МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ «КИЄВО-МОГИЛЯНСЬКА АКАДЕМІЯ»

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ПЛИГУН ВІКТОРІЯ ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 575.113

ДИСЕРТАЦІЯ

ЕКСПРЕСИВНІСТЬ СТІЙКОСТІ ДО БОРОШНИСТОЇ РОСИ У ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЯХ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ

Спеціальність 091 «Біологія»
Галузь знань 09 «Біологія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

 В. В. Плигун

Науковий керівник **Антонюк Максим Зиновійович**, доктор біологічних наук, старший науковий співробітник, завідувач кафедри біології НаУКМА

Київ – 2025

АНОТАЦІЯ

Плигун В.В. Експресивність стійкості до борошнистої роси у інтрогресивних лініях пшениці м'якої. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія». – Національний університет «Києво-Могилянська академія», Київ, 2025.

У дисертаційному дослідженні описано прояв стійкості у гібридного рослинного матеріалу, отриманого через інтрогресивну гібридизацію з залученням генетичного матеріалу ліній-похідних амфідиплоїдів (AABBXX), які мають геноми диплоїдних дикорослих видів (XX) та субгеноми A та B пшениці м'якої Аврора (AABBDD). У роботі використано лінії Авротіки (AABBTT), Авродесу (AABBSS), Аврозису (AABB$S^{sh}S^{sh}$) та Авролати (AABBUU). Останній геном амфідиплоїдів походить від *Amblyopyrum muticum* Boiss. (van Slageren) (*Aegilops mutica* Boiss), *Aegilops speltoides*, *Aegilops sharonensis*, *Aegilops umbellulata*, відповідно. З використанням інтрогресивних ліній та низки сортів пшениці м'якої отримані популяції, які розщеплюються за дослідною ознакою у трьох поколіннях (F_{1-3}). Схрещували контрастні генотипи – стійкі лінії та сорти, які уражуються патогеном. Гібриди отримані за різних напрямків схрещувань – прямого (інтрогресивна лінія була материнською рослиною) та зворотного (лінія була донором пилку для запилення сорту). Одні з гібридів, отримані через запилення стійких гібридів F_2 сортом, який міг бути відмінний від того, з яким отримано материнську рослину F_1. Отриманий рослинний матеріал оцінювали у польових умовах та добирали для вивчення за структурою генів ті рослини, що зберігають ознаку у поколіннях. Оцінено рослинний матеріал за ознакою стійкості – батьківські генотипи та гібриди.

Серед доступних у біологічній базі даних GenBank відібрано сиквенси шести генів стійкості до борошнистої роси: *Pm2, Pm3, Pm4b, Pm8*, *Pm21, Pm24, Pm41*. Серед перерахованих, для *Pm2, Pm3* та *Pm24* знайдено декілька сиквенсів. В межах кожного з генів ідентифіковані відмінності: інсерції / делеції (одно-, двонуклеотидні), транзиції та трансверсії. Серед кодувальних ділянок, які мають гени, найбільше варіюють LRR-кодувальні частини у *Pm3*. Наявність таких варіацій може впливати на амінокислотний склад білків. Ідентифікована різниця між послідовностями в межах кожного з генів є статистично недостовірною (p<0,05), що було доведено через розрахунок критерію Колмогорова – Смірнова (для *Pm24*) та критерію нуклеотидної різноманітності Тадзіми (для *Pm2, Pm3*). Проте варіювання нуклеотидного складу генів може впливати на амінокислотний склад білків стійкості та їхнє функціонування. З використанням послідовностей перерахованих генів та проведеного біоінформатичного аналізу створено 20 пар праймерів до консервативних послідовностей *Pm*, які кодують: Rx N-термінальний, C2, протеїнкіназоподібний, NB-ARC домени, повтори, багаті на лейцин, рослинну С-кінцеву фосфорибозилтрансферазу, каталітичний домен серин / треонінової кінази інтерлейкін-1 асоційованої рецептор-асоційованої кінази (serine/threonine kinase interleukin-1 receptor associated kinase, STKc-IRAK).

Відслідковано наявність послідовностей геному, які можна пов’язати зі стійкістю, за допомогою ділянок генів стійкості, які використовували як маркерні. Проаналізовані батьківські генотипи (амфідиплоїди, лінії та сорти) з метою пошуку поліморфізму за послідовностями генів стійкості. Припускаємо, що джерелом бажаної ознаки є послідовності геному диплоїдного виду або ж ці ділянки опосередовано впливатимуть на резистентність – мають позитивний ефект на прояв дії генів, які мають пшеничні геноми. Тому вивчали і амфідиплоїди за структурою генів стійкості, щоб визначати які ділянки вони мають та які ділянки отримають генотипи, створені за їхньої участі. Для вивчення рослинного матеріалу використовували два підходи. Під час першого – аналізували з використанням праймерів, створених до *Pm*. Під час

другого підходу послуговувалися методикою поліморфізму аналогів стійкості (RGAP), оскільки вона дозволяє виявляти ділянки геномів, притаманні для генів стійкості. Для RGAP використовували дев'ять праймерів до послідовностей генів стійкості до цист нематод у гексаплоїдної пшениці (ген *Cre3*), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* у рису (ген *Xa21*), *Pseudomonas syringae* у арабідопсису (ген *RPS2*). Праймери були комплементарні до ділянок, які кодують повтори, багаті на лейцин та кіназні домени. Ці праймери комбінували у пари, так, що в одній парі могли опинитись праймери до різних кодувальних ділянок, різних генів стійкості, одночасно два правих чи два лівих праймера.

