

КОНСЕРВАТИВНІ ДІЛЯНКИ ГЕНІВ СТІЙКОСТІ ЯК ДЖЕРЕЛО НУКЛЕОТИДНИХ ПОЛІМОРФІЗМІВ У ДОСЛІДЖЕННІ ГЕКСАПЛОЇДІВ ПШЕНИЦІ

В.В. ПЛИГУН, М.З. АНТОНЮК, Т.К. ТЕРНОВСЬКА

Національний університет «Києво-Могилянська академія», вул. Сковороди 2, Київ, 04070, Україна

E-mail: v.plyhun@ukma.edu.ua, antonyuk.m@ukma.edu.ua, ternovska@ukma.edu.ua

Автор для кореспонденції – В.В. Плигун, e-mail: v.plyhun@ukma.edu.ua

Дослідження виконано для ідентифікації пар праймерів до консервативних ділянок генів стійкості *R* до борошнистої роси та інших патогенів пшениці, ефективних для виявлення поліморфізму у спектрах ампліконів між зразками, контрастними за стійкістю до борошнистої роси. Стійкими зразками були амфідиплоїд Авротіка (геном *AABBTT*) і створені на його основі лінії пшениці (*AABBDD*). Виявлення поліморфних компонентів спектрів дасть змогу використовувати відповідні пари праймерів для оцінювання перспективності сучасних сортів пшениці м'якої бути реципієнтом гена (генів) стійкості, що може бути переданий від Авротіки до генетичного пулу пшениці м'якої через статеву гібридизацію. Метод дослідження – ПЛР на геномній ДНК досліджених генотипів з застосуванням пар праймерів, розроблених з використанням послідовностей нуклеотидів у консервативних ділянках генів стійкості до борошнистої роси, а також вироджених праймерів до консервативних ділянок різних генів стійкості для довільного комбінування їх в пари за методом *RGAP*. Показано, що використання метода *RGAP* дає більше інформації про наявний поліморфізм в досліджених геномах у порівнянні з використанням праймерів до консервативних послідовностей генів *Rm*. Найбільшу варіабельність спостерігали з праймерами, створеними до ділянок, що кодують *LRR*-домени білків стійкості. Їх можна використовувати в комбінаціях з іншими праймерами за методом *RGAP*, для збільшення кількості ефективних ПЛР-маркерів генів стійкості.

Ключові слова: інтрогресивні лінії, *Amblyorugum tuiti*-сит, пшениця м'яка, стійкість до борошнистої роси, гени стійкості, метод *RGAP*, ПЛР-маркери.

Вступ. Гени стійкості до патогенів мають консервативні ділянки, які кодують нуклеотид-

зв'язувальні домени (*NBS*), повтори, багаті на лейцин (*LRR*), кіназні домени (Ercolano et al., 2022). Залежно від гену представленість цих ділянок є різною. Може варіювати і нуклеотидний склад згаданих ділянок (Kang et al., 2020). В геномі пшениці м'якої чимало генів стійкості *R* забезпечують її захист від різноманітних збудників хвороб. Частина їх перенесена до геному пшениці від близько-споріднених видів через інтрогресивну гібридизацію. Гени *R* можуть бути присутні у складі чутливих генотипів, не сприяючи розвитку стійкості на рівні фенотипу (Simeone et al., 2020). Гени *NBS-LRR* локалізовані на всіх хромосомах гексаплоїдного геному пшениці. Поза залежності від своєї ефективності вони зберігають характерну структуру, так що консервативні ділянки генів доступні для ампліфікації і можуть бути використані для створення маркерної системи з застосуванням ПЛР з праймерами, що фланкують такі послідовності. Одним з методів створення маркерних систем є *RGAP* (Resistance Gene Analog Polymorphism), який дає змогу отримувати поліморфні та багатокомпонентні спектри. В одну комбінацію можна поєднувати праймери, створені до різних генів стійкості та різних кодуювальних частин. Можливість такого поєднання обумовлене подібною структурою *R*-генів та нуклеотидним складом консервативних ділянок (Chen et al., 1988; Vendelbo et al., 2021). Для того, щоб використовувати цей підхід для створення маркерної системи, яку можна було б застосовувати для оптимізації процесу передачі чужинних генів стійкості до геному пшениці м'якої, потрібно дослі-

дити вихідний матеріал на наявність поліморфізму компонентів схрещування за спектрами ампліконів, які отримуються з праймерами до консервативних ділянок генів стійкості.

В статті представлені результати порівняння геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротіка з геномом AABVTT, створених на його основі стійких до борошнистої роси (збудник гриб *Blumeria graminis*) гексаплоїдних ліній пшениці м'якої та кількох сучасних сортів пшениці м'якої для з'ясування можливості використовувати результати оцінки RGAP для оптимізації роботи з гібридними популяціями від схрещування стійких ліній з комерційними сортами пшениці м'якої.

Матеріали і методи. У дослідженні використали: десять гексаплоїдних інтрогресивних ліній серії «tica» — похідних Авротіки (Ierphimenko et al., 2015), геномно-заміщений амфідиплоїд Авротіка (AABVTT, $2n = 42$), сорти пшениці м'якої *Triticum aestivum* (AABBDD, $2n = 42$) селекції Селекційно-генетичного інституту НААН Вдала, Панна, Лелека, Одеська 267, Селянка, Тіра, Ніконія та Краснодарського НДІСГ ім. П.П. Лук'яненка — Аврора. Сорти пшениці м'якої різною мірою вражаються борошнистою росою (3–4 бали за 9 бальною шкалою), амфідиплоїд Авротіка та лінії F_5 від його схрещування з сортом Аврора стійкі до *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*) впродовж років спостережень.

Для вивчення рослинного матеріалу послугувалися комбінаціями праймерів, створеними до консервативних послідовностей генів стійкості до борошнистої роси та інших патогенів (цист нематод, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). Оптимальні температури гібридизації праймерів з геномною ДНК підбирали за допомогою градієнтної ПЛР. Для збільшення специфічності ампліфікації використовували Touchdown PCR (TD-PCR). Продукти ампліфікації розділяли у 1,9%-вому агарозному гелі.

Для кластеризації кожного з блоків генотипів (1) «Авротіка та інтрогресивні лінії» та (2) «Авротіка та генотипи пшениці м'якої» на підставі визначення різноманітності за компонентами електрофоретичних спектрів, отриманих з парами вироджених праймерів, вико-

ристано програмне забезпечення STRUCTURE 2.3.4 (<https://lmme.ac.cn/StructureSelector/>).

