості *Sr39* за маркером *Sr39#50* виявлено лише у 4 зразків. У цих же зразків встановлено присутність маркера *Sr39#22* (рис. 5 і 6). Крім цього, у частини зразків (наприклад, зразки 354–356, 358, 359, 363–366 на рис. 6) був присутній амплікон біля 800 п.н. з маркером *Sr39#22* при відсутності маркерів стійкості з *Sr39#50*. Відсоток таких генотипів склав приблизно 33 %. На рис. 7 показано результати електрофорезу в агарозному гелі продуктів ампліфікації з праймерами до *Sr39#22* ліній F_4 від схрещування Соломія $\times$ RL5711. У результаті аналізу було відібрано низку озимих ліній F_5 Соломія $\times$ RL5711 з геном *Sr39* (рис. 8).

Обговорення. Валідація праймерів генів стійкості є предметом детального вивчення з огляду як на перспективи використання в се-

лекційних програмах, так і для подальшого дослідження локусу інтересу (Bernardo et al, 2013). Остаточною метою таких досліджень є опис і секвенування генів-кандидатів, точні ген-специфічні маркери і розширення фундаментальної бази та розуміння механізмів стійкості рослин до біотрофних фітопатогенів. Зокрема, таким чином було секвеновано низку інтрогресованих генів стійкості пшениці до стеблової іржі, а саме генів *Sr2*, *Sr22*, *Sr26*, *Sr33*, *Sr35* (Periyannan et al, 2013; Mago et al, 2014; Steuernagel et al, 2016; Zhang et al, 2021). Більшість інтрогресованих генів є расоспецифічними й очікувано їх продукти належать до відносно консервативної групи протеїнів із сайтом зв'язування нуклеотидів, N-термінальним надспіралізованим доменом та C-термінальним багатим на лейцин повтором (Periyannan et al, 2013; Steuernagel et al, 2016; Zhang et al, 2021), але є й винятки (Mago et al, 2014). У випадку генів *Sr39* та *Sr40* додатковим завданням є зменшення інтрогресованого фрагмента чужорідної хромосоми та усунення чинників, що негативно впливають на сільськогосподарські ознаки зі збереженням стійкості (Mago et al, 2009; Niu et al, 2011).

Оптимізація протоколів ПЛР з метою пришвидшення проведення аналізу або й взагалі отримання більш якісних електрофореграм і, відповідно, однозначних результатів аналізу є важливою частиною сучасної лабораторної практики (Nurdan et al, 2001). Так, автори всіх використаних у цьому дослідженні маркерів пропонують використовувати поступове зниження температури відпалювання праймерів (тач-даун), що суттєво збільшує час перебігу реакції та не є сумісним з усіма наборами реактивів (Mago et al, 2009; Wu et al, 2009; Bernardo et al, 2013). Нам вдалось отримати електрофореграми задовільної якості без тах-дауна (див. табл. 1 і 2, рис. 1–6). Слід зазначити, що розділення ампліконів проводилося у ПААГ. Більш того, для маркера *Xwmc344* автори пропонують основну температуру відпалювання на рівні 50° (Wu et al, 2009). Запропонований нами протокол є більш оптимальним і, ймовірно, в результаті продукується менше неспецифічних фрагментів (Wu et al, 1991).

Отже, в нашому дослідженні оптимізовано умови проведення ПЛР з молекулярними

маркерами, діагностичними для генів *Sr39* та *Sr40*. Найбільш ефективними для визначення гена *Sr39* виявилися маркери *Sr39#50s* і *Sr39#22r*, розроблені Mago et al (2009). Більше того, виявилось, що ці маркери можуть бути ефективними і для гена *Sr40*, що підтверджує результати дослідження Bernardo et al (2013). Однак, дещо неоднозначною є ситуація з маркером *Sr39#50s*. У дослідженні Niu et al (2011) як діагностична смуга гена стійкості за *Sr39#50s* наводиться 380 п.н. (див. рис. 4 з цієї роботи), а в роботі Bernardo et al (2013) – 300 + 301 п.н. При використанні ПААГ і фарбуванні сріблом нами визначено діагностичну смугу як 310 п.н. У нашому дослідженні не всі лінії F_4 від схрещування Соломія × RL5711 з маркерним ампліконом за *Sr39#22r* мали маркер стійкості за *Sr39#50s*. Подібну ситуацію було показано для ліній зі зменшеним фрагментом транслокації від *Ae. speltooides* Niu et al (2011). Тому присутність цільового гена у таких випадках потрібно підтверджувати з використанням додаткових молекулярних маркерів. Для цього можуть бути корисними і мікросателітні маркери, наприклад, *Xmag2090* та *Xwmc25*, проте підбір маркерів слід проводити для конкретної комбінації схрещування з врахуванням відмінностей спектрів ампліфікації батьківських форм, оскільки певні, раніше заявлені маркерні амплікони для генів стійкості можуть зустрічатись також у спектрах сортів без цих генів (Bernardo et al, 2013).