В складі геномів ідентифіковано ділянки, характерні для генів *Pm2, Pm3, Pm4b, Pm8*, *Pm21, Pm41*. Послідовності *Pm24* не виявлено. Сиксенс, розміщений у базі даних, отриманий з китайського місцевого зразку, тому ген може бути відсутній у рослин з європейської частини континенту або ж послідовності, до яких створені праймери, зазнали змін. Мінливість за дослідними ділянками була у наявності або відсутності конкретної ділянки у геномі. Найбільшу варіабельність отримано з праймерами, які створені до LRR-кодувальних послідовностей *Pm3*, що узгоджується з літературними даними та проведеним біоінформатичним дослідженням сиквенсів. В цьому випадку поліморфізм полягав у присутності / відсутності мінорних компонентів у електрофоретичному спектрі, які мали більшу рухливість у електричному полі, порівняно з основним компонентом. Послідовності перелічених генів виявлені у складі як стійких, так і уражених генотипів. З використанням методики RGAP отримано багатокомпонентні та поліморфні спектри. Різниця між генотипами знайдена з використанням праймерів до послідовностей, які кодують лейцинові повтори, домен NB-ARC, домен з протеїнкіназною активністю.

Через аналіз контрастних генотипів за молекулярною організацією генів стійкості, за представленістю цільових ділянок були відібрані комбінації праймерів, які дозволили відрізнити батьківські генотипи та в подальшому аналізувати гібридні популяції, створені за їхньою участю. Показано, що інтрогресивні лінії відрізняються за кількістю електрофоретичних компонентів

від Авротіки. Спектри лінії мають більшу кількість компонентів. Це може свідчити про різну кількість послідовностей геному Т, які отримали лінії, або перебудовами пшеничних субгеномів, які міг викликати чужинний хроматин. Відмінність у спектрах Авротіки та ліній не впливає на опірність патогенові.

З метою збільшення інструментальної бази для дослідження рослин об'єднували у пари праймери, створені до *Pm*, як це робили при використанні техніки поліморфізму аналогів генів стійкості. Оскільки була знайдена різниця між генотипами з праймерами, створеними до ділянок, які кодують LRR, нуклеотидозв'язувальний домен та кіназні домени, то створювали пари так, щоб хоча би один з праймерів був створений до цих ділянок. Такий підхід дозволив ідентифікувати варіабельність за ділянками, характерними для гена *Pm2*.

Через поєднання технік аналізу поліморфізму аналогів генів стійкості та групового аналізу популяцій вивчали популяції, які розщеплюються за дослідною ознакою. Гібриди, об'єднували у групи, базуючись на їхньому спільному походженні – інтрогресивній лінії, з якою отримано гібриди. Аналізували дві контрастні групи. В одну групу об'єднували ДНК від стійких генотипів (ліній, стійких гібридів), в іншу – від чутливих (сортів, чутливих гібридів). Отримали три покоління гібридів, частина з яких втрачала стійкість у поколіннях, тому ДНК від таких рослин не включали в групи. З рослинним матеріалом, який потенційно може мати генетичний матеріал від Авродесу, між контрастними групами знайдена варіабельність з праймерами, створеними до LRR. У випадку Аврозису та Авротіки – з NB-ARC та праймерами до ділянок, які кодують домени з протеїнкіназною активністю.

Поведінку хроматину чужинного походження та його вплив на пшеничний геном було вивчено і під час мейотичного поділу, який визначає, який хроматин потрапить до складу гамет, які залучаються у запилення. Так само впливатиме і поєднання гамет. Наявність інтрогресій під час вивчення чавлених препаратів материнських клітин пилку спостерігали як наявність хромосомних асоціацій відмінних від закритих біваленентів – унівалентів, відкритих