Результати і обговорення. Порівняння генотипів за спектрами, отриманими з праймерами до генів *Pm*. Праймери розроблені з використанням нуклеотидних послідовностей генів стійкості *Pm2*, *Pm3*, *Pm4b*, *Pm8*, *Pm21*, *Pm24*, *Pm41*, доступних у GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), за допомогою програми Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>). Створено 20 пар праймерів, які обмежують консервативні послідовності вказаних генів (табл. 1).

У електрофоретичних спектрах ампліконів, отриманих з праймерами до генів *Pm*, спостерігали основні компоненти спектру та міnorні. У складі геномів досліджуваних сортів, за винятком сорту Одеська 267, з використанням комбінації праймерів *Pm2*-2 ідентифіковано послідовності, які кодують N-кінцеву ділянку *Pm2*. Генотипи відрізнялися за міnorними та мажорними компонентами, як за їхньою рухливістю, так і за альтернативною наявністю/відсутністю компоненту. ДНК Авротіки ампліфікації з праймерами до гена *Pm2* не дає, що цілком пояснюється складом її геному: ген *Pm2* знаходиться у хромосомі 5DS (Manser et al., 2021), а субгеном D у геномі Авротіки (AABVTT) відсутній.

З комбінаціями праймерів до різних частин гену *Pm3* отримано продукти ампліфікації з ДНК всіх досліджених зразків. Були ідентифіковані послідовності, які кодують домени NB-ARC (*Pm3*-5) та LRR (*Pm3*-1 — *Pm3*-4, *Pm3*-6). З комбінаціями *Pm3*-1-L — *Pm3*-4 у всіх сортів пшениці м'якої наявний лише один компонент у спектрі, мономорфний (рис. 1). З ДНК Авротіки не вдалося отримати продукту ампліфікації з *Pm3*-5 (рис. 1, а). *Pm3*-5 дозволяє ідентифікувати поліморфізм за фрагментом меншого розміру, який є у Аврори, проте відсутній у решти сортів. З *Pm3*-1 та *Pm3*-2, *Pm3*-4 поліморфізму між інтрогресивними лініями та Авротікою не спостерігали (рис. 1, в). Поліморфізм за рухливістю міnorних компонентів спектру виявлено з застосуванням праймерів *Pm3*-3. ДНК ліній tica1007, tica1075, tica1084, tica 1130, tica1187, tica1189, tica1094 утворює міnorні амплікони з більшою рухливістю, ніж у спектрах Авротіки

Таблиця 1. Праймери до генів стійкості до борошнистої роси пшениці м'якої

Праймер	Послідовність	Вміст G+C, %	Температура плавлення, °C
<i>Pm2</i>			
Pm2-1	L TACTTGGGTCACTGCAGCTG	55	59,35
	R GATCGGAGTAGCAGAGCACC	60	61,40
Pm2-2	L CAGGGAAATCTGTGGCGACT	55	59,35
	R GCTGGCTGCTGGTAGAAGAA	55	59,35
Pm2-3	L TTCTTCTACCAGCAGCCAGC	55	59,35
	R TCGACTCCCATCACCTTTGC	55	59,35
Pm2-4	L CTGGAGTCCGCATCCATACC	60	61,40
	R GTAGCAGCCATCGTTCAGGT	55	59,35
<i>алелі Pm3</i>			
Pm3-1	L GGGCTGCAGGTTCTGAAGAT	55	59,35
	R TCGACAGCAGCATCCCATTT	50	57,30
Pm3-2	L AGTTGCCATCCTCACCCATG	55	59,35
	R AGCAGGGCAGCCTGTAATTT	50	57,30
Pm3-3	L CCACTGGCCAGAGAATGTGT	55	59,35
	R AATGCTCTCTTGCACTGGT	50	57,30
Pm3-4	L GGGCTGCAGGTTCTGAAGAT	55	59,35
	R TCGACAGCAGCATCCCATTT	50	57,30
Pm3-5	L TCGACGTCATCACCGATGTC	55	59,35
	R GGCCAGGGAGTTCACATCAA	55	59,35
Pm3-6	L GGCAGTGGGCTCTGTACTTT	55	59,35
	R GATGCTGCAATGGGCTGAAC	55	59,35
Pm3-7	L GTTGCTGCTCTGGGTTTGTG	55	59,35
	R CACTGCTTCATGTGCGATGG	55	59,35
<i>Pm4</i>			
Pm4b-1	L AGATTGGACGCGGTGGATTT	50	57,30
	R CTCCTTCGCGAACTTCTGGT	55	59,35
Pm4b-2	L TCCGTGAGCAAATGGTTCGA	50	57,30
	R GTACGACGCTCACCACTAGG	60	61,40
<i>Pm21</i>			
Pm21-1	L CCCACATTGTTCATCGGGA	55	59,35
	R GCTAATTGTAGCGGGCTTGC	55	59,35
Pm21-2	L GAGCTAGCAAGGGCAACAGA	55	59,35
	R CCGTGTCACCTGTCCTCGAA	55	59,35
<i>Pm24</i>			
Pm24- WTK-1	L TCCAAGTGACGAAGAACCCG	55	59,35
	R CAATTGGACAACCTGCACGG	55	59,35
Pm24- WTK-2	L CTGCAGCATCACTTTGGCAG	55	59,35
	R TAGCAGAGCAGTTGTTCCGGG	55	59,4
<i>Pm41</i>			
Pm41-1	L GTAGGTGGCATCAAGGGCTT	55	59,4
	R CGCATTTGATGGCATCCCAG	55	59,4
Pm41-2	L CACCCATCGCCGTGATCATA	55	59,4
	R TTTCTTCAGCCGCCTTCGAT	50	57,3
Pm41-3	L GCCTGCGCAAGTAACATCTG	55	59,4
	R TATGATCACGGCGATGGGTG	55	59,4