Знижену частоту носіїв гена *Sr40*, відібраних в нашому дослідженні з використанням молекулярних маркерів, можна пояснити розміщенням гена на великій транслокації 2B-2G#2S від *T. timopheevii*, що охоплює більшу частину хромосоми 2B. Відомо, що на хромосомі 2B знаходяться гени чутливості до фотоперіоду, що визначають час цвітіння та адаптацію до різних агрокліматичних умов, зокрема ген *Ppd-B1* (Scarath et al, 1983; Bhati et al, 2022). Очевидно, інтрогресія гена *Sr40* виявилась пов'язаною з інтрогресією факторів реакції на фотоперіод, що могло впливати на виживання озимих генотипів з таким поєднанням при створенні досліджуваних ліній. Знижена частота носіїв гена *Sr39*, можливо, також пов'язана зі зниженим виживанням генотипів з інтро-

гресією фрагмента хромосоми 2S *Ae. speltooides* на хромосому 2B (T2B/2S#2) при озимому посіві. Відібрані озимі лінії пшениці з генами *Sr39* або *Sr40* можуть бути використані як вихідний матеріал для селекції для впровадження нових генів стійкості до стеблової іржі в комерційні сорти.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить будь-яких досліджень з використанням людей і тварин як об'єктів.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність будь-яких конфліктів інтересів.

Фінансування. Роботу було виконано за фінансової підтримки Пірка Я.В., Козуб Н.О., Рабокони А.М., Шиши О.М., Созінова І.О., Карелова А.В., Созінової О.І., Ємець А.І., а також Кваско А.Ю. та Блюма Р.Я., яким автори дякують за технічну допомогу у виконанні досліджень, в рамках проєкту НФДУ 2021.01/0313 «Створення генотипів пшениці м'якої з генами стійкості проти високопатогенних рас стеблової іржі з використанням молекулярних маркерів як запорука харчової безпеки України» (2023–2025 рр., № держреєстрації 123U102941). Окрему подяку автори висловлюють м.н.с. Відділу геноміки та молекулярної біотехнології ДУ «ІХБГ НАН України» Сахаровій В.Г. за допомогу у проведенні електрофоретичних досліджень.

MARKERS LINKED TO THE STEM RUST RESISTANCE GENES *SR39* AND *SR40* FOR SELECTING WHEAT BREEDING LINES

Ya.V. Pirko, N.O. Kozub, A.M. Rabokon, O.M. Shysha, I.O. Sozinov, A.V. Karelov, O.I. Sozinova, A.I. Yemets, Ya.B. Blume

Institute of Food Biotechnology and Genomics
Natl. Acad. of Sci. of Ukraine,
Baidy-Vyshnevetskoho str., 2a, Kyiv, 04123, Ukraine
Institute of Plant Protection of NAAS,
Vasylkivska str., 33, Kyiv, 03022, Ukraine;

E-mail: yarvp1@gmail.com; natalkozub@gmail.com;
yemets.alla@nas.gov.ua; cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net