бівалентів та мультивалентів (тривалентів та квадривалентів). Сорти пшениці м'якої є цитологічно стабільними, у складі метафазної пластинки мають 21 закритий бівалент. МКП сорту пшениці м'якої Аврора могли утворювати 1-2 відкритих біваленти через наявність житньої транслокації 1BL·1RS у геномі сорту. МКП Авротіки мали всі згадані типи хромосом, проте така їхня поведінка у мейозі не впливає на прояв ознаки на рівні рослини. Поєднання в одному геномі інтрогресованого хроматину та пшеничного може впливати на кон'югацію між гомологічними ділянками, так що втрачатиметься не тільки хроматин чужинного походження. Спостерігали утворення хромосомних мостів, мікроядер, які, як і хромосоми, які не є бівалентами, будуть відставати під час руху до полюсів та можуть дати початок мікроядрам. Утворювалися і фрагменти хромосом. Відхилення від нормального поділу може бути через відсутність гомологічних ділянок між хромосомами. Мікроядра спостерігали на різних стадіях першого та другого поділу. На цитологічну стабільність впливає напрямок схрещування – гібриди, в яких материнскою рослиною була інтрогресивна лінія, мають більшу кількість мікроядер у тетрадах, порівняно з реципроками. Хроматин, який відходить від загальної хромосомної маси буде втрачений під час поділу, що спостерігали на стадії тетрад – частина мікроядер відокремлювалася разом з цитоплазмою. Можливо, так відбувається стабілізація гібридного геному.

Вивчення рослинного матеріалу з інтрогресіями проведено через молекулярний аналіз генотипів за консервативними послідовностями, характерними для генів стійкості до патогенів та через аналіз поведінки хромосом у гібридних геномах. Поєднання молекулярного та цитологічного підходів забезпечило вивчення, як соматичної частини рослини через аналіз нуклеотидних послідовностей, так і генеративної (вивчення мейозу). Спостереження кон'югації хромосом у мейозі дозволило прослідкувати поведінку хроматину різного походження, об'єднаного у одному геномі. В подальшому це дозволить поєднати результати, отримані через вивчення

нуклеотидних послідовностей генів стійкості та визначати, чи є вони у складі основних ядер клітин, які проходять поділ, чи елімінуються.

Ключові слова: пшениця м'яка, геном рослин, стабільність геному, дикорослі види, інтрогресія, функціонально-структурні властивості генів, регуляція експресії генів, аналіз послідовностей генів, ПЛР-маркери, борошниста роса, стійкість рослин, патогени, цитологічна стабільність, молекулярно-клітинні механізми, материнські клітини пилку.

ABSTRACT

Plyhun, V. Expressivity of powdery mildew resistance in common wheat lines with introgression. – Qualified research work (manuscript).

Dissertation to obtain the scientific degree of Doctor of Philosophy in the Field of Study 09 "Biology", Programme Subject Area 091 "Biology". – National University of Kyiv-Mohyla Academy, Kyiv, 2025.

The dissertation study describes the manifestation of resistance in hybrid plant material obtained through introgressive hybridization involving genetic material of amphidiploid-derived lines (AABBXX), which have the genomes of diploid wild species (XX) and subgenomes A and B of soft Aurora wheat (AABBDD).

Common wheat introgressive lines derived from amphidiploids Aurotica (AABBTT), Autodes (AABBSS), Aurosis (AABB$S^{sh}S^{sh}$) and Aurolata (AABBUU) were used in the work. The third subgenome of amphidiploids comes from *Amblyopyrum muticum* Boiss. (van Slageren) (*Aegilops mutica* Boiss), *Aegilops speltoides*, *Aegilops sharonensis*, *Aegilops umbellulata*, respectively. Using introgressive lines and a number of common wheat varieties, segregating populations were obtained and assessed for the trait of interest in three generations (F_{1-3}). Contrasting genotypes, which were resistant introgressive lines and susceptible wheat varieties, were crossed. Hybrids were obtained in different directions of crosses - direct (the introgressive line was the mother plant) and reverse (the line was a pollen donor for pollination of the variety). Some hybrids were obtained through pollination of stable F_2 hybrids with a variety that could be different from that with which the

mother plant, F_1 hybrid was obtained. The plant material was assessed in the field and those plants that retain the trait in generations were selected for the study of gene structure. Paternal genotypes and hybrids were assessed for resistance to powdery mildew.

Sequences of six genes of resistance to powdery mildew: *Pm2, Pm3, Pm4b, Pm8*, *Pm21, Pm24, Pm41* were selected among the available in the biological database GenBank. For genes *Pm2*, *Pm3* and *Pm24* several sequences were found. In sequences of all the studied genes differences were identified: insertions/deletions (one-, two-nucleotide), transitions and transversions. Among the coding regions of the studied genes, the LRR coding parts in *Pm3* vary the most. The presence of such variations can affect the amino acid sequences of the proteins. The identified differences between the sequences within each of the genes were statistically unreliable ($p < 0.05$), which was proved through the calculation of the Kolmogorov-Smirnov test (for *Pm24*) and the Tajima nucleotide diversity test (for *Pm2, Pm3*). However, variation in the nucleotide sequences of genes can affect the amino acid sequences of resistance proteins and their functioning. Using the sequences of the listed genes and bioinformatic analysis, 20 pairs of primers to conserved *Pm* sequences were developed, encoding: Rx N-terminal, C2, protein kinase-like, NB-ARC domains, leucine-rich repeats, plant C-terminal phosphoribosyltransferase, serine/threonine kinase interleukin-1 receptor associated kinase (STKc-IRAK).