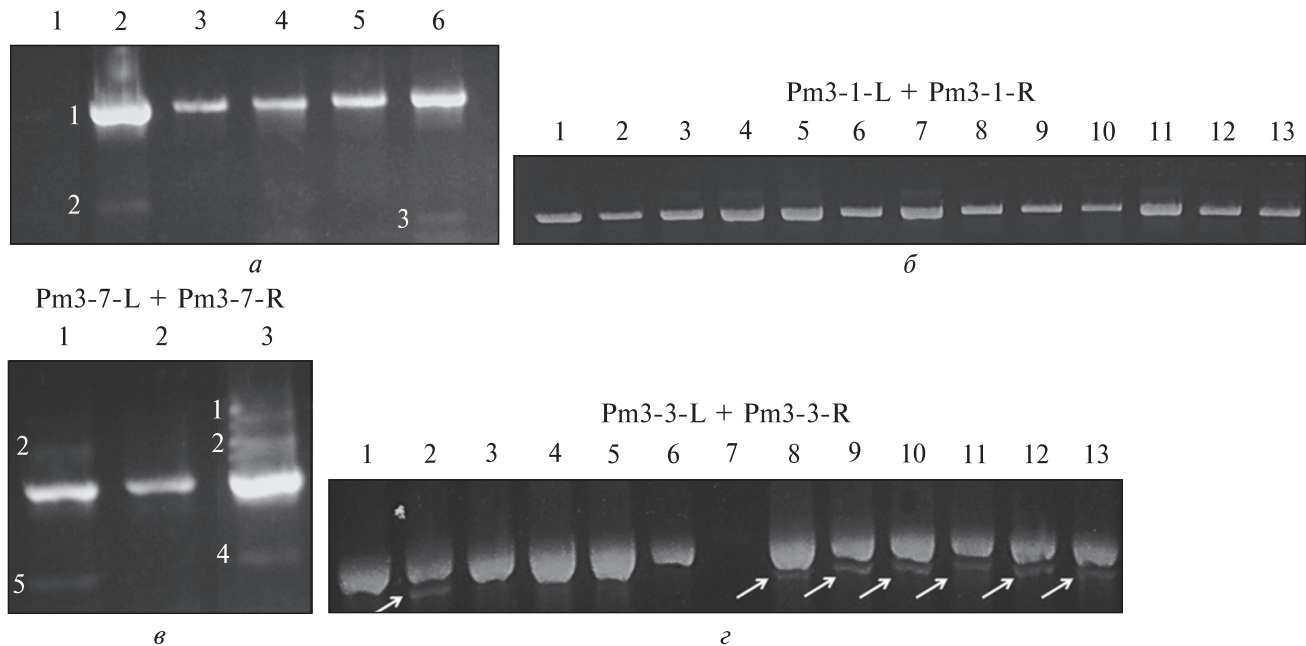


Рис. 1. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації з праймерами до *Pm*. а, в: 1 – Авротіка; 2 – Аврора; 3 – Тіра; 4 – Панна; 5 – Лелека; 6 – Одеська 267. б, з: 1 – Авротіка; 2 – tica1007; 3 – tica1049; 4 – tica1058; 5 – tica1063(2018); 6 – tica1063(2021); 7 – tica1075(2018); 8 – tica1075(2021); 9 – tica1084; 10 – tica1130; 11 – 1187; 12 – tica1089; 13 – tica1094

та Аврори. Ця комбінація праймерів фланкує одну з ділянок гену, яка кодує багаті на лейцин повтори, які вважають найбільш варіабельними частинами білків стійкості. Це було підтверджено прямим секвенуванням гену *Pm3* (Plyhun, 2024), а також результатами ампліфікації ДНК лінії tica1063 двох послідовних генерацій (рис. 1, з). З ДНК лінії tica1075 ампліфікації не було. З ДНК сортів одеської селекції ідентифіковано один мажорний компонент, мономорфний.

За спектрами, отриманими з праймерами Pm3-7, Аврора та Авротіка не розрізняються, але відрізняються від низки ліній, для яких ідентифіковано один важчий компонент (tica1187), або два (tica1049, tica1058, tica1063 (2018), tica1075). За мінорними компонентами розрізняються генотипи Авротіки, Тіри та Аврори (див. рис. 1, в).

З праймерами Pm4b-1, що фланкують частину гену, яка кодує домен, подібний до протеїнкінази, відрізнялись спектри сортів Аврора і Тіра: ДНК останнього генотипу ампліфікується з появою двох додаткових продуктів у порівнянні з ДНК Аврори. З Авротікою

продукту не отримано. З праймерами до іншої частини гену, яка кодує С-кінцеву фосфорибозилтрансферазу рослин, продукту не отримано.

Для пошуку гену *Pm21* у геномах використовували дві пари праймерів. З праймерами Pm21-1 ідентифіковано 3 фрагменти з різною рухливістю лише з ДНК сорту Аврора. В генотипах сортів послідовності гену *Pm24* не ідентифікували. Ген секвеновано зі зразка китайського місцевого генотипу (landrace) Hulutou (Lu et al., 2020). Тому *Pm24* може і не бути у сортів європейської частини континенту або його послідовність, з якою мають гібридизуватися праймери, зазнала змін. З праймерами *Pm41* не отримано продуктів ампліфікації, придатних для аналізу.

Отже, праймери до різних ділянок генів стійкості *Pm2*, *Pm3*, *Pm21*, *Pm41*, *Pm4b* давали ампліфікацію з ДНК окремих сортів, Авротіки і стійких ліній. Послідовностей, характерних для *Pm24*, у складі досліджуваних геномів не виявили. Звертає на себе увагу факт відсутності збігу спектрів Авротіки і Аврори, коли залучаються праймери до генів, локалізованих в

субгеномах А і В, спільних для цих генотипів. Адже Авротіка є геномно-заміщеним амфідіплоїдом, створеним через заміщення субгеному D сорту Аврора на геном Т дикорослого родича пшениці *Amblyopirum muticum*. З одного боку, це можна вважати підтвердженням наявності перебудов в субгеномах АВ Авротіки стосовно таких Аврори. З іншого боку отримані результати демонструють, що спроба зв'язати стійкість Авротіки та отриманих за її участю інтрогресивних ліній не може базуватися виключно на генах *Pm*, залучених до дослідження.

Порівняння генотипів за спектрами, отриманими за методикою *RGAP*. Другим підходом для ідентифікації послідовностей в геномі, дотичних до формування стійких генотипів, було формування пар праймерів до консервативних послідовностей генів стійкості до різних патогенів (цист нематод, *P. syringae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*), як це пропонується методикою *RGAP*, націленою на пошук поліморфізму аналогів генів стійкості (Resistance Gene Analog Polymorphism, *RGAP*) (Chen et al., 1998). У пари поєднували дев'ять вироджених праймерів, взятих з літературних джерел (Shtefiuk et al., 2016; Chen et al., 1998; Yan et al., 2007; Cheng et al., 2010; Shi, 2001). До конкретної комбінації праймерів могли залучити два прямих праймери або два зворотних, або

праймери, які фланкують різні консервативні ділянки генів стійкості. Серед консервативних послідовностей були залучені послідовності, які кодують повтори, багаті на лейцин. Використано гени стійкості до *Bgt Pm8* (Pm8-LRR-R, Pm8-LRR-L), до *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (XLRRrev), до *Pseudomonas syringae* (RLRRrev, RLRRfor), стійкості до цист нематод (Cre3Lr-F)). До останнього гену використовували також праймери, створені до різних частин кіназного домена – Cre3k3 та Cre3-P-loop (P-петля кіназного домену). Pm8-MHD-L був створений до послідовності, яка кодує карбокситермінальний кінець ARC2 (частина АТФази NB-ARC) та є висококонсервативною ділянкою з метіоніну, гістидину та аспартату (methionine-histidine-aspartate, MHD) (Slootweg et al., 2013). Комбінації, які давали успішну ампліфікації, наведено у табл. 2.

Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації, отримані за методикою *RGAP*, виявились багатокомпонентними. Тому їх описували за двійковою системою: «1» – наявний компонент, «0» – відсутній. Приклади кількох спектрів з багатьох, отриманих з різними комбінаціями праймерів, наведений на рис. 2 та у табл. 3. Різниця між генотипами проявлялася у варіації за наявністю/відсутністю певних компонентів. В багатьох випадках попарний розгляд спектрів дає змогу диференціюва-

Таблиця 2. Перелік комбінацій праймерів та їхніх температур гібридизації з ДНК-матрицею

№ з/п	Комбінації праймерів	t _{anel.}	№ з/п	Комбінації праймерів	t _{anel.}
1	Pm8-LRR-R + Pm8-LRR-L	58,4 та TD-PCR		Pm8-LRR-L + RLRRrev	54,2
2	Pm8-LRR-R + Pm8-MHD-L	56,7		Pm8-LRR-R + Cre3k3	57
3	Cre3k3 + Cre3Lr-F	54,2		Pm8-LRR-R + Cre3-P-loop	53,7
4	RLRRrev + Cre3_P-loop	54,2		Pm8-LRR-R + XLRRrev	53,7
5	RLRRfor + Cre3_P-loop	53,7		Cre3k3 + Pm8-MHD-L	53,7
6	RLRRrev + XLRRrev	53,7		Cre3k3 + XLRRrev	53,7
7	Cre3LrF + XLRRrev	53,7		Cre3LrF + Pm8-MHD-L	61,4
8	Cre3LrF + Cre3_P-loop	53,7		Cre3LrF + Cre3_P-loop	60,8
9	Cre3k3 + Cre3_P-loop	56,7		Pm8-LRR-R + Pm8-MHD-L	59,9
10	Cre3k3 + XLRRrev	56,7		RLRRfor + XLRRrev	56,7
11	Pm8-LRR-R + Cre3-Lr-F	53,7		Cre3k3 + RLRRfor	56,7
12	RLRRrev + RLRRfor	53,7		Pm8-LRR-L + XLRRrev	56,7
13	RLRRrev + Cre3Lr-F	58,4			

Примітка. t_{anel.} – температура гібридизації праймерів з ДНК-матрицею.

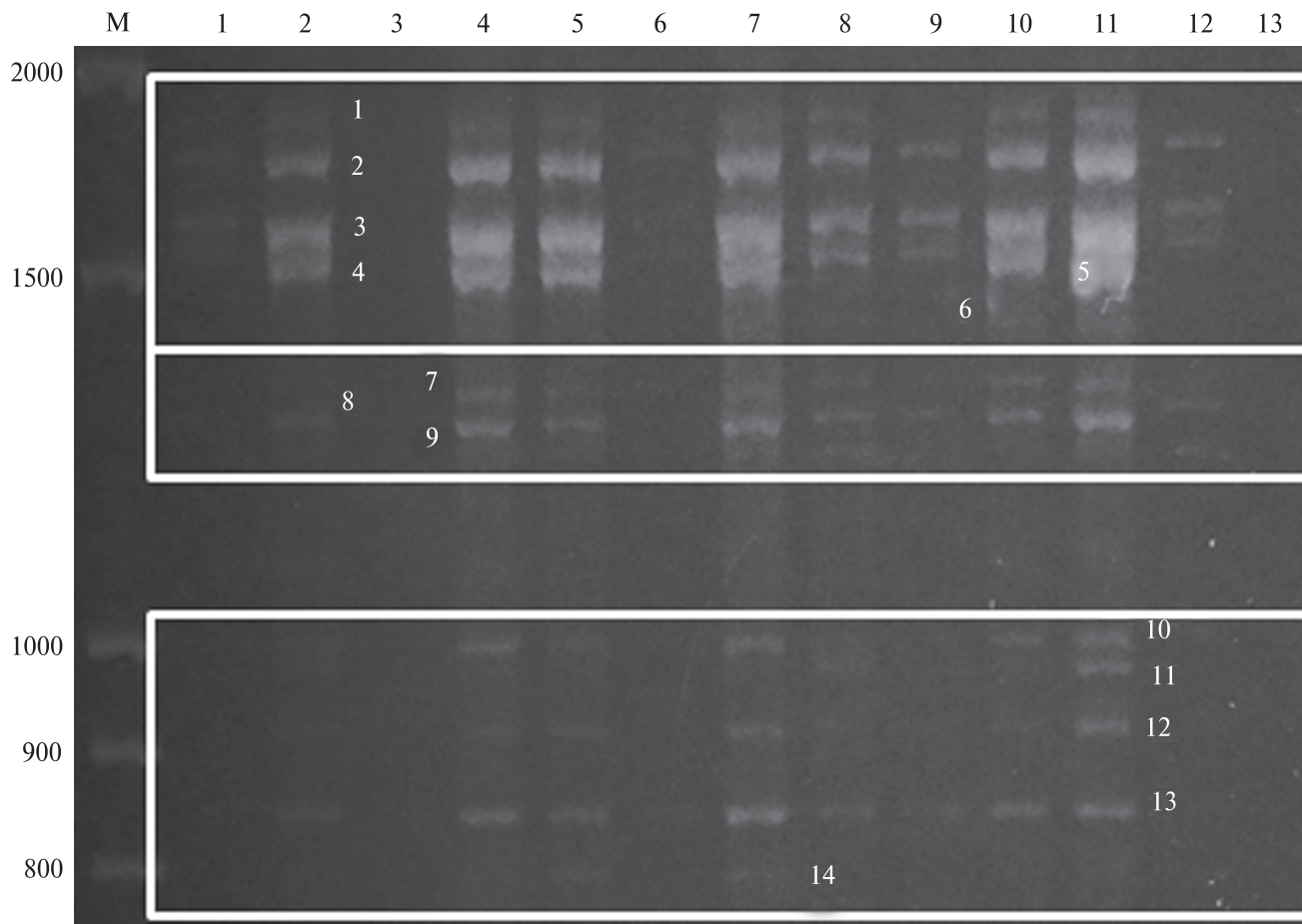


Рис. 2. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації з комбінацією праймерів RLRRrev + XLRRrev і ДНК Авротіки (1) та інтрогресивних ліній (2–13). М – маркер молекулярних мас 100bp DNA Ladder (Solis Biotec)

ти різні генотипи, отже відкриває можливість отримувати і аналізувати гібридні популяції від схрещування контрастних фенотипів одночасно за RGAP-спектрами та стійкістю до борошнистої роси.