Introduction of genes conferring resistance to *Puccinia graminis* is considered to be the best approach to protect wheat against stem rust. To facilitate marker-assisted selection of winter common wheat breeding lines with the stem rust resistance genes *Sr39* and *Sr40*, the testing of molecular markers for these genes was carried out. The markers used for the research were the

following: *BE500705*, *Xmag2090*, *Xmag464*, *Xcn158*, *Xwmc25*, *Sr39#50*, *Sr39#22*, *BCD260*, and *Xwmc344*. Among the simple sequence repeat markers, only *Xmag2090*, *Xwmc25*, and *Xwmc344* proved to be polymorphic upon analysis of amplicons by polyacrylamide gel electrophoresis followed by silver staining. The marker *Sr39#50* as well as *Sr39#22* produced similar amplicons in the control lines RL5711 with *Sr39* and RL6089 with *Sr40* while amplified fragments were absent in the cultivars. *Sr39#50* and *Sr39#22* were used for marker-assisted selection of F_2 lines from the cross Khutorianka $\times$ RL6089 (*Sr40*) and F_4 lines from the cross Solomiia $\times$ RL5711 (*Sr39*). Using *Sr39#50*, *Sr40* resistance marker was found in 46 % of the F_2 offspring from the cross Khutorianka $\times$ RL6089. Among the F_4 offspring from the cross Solomiia $\times$ RL5711, the frequency of genotypes with the combination of the *Sr39#50* and *Sr39#22* marker amplicons was only 11 %. Additionally, 33 % of the F_4 lines showed the *Sr39#22* amplicon of about 800 bp but lacked the *Sr39#50* resistance markers. The reduced frequency of lines with the *Sr39* and *Sr40* genes may be due to the decreased survival of genotypes with the 2B chromosome introgression after fall planting. The winter wheat lines with the *Sr39* or *Sr40* gene may be used as the initial material in breeding programs.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Bariana HS, McIntosh RA (1993) Cytogenetic studies in wheat XIV. Location of rust resistance genes in VPM1 and their genetic linkage with other disease resistance genes in chromosome 2A. *Genome* 36:476–482. <http://doi.org/10.1139/g93-065>
- Benbouza H, Jacquemin J.-M, Baudoin J-P et al (2006) Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron Soc Environ* 10(2):77–81
- Bernardo AN, Bowden RL, Rouse MN et al (2013) Validation of molecular markers for new stem rust resistance genes in U.S. hard winter wheat. *Crop Sci* 53:755–764. <http://doi.org/10.2135/cropsci2012.07.0446>
- Bhati PK, Juliana P, Singh RP et al (2022) Dissecting the genetic architecture of phenology affecting adaptation of spring bread wheat genotypes to the major wheat-producing zones in India. *Front Plant Sci* 13. <http://doi.org/10.3389/fpls.2022.920682>
- Boshoff WHP, Pretorius ZA, van Niekerk BD et al (2002) First report of virulence in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* to wheat stem rust resistance genes *Sr8b* and *Sr38* in South Africa. *Plant Dis* 86:922. <http://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.8.922B>