The presence of genome sequences that can associated with resistance was tracked using regions of resistance genes that were used as markers. Parental genotypes (amphidiploids, lines and varieties) were analyzed in order to search for polymorphisms in sequences of resistance genes. We assume that the source of the desired trait is the sequences of the genome of a diploid species, or these regions could indirectly influence resistance - they could have positive effect on the manifestation of genes that are present in wheat genomes. Therefore, amphidiploids were also studied for the structure of resistance genes to determine which regions they contain and which regions will receive genotypes developed with their participation. Two approaches were used to study the plant material. According to the

first approach, genotypes was analyzed using primers developed to *Pm*. According to the second approach, the method of polymorphism of resistance analogues (RGAP) was used, since it allows to identify regions of genomes inherent to resistance genes. For RGAP, nine primers to sequences of nematode cysts resistance genes in hexaploid wheat (*Cre3* gene), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice (gene *Xa21*), *Pseudomonas syringae* in Arabidopsis (gene *RPS2*) were used. Primers were complementary to regions encoding leucine-rich repeats and kinase domains. These primers were combined in pairs, so that in one pair there could be primers to different coding sites, different resistance genes, simultaneously two right or two left primers.

In the genomes of the studies plants specific regions characteristic to the genes *Pm2, Pm3, Pm4b, Pm8*, *Pm21, Pm41* were identified. No *Pm24* sequence was found. The sequence placed in the was obtained from a Chinese local sample, so the gene may be absent in plants from the European part of the continent, or the sequences to which the primers were developed have undergone changes. Variability across the studied regions was in the presence or absence of a specific site in the genome. The greatest variability was observed with primers to the LRR-coding sequences of the *Pm3*, which is consistent with the literature data and the conducted bioinformatic study of sequences. In this case, the polymorphism was represented by the presence/absence of minor components in the electrophoretic spectrum, which had greater mobility in the electric field compared to the main component. The sequences of these genes were found in both resistant and susceptible genotypes. Using the RGAP technique, multicomponent and polymorphic spectra were obtained. The difference between genotypes was found using primers to sequences encoding leucine repeats, an NB-ARC domain, and domain with protein kinase activity.

Basing on the analysis of contrasting genotypes for the molecular organization of resistance genes, combinations of primers were selected by the representation of target sites, which made it possible to distinguish parental genotypes and further analyse hybrid populations developed with their participation. It was shown that introgressive lines differ in the number of electrophoretic components from Aurotica. Line spectra have more components. This may indicate a different number of T

genome sequences that received lines, or rearrangements of wheat subgenomes that alien chromatin could cause. The differences in the spectra of Aurotica and lines did not affect the resistance to the pathogen.

In order to increase the instrumental base for plant research, primers complementary to *Pm* genes were paired, as it was done using the polymorphism technique of resistance gene analogues. Since differences were found between genotypes with primers complementary to the sites encoding the LRR, nucleotide-binding domain and kinase domains, pairs were made so that at least one of the primers was complementary to these sites. This approach made it possible to identify variability in the regions characteristic to the *Pm2* gene.

Using the combination of techniques for analysing polymorphism of resistance gene analogues and bulked segregant analysis (BSA), segregating populations were studied. Hybrids were grouped based on their common origin - the introgressive line from which hybrids were obtained. Two contrast groups were analyzed. DNA was combined into one group from resistant genotypes (lines, resistant hybrids), into another - from susceptible (varieties, susceptible hybrids). Three generations of hybrids were obtained, some of which lost resistance in generations, so DNA from such plants was not included in the groups. With plant material that could potentially have genetic material from Aurodes, variability was found between contrast groups with primers complementary to the region codding LRR. In the case of Aurosis and Aurotica, polymorphism was observed with NB-ARCs and primers to sites encoding domains with protein kinase activity.

The behaviour of alien chromatin and its effects on the wheat genome was also studied during meiotic division, which determines which chromatin the gametes would receive and would be involved in pollination. The presence of introgressions during the study of cytological preparations of maternal pollen cells was observed as the presence of chromosomal associations other than closed bivalents - univalents, open bivalents and multivalents (trivalents and quadrivents). Common wheat varieties are cytologically stable, that is, 21 closed bivalents are present in the metaphase plate. MMC of Aurora could form 1-2 open bivalents due to the presence

of rye translocation 1BL 1RS in the genome of the variety. MMC of Aurotica had all the mentioned types of chromosomes, but their behaviour in meiosis does not affect the manifestation of the trait at the plant level. The combination of introgressed chromatin and wheat chromatin in one genome can affect conjugation between homologous sites, so that not only alien chromatin will be lost. We observed the formation of chromosomal bridges, micronuclei, which, like chromosomes that are not bivalents, will lag behind when moving to the poles and can give rise to micronuclei. Fragments of chromosomes were also formed. Deviation from normal division may be due to the absence of homologous regions between chromosomes. Micronuclei were observed at different stages of the first and second division. Cytological stability is affected by the direction of crossing - hybrids in which the mother plant was an introgressive line have a greater number of micronuclei in tetrads than reciprocs. Chromatin, which parts from the total chromosomal mass, will be lost during the separation observed at the tetrad stage - part of the micronuclei separated together with the cytoplasm. Perhaps this is how the stabilization of the hybrid genome occurs.