Було проаналізовано спектри ампліконів, отриманих з 25 парами праймерів (табл. 2). Для порівняння сформували два блоки зразків: 1) Авротіка і всі інтрогресивні лінії «тіса», які вже отримано від схрещування Авротіка × Аврора і є стійкими; 2) Авротіка і всі сорти пшениці м'якої, які брали участь у схрещуванні з нею в спробах передати до генетичного пулу пшениці м'якої генетичні послідовності Авротіки, які задіяні в забезпеченні її стійкості. У середині кожного блока спектри ампліконів за кожною парою праймерів порівнювали попарно.

Найбільшу подібність очікували бачити між спектрами Аврори та Авротіки, адже вони мають два спільних субгеноми з трьох. З праймерами RLRRrev + Cre3_P-loop, Cre3LrF + XLRRrev, Cre3k3 + Cre3_P-loop, Cre3k3 + XLRRrev, RLRRrev + RLRRfor, Cre3k3 + RLRRfor та Pm8-LRR-L + XLRRrev різниця між вказаними генотипами щодо оцінки 1/0 стосовно окремих компонентів була мінімальна. За ділянками гену *Pm8*, фланкованими праймерами Pm8-LRR-R + Pm8-MHD-L, Аврора та Авротіка не відрізняються. За використання праймерів Pm8-LRR-L + XLRRrev ДНК Аврори утворює більше ампліконів, ніж ДНК Авротіки. З праймерами RLRRfor + Cre3_P-loop, Pm8-LRR-R + Cre3-Lr-F, Pm8-LRR-L + RLRRrev, Pm8-LRR-R + Cre3k3, Cre3k3 + Pm8-MHD-L, Cre3k3 + XLRRrev,

Таблиця 3. Опис електрофоретичних спектрів продуктів ампліфікації ДНК Авротіки і сортів пшениці м'якої, отриманих з комбінацією праймерів Pm8-LRR-L + XLRRrev. 1 – компонент наявний, 0 – компонент відсутній

Номер компонента спектра	Генотип								
	Авротіка	Аврора	Тіра	Панна	Лелека	Одеська 267	Селянка	Вдала	Ніконія
1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
2	1	1	1	1	1	1	0	0	0
3	1	1	1	1	1	1	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	1	0	0	0	0
6	0	1	0	1	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	1	0	0	0
8	0	0	0	0	1	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	1	0	0	0
10	0	1	0	0	1	0	0	0	0
11	0	1	0	0	1	1	0	0	0
12	0	0	0	0	1	0	0	0	0
13	0	0	0	0	1	0	0	0	0
14	0	0	0	0	1	0	0	0	0
15	0	0	1	0	1	1	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	1	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	1	0	0	0	0
20	0	0	0	0	1	0	0	0	0
21	0	1	0	0	1	0	0	0	0
22	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Cre3LrF + Pm8-MHD-L та RLRRfor + XLRRrev спектр компонентів ДНК Аврори відрізняється від такого Авротіки одним 0-алелем.

Для порівняльного вивчення спектрів ампліконів ДНК інтрогресивних ліній та Авротіки було використано лише 14 комбінацій праймерів із 25 перевірених. Ми уникали таких комбінацій, що показували неінформативну різницю у спектрі ампліконів. Неінформативною доводиться вважати різницю, коли у парі 0/1 відсутність амплікона («0») характеризує Авротіку, а «1» – Аврору.

Інтрогресивні лінії в спектрах ампліконів ДНК з відібраними парами праймерів демонстрували більшу варіабільність порівняно з батьківськими генотипами, Авротікою та Авророю. Це можна пояснити наявністю в їхніх геномах різного обсягу чужинного хроматину, який був отриманий від Т геному Авротіки. Він міг викликати певний рівень ге-

номної нестабільності, наслідки якої ми можемо спостерігати на спектрах ампліконів. Хоч такі відмінності у електрофоретичних спектрах спостерігаються, на рівні фенотипу за ознакою інтересу і Авротіка, і лінії є стійкими до борошнистої роси.

Нерідко виникала ситуація, коли стійка інтрогресивна лінія з певною парою праймерів не давала продуктів ампліфікації, в той час, як ДНК чутливих до борошнистої роси сортів пшениці м'якої утворювала амплікони. Давно встановлено, що між продуктами генів стійкості можлива взаємодія на рівні білків, і наслідком такої взаємодії може бути втрата стійкості до збудника. Наприклад, таке явище описано для різних функціональних алелів *Pm3*, коли продукти їхньої експресії взаємодіють з продуктами експресії *Pm8*. В результаті взаємодії білків утворюються нефункціональні комплекси, і рослина може бути сприй-

нятливою до патогену (Hurni et al., 2014). Тому можливим є припущення, що стійкість амфідиплоїда та створених за його участю ліній може виникати не тільки через набуття послідовностей генів стійкості, але і через їхню втрату або через поєднання цих двох явищ.

Сорти пшениці м'якої однозначно можна відрізнити від Авротіка за результатами ампліфікації з праймерами Cre3LrF + XLRRrev, Cre3LrF + Cre3_P-loop, Pm8-LRR-R + Cre3Lr-F, Cre3LrF + Pm8-MHD-L: з ДНК Авротіки ампліфікація відсутня. Проте така ситуація є неінформативною для аналізу популяцій, які розщеплюються за досліджуваною ознакою. Не можна зв'язати фенотип «стійка рослина» з певним компонентом спектра, отриманим від Авротіки, джерела стійкості в нашій роботі. Різницю за двійковою системою 1/0 між Авротікою і сортами пшениці м'якої одеської селекції отримали з парами праймерів Cre3k3 + RLRRfor, RLRRrev + Cre3_P-loop, Cre3LrF + XLRRrev, Pm8-LRR-R + Cre3LrF, Pm8-LRR-L + RLRRrev, RLRRfor + XLRRrev, Cre3k3 + RLRRfor, Pm8-LRR-L + XLRRrev. Це дає змогу в спектрах ампліконів ДНК нащадків від схрещування Авротіки з сортами пшениці виділити нащадків з ампліконами, властивими Авротіці. З праймерами Pm8-LRR-R + Pm8-MHD-L, RLRRfor + Cre3_P-loop, Cre3LrF + Cre3_P-loop, Cre3k3 + Cre3_P-loop, RLRRrev + RLRRfor отримали спектри, поліморфні між сортами і Авротікою лише за одним компонентом, причому варіант «0» був притаманний переважно спектру Авротіки. Спектри ампліконів ДНК Авротіки і сортів, отриманих з парами праймерів Cre3LrF + Cre3_P-loop та Cre3k3 + Pm8-MHD-L інтересу для роботи не становили через малу кількість ампліконів і відсутність поліморфізму.