- Dundas IS, Anugrahwati DR, Verlin DC et al (2007) New sources of rust resistance from alien species: meliorating linked defects and discovery. *Aust J Agric Res* 58:545–549. <http://doi.org/10.1071/AR07056>
- Dyck PL (1992) Transfer of a gene for stem rust resistance from *Triticum araraticum* to hexaploid wheat. *Genome* 35:788–792
- Fetch TG, Park RF, Pretorius ZA, DePauw RM (2021) Stem rust: its history in Kenya and research to combat a global wheat threat. *Can J Plant Pathol* 43:S275–S297
- Fetch T, Zegeye T, Park RF et al (2016) Detection of wheat stem rust races TTHSK and PTKTK in the Ug99 race group in Kenya in 2014. *Plant Dis* 100(7):1495–1495. <http://doi.org/10.1094/PDIS-11-15-1356-PDN>
- Friebe B, Jiang J, Raupp WJ et al (1996) Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. *Euphytica* 91:59–87. <http://doi.org/10.1007/BF00035277>
- Gold J, Harder D, Townley-Smith F et al (1999) Development of a molecular marker for rust resistance genes *Sr39* and *Lr35* in wheat breeding lines. *Electron J Biotechnol* 2(1):35–40
- Hu LJ, Liu C, Zeng ZX et al (2012) Genomic rearrangement between wheat and *Thinopyrum elongatum* revealed by mapped functional molecular markers. *Genes Genom* 34:67–75. <http://doi.org/10.1007/s13258-011-0153-7>
- Jin Y, Singh RP, Ward RW et al (2007) Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic *Sr* gene lines to race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Dis* 91:1096–1099. <http://doi.org/10.1094/PDIS-91-9-1096>
- Jones SS, Dvorak J, Knott DR, Qualset CQ (1991) Use of double-ditelosomic and normal chromosome 1D recombinant substitution lines to map *Sr33* on chromosome arm 1DS in wheat. *Genome* 34:505–508. <http://doi.org/10.1139/g91-077>
- Kerber ER, Dyck PL (1973) Inheritance of stem rust resistance transferred from diploid wheat (*Triticum monococcum*) to tetra-ploid and hexaploid wheat and chromosome location of the gene involved. *Canad J Genet Cytol* 15(3):397–409. <http://doi.org/10.1139/g73-050>
- Kerber ER, Dyck PL (1990) Transfer to hexaploid wheat of linked genes for adult-plant leaf rust and seedling stem rust resistance from amphiploid of *Aegilops speltoides* $\times$ *Triticum monococcum*. *Genome* 33:530–537
- Labuschagne MT, Pretorius ZA, Grobbelaar B (2002) The influence of leaf rust resistance genes *Lr29*, *Lr34*, *Lr35* and *Lr37* on bread making quality in wheat. *Euphytica* 124(1):65–70. <http://doi.org/10.1023/a:1015683216948>
- Leonard KJ, Szabo LJ (2005) Pathogen profile: Stem rust of small grains and grasses caused by *Puccinia graminis*. *Mol Plant Pathol* 6(2):99–111. <http://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00273.x>
- Li H, Dong Z, Ma C et al (2019) Physical mapping