The study of plant material with introgressions was carried out through the molecular analysis of genotypes by conserved sequences characteristic of genes for resistance to pathogens and through the analysis of chromosome behavior in hybrid genomes. The combination of molecular and cytological approaches provided the study of both the somatic part of the plant through the analysis of nucleotide sequences and the generative (study of meiosis). Observation of chromosome conjugation in meiosis allowed us to trace the behavior of chromatin of different origins, combined in one genome. In the future, this will allow combining the results obtained through the study of nucleotide sequences of resistance genes and determine whether they are part of the main nuclei of cells that undergo division or will be eliminated.

Keywords: bread wheat, plant genome, genome stability, wild species, introgression, functional-structural properties of genes, regulation of gene expression,

gene sequence analysis, PCR markers, powdery mildew, plant resistance, pathogens, cytological stability, molecular-cellular mechanisms, pollen mother cells.

Список публікацій здобувача

Публікації, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. **Плигун ВВ**, Єфіменко ТС, Антонюк МЗ, Терновська ТК. Цитологічна стабільність пшеничних амфідиплоїдів і сортів пшениці в мейозі І. Наукові записки НаУКМА. Біологія і екологія. 2020; 3:3-13. DOI: 10.18523/2617-4529.2020.3.3-13 (Особистий внесок здобувача – опрацювання літератури, отримання експериментальних даних, написанння тексту та обговорення зі співавторами).

2. **Плигун ВВ**, Антонюк МЗ, Єфіменко ТС, Терновська ТК. Спорогенез у гібридів першого покоління від схрещування пшениці м'якої і ліній з інтрогресіями від *Amblyopyrum muticum*. Наукові записки НаУКМА. Біологія і екологія. 2021; 4:13-20. DOI: 10.18523/2617-4529.2021.4.13-20 (Особистий внесок здобувача – опрацювання літератури, отримання експериментальних даних, написанння тексту та обговорення зі співавторами).

3. **Плигун ВВ**, Антонюк МЗ, Єфіменко ТС, Терновська ТК. Гени стійкості до *Blumeria graminis* та їхні продукти у злаків. Наукові записки НаУКМА. Біологія і екологія. 2022; 5:14-2. DOI: 10.18523/2617-4529.2022.5.14-24 (Особистий внесок здобувача – опрацювання літератури, отримання експериментальних даних, написанння тексту та обговорення зі співавторами).

4. **Плигун ВВ**, Антонюк МЗ. Формування стійкості до патогенів у рослин за участі епігенетичних чинників і фітогормонів. Наукові записки НаУКМА. Біологія і екологія. 2023; 6:3-16. DOI: 10.18523/2617-4529.2023.6.3-16 (Особистий внесок здобувача – опрацювання літератури, отримання експериментальних даних, написанння тексту та обговорення зі співавторами).

5. **Плигун ВВ**, Антонюк МЗ. Мінливість послідовностей низки генів *Pm* у представників Triticeae. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2024; 34.1624:102-108. DOI: 10.7124/FEEO.v34.1624 (Особистий внесок здобувача –

опрацювання літератури, отримання експериментальних даних, написанння тексту та обговорення зі співавторами).

6. **Плигун ВВ**, Антонюк МЗ, Терновська ТК. Консервативні ділянки генів стійкості як джерело нуклеотидних поліморфізмів у дослідженні гексаплоїдів пшениці. Цитологія і генетика. 2025; 59(4):3-14. ISSN 0564–3783 (Особистий внесок здобувача – опрацювання літератури, отримання експериментальних даних, написанння тексту та обговорення зі співавторами).

Публікації, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Плигун ВВ**. Особливості проходження мейозу у амфідиплоїдів пшениці. Збірник тез доповідей XVI Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології»; м. Львів, Україна, 27-29 квітня 2020; с. 80-81.

2. **Плигун ВВ**. Аналіз мікро- та макроспорогенезу у гібридів між лініями пшениці м'якої з інтрогресіями від *Ambliopyrum muticum* та сортами пшениці м'якої. Збірник тез доповідей XVII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології»; м. Львів, 19-21 квітня 2021; с. 109-110.

3. **Плигун ВВ**, Антонюк МЗ, Єфіменко ТС, Терновська ТК. Вивчення структури генів стійкості до борошнистої роси у ліній пшениці м`якої з інтрогресіями від *Amblyopyrum muticum*. Матеріали конференції XVIII Міжнародної наукової конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» у 33 томі збірника наукових праць «Фактори експериментальної еволюції організмів», м. Київ, Україна, 26–29 вересня 2023; с. 203 (Особистий внесок здобувача – опрацювання літератури, отримання експериментальних даних, написанння тексту та обговорення зі співавторами).