Структурування множини генотипів за генетичним поліморфізмом щодо ампліконів, отриманих з виродженими праймерами. Використовуючи програмне забезпечення STRUC-TURE 2.3.4, будували структуру популяцій (1) Авротіка + інтрогресивні лінії та (2) Авротіка + сорти пшениці м'якої за результатами електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації з комбінаціями вироджених праймерів до різних консервативних послідовностей

генів стійкості. Для першої популяції використали комбінації праймерів під номерами 1–10 із табл. 1, для другої – 2,4,5,7–15,18, 20,24,25 з тієї ж таблиці.

Програмне забезпечення, створене Прічардом та співавторами (Pritchard et al., 2000) дає змогу ідентифікувати генетично однорідні групи (кластери, субпопуляції) особин за допомогою алгоритму Баєса. Розділення на субпопуляції відбувається з використанням молекулярних маркерів, в нашому випадку – це консервативні послідовності генів стійкості. Визначається кількість субпопуляцій K . Розраховується логарифмічна ймовірність для кожного значення K , щоб оцінити більш ймовірну кількість кластерів. Надається кількісна оцінка ймовірності віднесення кожної особи до певної субпопуляції (кластеру). Отримані результати є наближеними до справжньої оцінки кількості кластерів, тобто не є абсолютною оцінкою.

Використовували результати розділення ампліконів, переведені у двійкову систему, де «0» – компонент спектру відсутній, «1» – компонент є. Приймали припущення, що один алель кодує один компонент спектру. Отже, для 10 комбінацій популяції (1) працювали з 65 компонентами для 13 генотипів, включаючи амфідиплоїд Авротіка.

Для знаходження кількості субпопуляцій K , на яку можуть бути підрозділені досліджувані організми, встановлювали Burn-in period (період вигорання) – 3, кількістю повторів для кожного значення K (від 1 до 13) – 10 000 MCMC (Markov Chain Monte Carlo). Burn-in period – термін, який описує викидання деяких повторів (ітерацій) на початку запуску MCMC. Для кожного K проводили 10 незалежних повторів. Для пошуку оптимальної кількості груп (ΔK) використовували CLUMPAK (Cluster Markov Packager Across K) (<https://clumpak.tau.ac.il/bestK.html>), створений за методикою Evanno та співавторів (Evanno et al., 2005).

З використанням описаного програмного забезпечення аналізували популяції (1) та (2) з метою перевірити: чи є однаковими Авротіка та інтрогресивні лінії, її похідні, чи відрізняється резистентний амфідиплоїд від чутливих сортів за сукупністю поліморфних ампліконів.

Авротіка є джерелом послідовностей, які можуть бути пов'язані зі стійкістю до борошнистої роси, тому виникає питання — чи можуть Авротіка та сорти пшениці м'якої утворювати одну популяцію за проаналізованими послідовностями нуклеотидів. Ампліфікація відбувалася з ДНК чутливих та резистентних генотипів з різними результатами щодо спектрів ампліфікації. Приймали їх за одну популяцію, оскільки Авротіка містить геноми А та В від сорту пшениці м'якої Аврора, отже входить до генетичного пулу пшениці м'якої. В цьому випадку використовували модель з домішками, оскільки за такої моделі припускають, що особини мають генетичний матеріал не від одного предка. Дійсно, Авротіка має субгеном Т від дикорослого диплоїдного виду. А в сортах пшениці м'якої замість нього у наявності субгеном D. Всього використано 16 комбінацій праймерів, загальна кількість задіяних в розрахунках компонентів спектру — 133.

Використовували значення К від 1 до 6, для кожної кількості субпопуляцій робили по 10 повторів. Оптимальним є розподіл популяції на дві субпопуляції, хоча розподіл ймовірностей підроздільності на дві групи та не підроздільної популяції є майже однаковим. Розподіл організмів на кластери відбувається за вирахованими ймовірностями, що організм належить саме до цього кластеру. Гранична ймовірність бути віднесеним до кластеру дорівнює 0,5.

При розподілі на дві субпопуляції очікували отримати результат з об'єднанням Авротіки та сорту Аврора в одну групу, або формування субпопуляції з одної Авротіки. Однак результат був іншим. В один кластер об'єднані Авротіка та сорт Тіра селекції СГІ (рис. 3). Решта сортів одеської селекції та Аврора об'єднані у іншу субпопуляцію. Стовпчаста діаграма побудована на основі оптимальної К.

До першого кластеру входить 0,335 загальної популяції, до другого — 0,665. Субпопуляції в своїх межах є гомогенними та високодиференційовані між собою. Лише деякі генотипи роблять мінімальний внесок в інший кластер.

У дослідженні використані сорти, створені у різних закладах, тобто вони отримані в результаті різних селекційних програм: Авро-

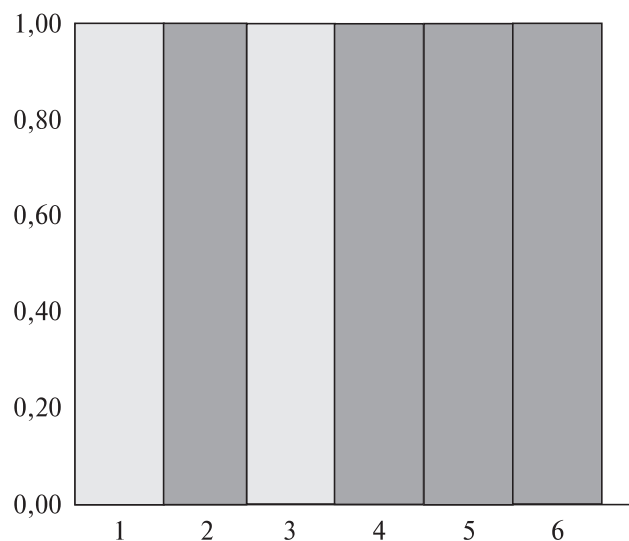


Рис. 3. Структура популяції, утвореної амфідиплоїдом Авротіка та сортами пшениці м'якої: 1 — Авротіка, 2 — Аврора, 3 — Тіра, 4 — Панна, 5 — Лелека, 6 — Одеська 267