- of stem rust resistance gene *Sr52* from *Dasyphyrum villosum* based on *ph1b*-induced homoeologous recombination. *Int J Mol Sci* 20(19):4887. <http://doi.org/10.3390/ijms20194887>
- Liu W, Jin Y, Rouse M et al (2011a) Development and characterization of wheat-*Ae. searsii* Robertsonian translocations and a recombinant chromosome conferring resistance to stem rust. *Theor Appl Genet* 122:1537–1545. <http://doi.org/10.1007/s00122-011-1553-1554>
- Liu W, Rouse M, Friebe B et al (2011b) Discovery and molecular mapping of a new gene conferring resistance to stem rust, *Sr53*, derived from *Aegilops geniculata* and characterization of spontaneous translocation stocks with reduced alien chromatin. *Chromosome Res* 19(5):669–682. <http://doi.org/10.1007/s10577-011-9226-3>
- Loughman R, Jayasena KW, Majewski J (2005) Yield loss and fungicide control of stem rust of wheat. *Austral J Agric Res* 56(1):91–96. <http://doi.org/10.1071/AR04126>
- Mago R, Tabe L, Vautrin S et al (2014) Major haplotype divergence including multiple germin-like protein genes, at the wheat *Sr2* adult plant stem rust resistance locus. *BMC Plant Biol* 14:379. <http://doi.org/10.1186/s12870-014-0379-z>
- Mago R, Zhang P, Bariana H et al (2009) Development of wheat lines carrying stem rust resistance gene *Sr39* with reduced *Aegilops speltoides* chromatin and simple PCR markers for marker-assisted selection. *Theor Appl Genet* 119:1441–1450. <http://doi.org/10.1007/s00122-009-1146-7>
- Mago R, Verlin D, Zhang P et al (2013) Development of wheat-*Aegilops speltoides* recombinants and simple PCR-based markers for *Sr32* and a new stem rust resistance gene on the 2S#1 chromosome. *Theor Appl Genet* 126:2943–2955. <http://doi.org/10.1007/s00122-013-2184-8>
- McIntosh RA, Wellings CR, Park RF (1995) Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes. Canberra, Australia: CSIRO
- McIntosh RA, Dyck PL, The TT et al (1984) Cytogenetical studies in wheat. XIII. *Sr35* – a third gene from *Triticum monococcum* for resistance to *Puccinia graminis tritici*. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung* 92:1–14
- Nazari K, Al-Maaroof E, Kurtulus E et al (2021) First report of Ug99 race TTKTT of wheat stem rust (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) in Iraq. *Plant Dis* 105:2719. <http://doi.org/10.1094/PDIS-02-21-0404-PDN>
- Niu Z, Klindworth DL, Friesen TL et al (2011) Targeted introgression of a wheat stem rust resistance gene by DNA marker-assisted chromosome engineering. *Genetics* 187(4):1011–1021. <http://doi.org/10.1534/genetics.110.123588>
- Nurdan DO, Mahinur A, Buday B et al (2001) Optimization of PCR amplification of wheat simple sequence repeat DNA markers. *Turk J Biol* 25:153–158
- Olivera PD, Newcomb M, Flath K et al (2017) Characterization of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* isolates derived from an unusual wheat stem rust outbreak in Germany in 2013. *Plant Pathol* 66:1258–1266. <http://doi.org/10.1111/ppa.12674>
- Olivera P, Newcomb M, Szabo LJ et al (2015) Phenotypic and genotypic characterization of race TKTTF of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* that caused a wheat stem rust epidemic in Southern Ethiopia in 2013–14. *Phytopathology* 105(7):917–928. <http://doi.org/10.1094/PHTO-11-14-0302-FI>
- Olivera PD, Sikharulidze Z, Dumbadze R et al (2019) Presence of a sexual population of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Georgia provides a hotspot for genotypic and phenotypic diversity. *Phytopathology* 109(12):2152–2160. <http://doi.org/10.1094/PHTO-06-19-0186-R>
- Olivera PD, Szabo L, Kokhmetova A et al (2022a) *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* population causing recent wheat stem rust epidemics in Kazakhstan is highly diverse and includes novel virulences. *Phytopathology* 112(11):2403–2415. <http://doi.org/10.1094/phyto-08-21-0320-r>
- Olivera PD, Villegas D, Cantero-Martínez C et al (2022b) A unique race of the wheat stem rust pathogen with virulence on *Sr31* identified in Spain and reaction of wheat and durum cultivars to this race. *Plant Pathol* 71:873–889. <http://doi.org/10.1111/ppa.13530>
- Olson EL, Brown-Guedira G, Marshall D et al (2010) Development of wheat lines having a small introgressed segment carrying stem rust resistance gene *Sr22*. *Crop Sci* 50:1823–1830. <http://doi.org/10.2135/cropsci2009.11.0652>
- Patpour M, Hovmöller MS, Rodriguez-Algaba J et al (2022) Wheat stem rust back in Europe: Diversity, prevalence and impact on host resistance. *Front Plant Sci* 13:882440. <http://doi.org/10.3389/fpls.2022.882440>
- Patpour M, Hovmöller MS, Justesen AF et al (2016) Emergence of virulence to *SrTmp* in the Ug99 race group of wheat stem rust, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, in Africa. *Plant Dis* 100(2):522–552. <http://doi.org/10.1094/PDIS-06-15-0668-PDN>
- Periannan S, Moore J, Ayliffe M et al (2013) The gene *Sr33*, an ortholog of barley *Mla* genes, encodes resistance to wheat stem rust race Ug99. *Science* 341:786–788. <http://doi.org/10.1126/science.1239028>
- Pretorius ZA, Singh RP, Wagoire WW et al (2000) Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene *Sr31* in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Uganda.