4. **Плигун ВВ**, Антонюк МЗ. Мінливість послідовностей низки генів *Pm* у представників Triticeae. XIX Міжнародна наукова конференція «Фактори експериментальної еволюції організмів», м. Тернопіль, Україна, 23–26 вересня 2024; 34.1624:102-108 (Особистий внесок здобувача – опрацювання літератури,

отримання експериментальних даних, написанння тексту та обговорення зі співавторами).

5. **Плигун ВВ**, Антонюк МЗ, Єфіменко ТС, Терновська ТК. Створення та апробація праймерів до консервативних ділянок генів стійкості до борошнистої роси з залученням інтрогресій від дикорослих видів Triticinae (Development and evaluation of primers to conserved regions of *Pm* with the involvement of introgressions from wild species Triticinae). Збірник матеріалів Національної конференції з міжнародною участю «Природничі науки в діалозі поколінь», м. Кишинів, Республіка Молдова, 12-13 вересня 2024; видання 7, с. 224. ISBN 978-9975-62-756-6 (Особистий внесок здобувача – опрацювання літератури, отримання експериментальних даних, написанння тексту та обговорення зі співавторами).

6. **Плигун ВВ**, Антонюк МЗ, Єфіменко ТС, Терновська ТК. Аналіз мейозу у гібридів пшениці м'якої з інтрогресіями від *Amblyopirum muticum*. Збірник тез доповідей XXI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ в біології», м. Львів, Україна, 28 квітня–01 травня 2025; с. 152-154 (Особистий внесок здобувача – опрацювання літератури, отримання експериментальних даних, написанння тексту та обговорення зі співавторами).

7. **Плигун ВВ**, Антонюк МЗ, Єфіменко ТС, Терновська ТК. Мінливість консервативних районів генів стійкості до патогенів у представників Triticeae. Збірник матеріалів V Конференції молодих учених «Біологія рослин і біотехнологія», м. Київ, Україна, 15-16 травня 2025; с. 18 (Особистий внесок здобувача – опрацювання літератури, отримання експериментальних даних, написанння тексту та обговорення зі співавторами).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

Mla	- *Mildew locus a*
R	- білок стійкості
NLR	- білки з нуклеотидозв'язувальними домени та повтори, багатими на лейцин (Nuceleotide-binding domain (NBD), leucine rich repeat (LRR))
R	- ген стійкості
PRR	- рецепторів розпізнавання структур (**P**attern **R**ecognition **R**eceptors, PRRs)
NB	- нуклеотидозв'язувальний домен (**N**ucleotide **b**inding, NB)
LRR	- повтори, багаті на лейцин (**L**eucine **r**ich **r**epeat, LRR)
PAMP	- патоген-асоційовані молекулярні шаблони (**P**athogen-**a**ssociated **m**olecular **p**attern, PAMP)
PTI	- запущена патоген-асоційованими молекулярними структурами (PAMP) імунна відповідь (PAMP-**t**riggered **i**mmunity, PTI)
ETI	- спричинена ефектором імунна відповідь (**E**ffector-**t**riggered **i**mmunity, ETI)
CC	- домен спіраль-змійовик (**C**oiled-**c**oil, CC)
RGAP	- поліморфізм аналогів генів стійкості (**R**esistance **G**ene-**A**nalog **P**olymorphism, RGAP)
BSA	- груповий аналіз популяцій, які розщеплюються (**B**ulked **s**egregant **a**nalysis, BSA)
МКП	- материнські клітини пилку

ВСТУП

Обгрунтування вибору теми дослідження. Стійкість рослин до патогенів може забезпечуватися різними чинниками, одним з них є гени вертикальної стійкості *R*. Вираз ознаки стійкість на рівні організму може варіювати [1,2]. Борошниста роса є грибним захворюванням пшениці, поширеним у зонах з помірним кліматом, де розташована і Україна, збудник – *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. Гени *R*, що забезпечують стійкість пшениці до борошнистої роси, називаються *Pm*. Гени стійкості *R* до різних патогенів мають консервативні ділянки, які кодують повтори багаті на лейцин, нуклеотидозв'язувальні домени, домени з кіназною активністю [3]. Перераховані білкові структури є найбільш поширеними, хоча і не є облігатними для всіх генів *R* [4,5]. За характерною будовою генів можна знаходити аналоги генів стійкості, для яких ще немає підтвердженого зв'язку з проявом ознаки на рівні фенотипу [6]. Послідовності генів *Pm* завжди є у складі геномів пшениці, але вони можуть бути неефективними, і тоді пшениця вражається борошнистою росою [3,7]. Вважається, що найбільш ефективним способом надання пшениці м'якій, що культивується, стійкості до борошнистої роси є перенесення до її геному генів *Pm* від дикорослих родичів пшениці. Серед ефективних на сьогодні щодо захисту пшениці від збудника борошнистої роси генів, більшість з *Pm*-генів має інтрогресивне походження від різних родів Triticinae. Перенесення генів відбувається або через пряму гібридизацію, що супроводжується створенням стерильних гібридів і через це значно ускладнює подальшу роботу з ними. Або першим етапом перенесення стає створення амфідиплоїдів, які мають диплоїдні набори хромосом для всіх представлених в них субгеномів пшениці та споріднених видів і тому характеризуються певним рівнем фертильності. З використанням амфідиплоїдів створюють інтрогресивні лінії, які разом з геномом пшениці містять деяку частину генетичного матеріалу з геному спорідненого виду. Такі лінії мають більш регулярний мейоз у порівнянні з гібридами і тому є більш перспективним матеріалом для подальшого