ра — Краснодарський НДІСГ, інші сорти — Одеський селекційно-генетичний інститут. Проте і отримання сортів за різними селекційними програмами не дозволило їх розділити на різні субпопуляції з використаними молекулярними маркерами. Можливо це пояснюється тим, що рослинний матеріал досліджували за консервативними ділянками генів стійкості до борошнистої роси, а гени стійкості, навіть якщо вони і втратили свою ефективність, є в геномах всіх сучасних сортів пшениці. Проте серед досліджуваних рослин є стійкий амфідиплоїд. Можна припустити, що послідовності, які ідентифікували з доступними комбінаціями праймерів, не є критичним для формування стійкого фенотипу. Крім того, в моделі використовували лише нуклеотидні послідовності, а їхня наявність у геномі не завжди пов'язана з формуванням певного фенотипу за стійкістю через існування епігенетичних змін, взаємодій між продуктами генів, наявності різних рас патогенів за польових умов вирощування зразків. Отже, за отриманими результатами компоненти спектрів ампліконів, отриманих з виродженими праймерами до генів стійкості не дають можливості відокремити в різні кластери резистентний амфідиплоїд та чутливі сорти пшениці м'якої.

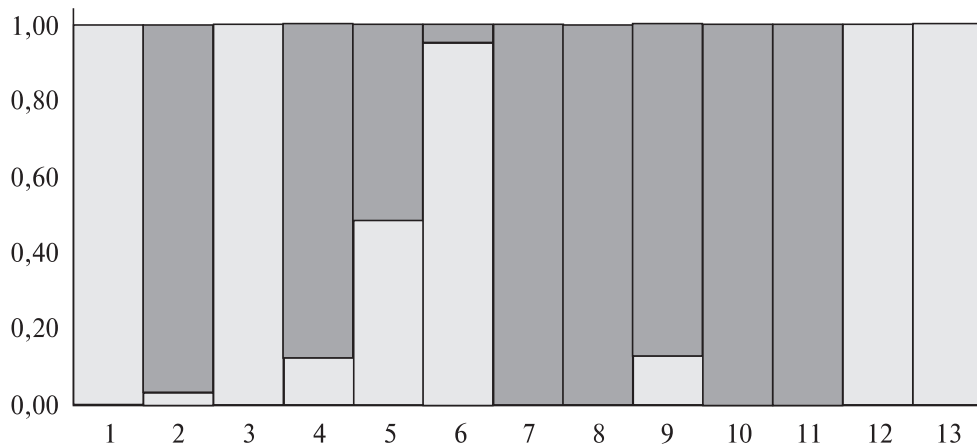


Рис. 4. Структура популяції, утвореної генотипами з різною кількістю генетичного матеріалу від *Am. muticum* (амфідиплоїд та інтрогресивні лінії, створені за його участі): 1 – амфідиплоїд Авротіка, 2 – tica1007, 3 – tica1049, 4 – tica1058, 5 – tica1063(2018), 6 – tica1063(2021), 7 – tica1075(2018), 8 – tica1075(2021), 9 – tica1084, 10 – tica1130, 11 – tica1187, 12 – tica1089, 13 – tica1094

У випадку Авротіки та її ліній використовували модель без домішок. Досліджувані лінії створені з використанням Авротіки та сорту Аврора, тобто вони мають спільні батьківські генотипи. Ці лінії добирали за стійкістю до борошнистої роси протягом років спостережень і вони мають в своєму геномі частину генетичного матеріалу від *Am. muticum*, донора субгеному Т Авротіки. Тому вважатимемо, що жодна з цих ліній не є сторонньою у популяції. І у цьому випадку найбільш ймовірним виявився розподіл організмів в дві субпопуляції (рис. 4). Амфідиплоїд Авротіка, інтрогресивні лінії tica1049, tica1089, tica1094 утворюють першу субпопуляцію або кластер. Другу субпопуляцію – інтрогресивні лінії tica1007, tica1075(2018), tica1075(2021), tica1130, tica 187. Внесок до обох субпопуляцій дають лінії tica1058, tica1063(2018), 1063(2021), 1084.

Частка особин, яка входить до першої субпопуляції – 0,559, другої – 0,441. Розрахована очікувана гетерозиготність між особинами в одній субпопуляції для першої дорівнює 0,1827, для другої – 0,2633.

Хоча інтрогресивні лінії були створені з використанням одного й того ж амфідиплоїда, але не всі з них потрапили у одну субпопуляцію з амфідиплоїдом. Це говорить про дифереціацію між цими організмами, хоча на стійкість ліній до борошнистої роси вона і не впливає. Підроздільність на субпопуляції на

основі консервативних послідовностей генів стійкості підтверджує те, що лінії отримали від амфідиплоїда різну кількість генетичного матеріалу принаймні такого, що складає досліджувані послідовності.

Висновки. Дослідження рослинного матеріалу з використанням методики RGAP дає більше інформації про представленість ділянок у геномі, які можуть бути задіяними у розвитку стійкості, оскільки електрофоретичні спектри є багатокомпонентними і поліморфними. Такі спектри можуть бути використані для відслідковування в популяціях, що розщеплюються, зв'язку між певними ампліконами спектрів і ознакою стійкості до борошнистої роси. Використання праймерів до консервативних послідовностей генів *Pm* дало менше інформації. Найбільшу варіабельність спостерігали з праймерами створеними до LRR. Їх можна використовувати в комбінаціях з іншими праймерами за методом RGAP, для збільшення кількості ефективних ПЛР-маркерів генів стійкості.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить будь-яких досліджень за участю людей або тварин, як об'єктів дослідження.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Дослідження частково фінансувалося за рахунок гранту Плигун В.В. від Благодійного Фонду відродження КМА (2022 р.).