- Plant Dis 84(2):203. <http://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.2.203B>
- Pretorius ZA, Szabo LJ, Boshoff WHP (2012) First report of a new TTKSF race of wheat stem rust (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) in South Africa and Zimbabwe. Plant Dis 96(4):590–590
- Qi LL, Pumphrey MO, Friebe B et al (2011) A novel Robertsonian translocation event leads to transfer of a stem rust resistance gene (*Sr52*) effective against race Ug99 from *Dasyphyrum villosum* into bread wheat. Theor Appl Genet 123:159–167. <http://doi.org/10.1007/s00122-011-1574-z>
- Rabinovich SV (1998) Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivars of *Triticum aestivum* L. Euphytica 100:323–340. <http://doi.org/10.1023/A:1018361819215>
- Rahmatov M, Rouse MN, Nirmala J et al (2016) A new 2DS·2RL Robertsonian translocation transfers stem rust resistance gene *Sr59* into wheat. Theor Appl Genet 129(7):1383–1392. <http://doi.org/10.1007/s00122-016-2710-6>
- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3-Volume Set). 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2
- Scarth R, Law CN (1983) The location of the photoperiod gene, *Ppd2* and an additional genetic factor for ear-emergence time on chromosome 2B of wheat. Heredity 51(3):607–619. <http://doi.org/10.1038/hdy.1983.73>
- Schumann GL, Leonard KJ (2000) Stem rust of wheat (black rust). The Plant Health Instructor. <http://doi.org/10.1094/PHI-I-2000-0721-01>
- Seyfarth R, Feuillet C, Schachermayr G et al (1999) Development of a molecular marker for the adult plant leaf rust resistance gene *Lr35* in wheat. Theor Appl Genet 99:554–560. <http://doi.org/10.1007/s001220051268>
- Simon MR, Börner A, Struik PC (2021) Editorial: Fungal wheat diseases: etiology, breeding, and integrated management. Front Plant Sci. <http://doi.org/10.3389/fpls.2021.671060>
- Singh RP, Hodson DP, Jin Y et al (2015) Emergence and spread of new races of wheat stem rust fungus: continued threat to food security and prospects of genetic control. Phytopathology 105(7):872–884. <http://doi.org/10.1094/PHYTO-01-15-0030-FI>
- Singh RP, Hodson DP, Huerta-Espino J et al (2011) The emergence of Ug99 races of the stem rust fungus is a threat to world wheat production. Ann Rev Phytopathol 49:465–481. <http://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095423>
- Skolotneva ES, Kosman E, Patpour M (2020) Virulence phenotypes of Siberian wheat stem rust population in 2017–2018. Front Agron 2. <http://doi.org/10.3389/fagro.2020.00006>
- Soko T, Bender CM, Prins R, Pretorius ZA (2018) Yield loss associated with different levels of stem rust resistance in bread wheat. Plant Dis 102(12):2531–2538
- Steuernagel B, Periyannan S, Hernández-Pinzyn I et al (2016) Rapid cloning of disease-resistance genes in plants using mutagenesis and sequence capture. Nat Biotechnol 34:652–655. <http://doi.org/10.1038/nbt.3543>
- Stokstad E (2007) Deadly wheat fungus threatens world's breadbaskets. Science 315:1786–1787. <http://doi.org/10.1126/science.315.5820.1786>
- The TT, Latter BDH, McIntosh RA et al (1988) Grain yields of near isogenic lines with added genes for stem rust resistance. Proc Seventh Int Wheat Genet Symp 2:901–909
- Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK et al (1991) The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. DNA Cell Biol 10(3):233–238. <http://doi.org/10.1089/dna.1991.10.233>
- Wu XX, Lin QJ, Ni XY et al (2020) Characterization of wheat monogenic lines with known *Sr* genes and wheat lines with resistance to the Ug99 race group for resistance to prevalent races of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in China. Plant Dis 104(7):1939–1943. <http://doi.org/10.1094/PDIS-12-19-2736-RE>
- Wu X-X, Zang C-Q, Zhang Y-Z et al (2023) Characterization of wheat monogenic lines with known *Sr* genes and wheat cultivars for resistance to three new races of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in China. J Integrat Agric 22(6):1740–1749. <http://doi.org/10.1016/j.jia.2022.08.125>
- Wu S, Pumphrey M, Bai G (2009) Molecular mapping of stem-rust-resistance gene *Sr40* in wheat. Crop Sci 49(5):1681–1686. <http://doi.org/10.2135/cropsci.2008.11.0666>
- Yu G, Zhang Q, Klindworth DL et al (2010) Molecular and cytogenetic characterization of wheat introgression lines carrying the stem rust resistance gene *Sr39*. Crop Sci 50:1393–1400
- Yu G, Matny O, Champouret N et al (2022) *Aegilops sharonensis* genome-assisted identification of stem rust resistance gene *Sr62*. Nat Commun 13(1):1607. <http://doi.org/10.1038/s41467-022-29132-8>
- Zhang W, Gao AL, Zhou B et al (2006) Screening and applying wheat microsatellite markers to trace individual *Haynaldia villosa* chromosomes. Acta Genetica Sinica 33(3):236–243. [http://doi.org/10.1016/S0379-4172\(06\)60046-2](http://doi.org/10.1016/S0379-4172(06)60046-2)
- Zhang J, Hewitt TC, Boshoff W et al (2021) A recombined *Sr26* and *Sr61* disease resistance gene stack in wheat encodes unrelated NLR genes. Nat Commun 12:3378 <http://doi.org/10.1038/s41467-021-23738-0>

Надійшла в редакцію 07.06.2024
Після доопрацювання 02.08.2024
Прийнята до друку 18.11.2024