схрещування з пшеницею м’якою з метою передачі до геному сучасних комерційних сортів гени, що контролюють бажану ознаку, зокрема, стійкість до борошнистої роси [8-10]. Відомо, що наявність чужинних послідовностей в геномі може негативно впливати на кон’югацію між гомологічними хромосомами, що, в свою чергу, може спричиняти втрату цільової ознаки на рівні фенотипу у нащадків гібридів між інтрогресивною лінією і пшеницею [11,12]. Однак фенотипна втрата цільової ознаки (стійкість до борошнистої роси) може спричинятися не лише втратою чужинного генетичного матеріалу внаслідок нерегулярного мейозу, а і через прямі перебудови в нуклеотидних послідовностях гена стійкості під час його перебування у гібридному геномі. Наявність таких перебудов в гібридних геномах може бути відстежена через скринування генотипів через отримання спектрів ампліконів, отриманих з застосуванням підібраних праймерів, в тому числі з використанням методу RGAP (Resistance Gene-Analog Polymorphism).

Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконувалася в межах наукових тем: «Розширення генетичного пулу м’якої пшениці за рахунок генофондів дикорослих рослин» (номер держреєстрації в УКРІНТЕІ: 0116U006010, 2020-2022рр.) та «Генетична природа динамічності геномів інтрогресивних ліній м’якої пшениці» (номер держреєстрації в УКРІНТЕІ: 0116U004705, 2020-2023рр.).

Предмет дослідження – механізми втрати експресивності цільової ознаки у поколіннях.

Об’єкт дослідження – зміна прояву ознаки «стійкість до борошнистої роси» у генотипів пшениці, отриманих через інтрогресивну гібридизацію.

Мета дослідження – з’ясувати, що саме є чинником втрати інтрогресивними рослинами пшениці стійкості до борошнистої роси: елімінація чужинного генетичного матеріалу в гібридних поколіннях чи втрата ефективності гена *Pm* у нерезидентному для нього геномі.

Завдання дослідження:

1. Оцінити наявні інтрогресивні лінії *Triticum aestivum/Amblyopyrum muticum*, стійкі до борошнистої роси, на стабільність ознаки в поколіннях ліній.

2. Отримати F_1 від схрещування стійких ліній з сортами пшениці м'якої та оцінити їх на однорідність щодо ознаки інтересу.

3. Вивчити мейоз у материнських клітинах пилку (МКП) у вихідних компонентах схрещування (геномно-заміщений амфідиплоїд Авротіка та сорти пшениця м'якої) та гібридах F_1 на стадії метафази I для встановлення хромосомних конфігурацій, потенційно здатних бути чинником порушення еуплоїдної природи продуктів мейозу.

4. Вивчити мейоз у материнських клітинах пилку (МКП) у вихідних компонентах схрещування (геномно-заміщений амфідиплоїд Авротіка та сорти пшениця м'якої) та гібридах F_1 на стадії анафази II та телофази II для кількісної оцінки потенціалу втрати генетичного матеріалу через нерегулярність поведінки хромосом у мейозі гібридних рослин.

5. Виконати біоінформатичний пошук в відповідних базах даних стосовно структури генів *Pm* і розробити праймери, придатні для скринування дослідних генотипів щодо стану консервативних ділянок цих генів у Авротіки, сортів пшениці м'якої та гібридних популяціях пшениці.

6. Виявити ефективні праймери до консервативних ділянок різних генів стійкості для довільного комбінування їх в пари за методикою RGAP.

7. Виконати порівняльне скринування стійких інтрогресивних ліній та компонентів вихідних схрещувань за допомогою придатних молекулярно-генетичних маркерних систем на основі ПЛР для виявлення компонентів спектрів ампліфікації, специфічних для стійких рослин.

8. Встановити генетичну структуру двох умовних популяцій, що включають стійкі та нестійкі фенотипи вихідних та гібридних генотипів, щодо поліморфізму за ампліконами, отриманими з специфічними праймерами до консервативних ділянок генів стійкості.

Методи дослідження. Використано метод штучної гібридизації рослин для створення популяцій, які розщеплюються за дослідною ознакою, між сортами пшениці м'якої та інтрогресивними лініями-похідними. Виконано оцінювання рослинного матеріалу за 9-бальною шкалою за стійкістю до борошнистої роси у польових умовах. Пошук послідовностей генів здійснено у біологічній базі даних GenBank. Порівнювання відібраних сиквенсів здійснено у програмному забезпеченні GeneDoc та DnaSP6, попереднє вирівнювання – у інтернет-ресурсі CLUSTALW. ДНК з рослин виділено за допомогою ЦТАБ-методу. Вивчення структури генів стійкості проведено за допомогою ПЛР з праймерами до консервативних ділянок. Продукти ампліфікації розділяли у агарозному гелі. Перераховані методи є універсальними для вивчення генетики стійкості рослин. Мейоз у МКП аналізували методом чавлених препаратів з контрастуванням ацетокарміном.