CONSERVED REGIONS OF RESISTANCE GENES AS A SOURCE OF NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN WHEAT HEXAPLOIDS STUDIES

V.V. Plyhun, M.Z. Antonyuk, T.K. Ternovska

National University of Kyiv-Mohyla Academy,
2 Skovorody vul., Kyiv, 04070, Ukraine

E-mail: v.plyhun@ukma.edu.ua, antonyuk.m@ukma.edu.ua, ternovska@ukma.edu.ua

The study was performed to identify primer pairs to conserved regions of R resistance genes to powdery mildew and other wheat pathogens effective in detecting polymorphism in amplicon spectra between samples contrasting in powdery mildew resistance. The resistant samples were the amphidiploid Aurotica (AABBTT genome) and wheat lines developed on its basis (AABBDD). Detection of polymorphic components of spectra will make it possible to use appropriate primer pairs to assess the prospects of modern varieties of common wheat to be a recipient of the resistance gene(s) that can be transferred from Aurotica to the genetic pool of common wheat through sexual hybridization. The research method is PCR on genomic DNA of the studied genotypes using primer pairs developed using nucleotide sequences in conserved regions of powdery mildew resistance genes, as well as degenerate primers to conservative regions of different resistance genes for arbitrary pairing of them using the RGAP method. The use of the RGAP method was shown to provide more information about the polymorphism present in the studied genomes compared to the use of primers to conserved sequences of Pm genes. They can be used in combinations with other RGAP primers to increase the number of effective PCR markers of resistance genes.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Chen, X.M., Line, R.F., and Leung, H., Genome scanning for resistance-gene analogs in rice, barley, and wheat by high-resolution electrophoresis, *Theor. and Appl. Gen.*, 1998, vol. 97, no. 3, pp. 345–355. <https://doi.org/10.1007/s001220050905>
- Cheng, P., and Chen, X.M., Molecular mapping of a gene for stripe rust resistance in spring wheat cultivar IDO377s, *Theor. and Appl. Gen.*, 2010, vol. 121, no. 1, pp. 195–204. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1302-0>
- Ercolano, M.R., D'Esposito, D., Andolfo, G., Frusciante, L., Multilevel evolution shapes the function of NB-LRR encoding genes in plant innate immunity, *Front Plant Sci.*, 2022, vol. 13, pp. 1007288. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1007288>
- Evanno, G., Regnaut, S., and Goudet, J., Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study, *Mol. Ecol.*, 2005, vol. 14, no. 8, pp. 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Hurni, S., Brunner, S., Stirnweis, D., Herren, G., Pedditto, D., McIntosh, R.A., and Keller, B., The powdery mildew resistance gene *Pm8* derived from rye is suppressed by its wheat ortholog *Pm3*, *Plant J: For Cell Mol. Biol.*, 2014, vol. 79, no. 6, pp. 904–913. <https://doi.org/10.1111/tbj.12593>
- Iefimenko T.S., Fedak Yu.G., Antonyuk M.Z., and Ternovska T.K., Microsatellite analysis of homoeologous chromosome group 5 of introgressive wheat lines *Triticum aestivum/Amblyopyrum muticum*, *Cytol. Genet.*, 2015, vol. 49, no. 3, pp.45–54. <https://doi.org/https://www.doi.org/>
- Kang, Y., Zhou, M., Merry, A., and Barry, K., Mechanisms of powdery mildew resistance of wheat – a review of molecular breeding, *Plant Pathology*, 2020, vol. 69, no. 4, pp. 601–617. <https://doi.org/10.1111/ppa.13166>
- Lu, P., Guo, L., Wang, Z., Li, B., Li, J., Li, Y., Qiu, D., Shi, W., Yang, L., Wang, N., Guo, G., Xie, J., Wu, Q., Chen, Y., Li, M., Zhang, H., Dong, L., Zhang, P., Zhu, K., and Liu, Z., A rare gain of function mutation in a wheat tandem kinase confers resistance to powdery mildew, *Nature Commun.*, 2020, vol. 11, no. 1, pp. 680. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14294-0>
- Manser, B., Koller, T., Praz, C.R., Roulin, A.C., Zbinden, H., Arora, S., Steuernagel, B., Wulff, B.B.H., Keller, B., and Sánchez-Martín, J., Identification of specificity-defining amino acids of the wheat immune receptor Pm2 and powdery mildew effector AvrPm2, *Plant J: For Cell Mol. Biol.*, 2021, vol. 106, no. 4, pp. 993–1007. <https://doi.org/10.1111/tbj.15214>
- Plyhun, V.V., and Antonyuk, M.Z., Variability of a number of *Pm* gene sequences in representatives of Triticeae, *Fakt. Eksp. Evol. Org.*, 2024, vol. 34, pp. 102–108. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v34.1624>
- Pritchard, J.K., Stephens, M., and Donnelly, P., Inference of population structure using multilocus genotype data, *Genetics*, 2000, vol. 155, no. 2, pp. 945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- Shi, Z.X., Chen, X.M., Line, R.F., Leung, H., and Wellings, C.R., Development of resistance gene analog polymorphism markers for the *Yr9* gene resistance to wheat stripe rust, *Genome*, 2001, vol. 44, no. 4, pp. 509–516. <https://doi.org/10.1139/g01-028>
- Shtefiuk, T.V., Mykhailiuk, S.YU., Antonyuk, M.Z., Ternovska, T.K., Characteristics of genetic diversity in the introgressive wheat lines by *R* genes conservative regions, *Fakt. Exp. Evol. Org.*, 2016; vol. 19, pp. 55–60. <https://ekmair.ukma.edu.ua/server/api/core/bitstreams/26e0cbb6-3dd5-4e46-b152-a7e5d710e9d7/content>

- Simeone, R., Piarulli, L., Nigro, D., Signorile, M.A., Blanco, E., Mangini, G., and Blanco, A., Mapping Powdery Mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) Resistance in Wild and Cultivated Tetraploid Wheats, *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, vol. 21, no. 21, pp. 7910. <https://doi.org/10.3390/ijms21217910>
- Slootweg, E.J., Spiridon, L.N., Roosien, J., Butterbach, P., Pomp, R., Westerhof, L., Wilbers, R., Bakker, E., Bakker, J., Petrescu, A.-J., Smant, G., and Goverse, A., Structural determinants at the interface of the ARC2 and leucine-rich repeat domains control the activation of the plant immune receptors Rx1 and Gpa2, *Plant Physiol.*, 2013, vol. 162, no. 3, pp. 1510–1528. <https://doi.org/10.1104/pp.113.218842>
- Vendelbo, N.M., Mahmood, K., Sarup, P., Kristensen, P.S., Orabi, J., and Jahoor, A., Discovery of a novel powdery mildew (*Blumeria graminis*) resistance locus in rye (*Secale cereale* L.), *Sci. Rep.*, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 23057. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02488-5>
- Yan, G., and Chen, X., Molecular mapping of the rps1.A recessive gene for resistance to stripe rust in BBA 2890 barley, *Phytopath.*, 2007, vol. 97, no. 6, pp. 668–673. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-6-0668>

Надійшла в редакцію 03.02.2025
Після доопрацювання 10.03.2025
Прийнята до друку 18.07.2025