Наукова новизна отриманих результатів:

1. Передача ознаки інтересу від організму-донора до організму-реципієнту не обов'язково пов'язана з передачею від першого до другого тих нуклеотидних послідовностей, які забезпечували в геномі донора бажаний фенотип.

2. Певний рівень мейотичної нестабільності, який супроводжує процес гібридизації між донором і реципієнтом, починаючи з утворення F_1 і подальшим отриманням популяцій, що розщеплюються, не призводить до спрямованої втрати ознаки інтересу.

3. Процес передачі ознаки інтересу від організму-донора до організму-реципієнту безперечно має відстежуватися на молекулярному рівні з використанням тих молекулярних маркерів стійкості, ідентифікація яких має передувати процесу передачі за результатами вивчення взаємодії конкретних геномів у межах гібридних геномів F_1 та F_2.

Практична значущість:

1. Всі пункти новизни мають практичну значущість, тому що окреслюють напрям і послідовність дій, які мають бути реалізовані в спробах передати

фенотип стійкість до борошнистої роси від донора з бажаною ознакою до комерційного сорту пшениці м'якої.

2. Інтрогресивні лінії *Triticum aestivum / Amblyopyrum muticum*, відібрані за ознакою стійкість до борошнистої роси, можуть бути застосовані у якості джерела фенотипу стійкість до борошнистої роси за умов відстеження процесу передачі ознаки на молекулярному рівні з застосуванням розроблених нами підходів до контролю геномів гібридів на рівні поліморфізму *Pm*-генів у їхніх консервативних ділянках та в інших ділянок геному, ідентифікованих завдяки методу RGAP.

3. Найбільш ефективними для виявлення поліморфізмів за консервативними ділянками генів стійкості виявились праймери до LRR-послідовностей генів *Pm*. Їх доцільно використовувати в комбінаціях з праймерами до інших генів *R* за методом RGAP для збільшення кількості ефективних ПЛР-маркерів генів стійкості.

4. За результатами біоінформатичного дослідження з послідовностями генів стійкості створено 20 комбінацій праймерів до різних кодувальних частин генів *Pm,* придатних для вивчення різноманітності генів стійкості.

Особистий внесок здобувача. Автором дисертаційного дослідження було самостійно опрацьовану наукову літературу, на основі якої спільно з науковим керівником сформульовано мету та завдання дослідження. Самостійно отримано експериментальні дані. Разом з науковим керівником та співавторами статей обговорювали структуру експериментів, проведення дослідження та отримані результати.

Апробація матеріалів дисертації. Результати дисертаційного дослідження представлені на: XVI Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (м. Львів, Україна, 27-29 квітня 2020), XVII Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (м. Львів, Україна, 19-21 квітня 2021), XVIII Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (м.Київ, Україна, 26–29 вересня 2023), XIX Міжнародній науковій

конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (м. Тернопіль, Україна, 23–26 вересня 2024), Національній конференції з міжнародною участю «Природничі науки в діалозі поколінь» (м. Кишинів, Республіка Молдова, 12-13 вересня 2024), XXI Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ в біології» (м. Львів, Україна, 28 квітня–01 травня 2025), V Конференції молодих учених «Біологія рослин і біотехнологія» (м. Київ, Україна, 15-16 травня 2025).

Структура та обсяг дисертації. Робота загальним обсягом 325 сторінок, складається зі вступу, 4 розділів («Огляд літератури», «Матеріали та методи», «Результати дослідження та їхнє обговорення», «Узагальнення результатів дослідження»), висновків, списку використаних джерел та 9 додатків; містить 54 рисунки, 48 таблиць. Використано 198 джерел, які розміщені на 22 сторінках.

РОЗДІЛ 1
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Характеристика стійкості рослин до патогенів та шляхи її забезпечення. Моделі захисту від патогенів

Стійкість до патогенів визначається генетичним статусом як рослини-господаря, так і патогену [2]. Щоб описати ці процеси висували різні гіпотези, відповідно до знань наявних на певний період часу. У 1905 році Р. Біффен (R. Biffen) зазначив, що у пшениці існують генетичні елементи, які потрібні для стійкості до патогенів. За допомогою генетичного аналізу було показано, що бути сприйнятливим – це рецесивна ознака [13]. Перед описаною Флором (Flor) у 1971 році [14] моделі ген-на-ген, існували гіпотези загального антигену та індукційна гіпотеза. Перша припускала, що під час зараження має бути взаємодія між білками господаря та патогену. За другої – взаємодія забезпечена продуктами домінантних генів з обох боків. В обох випадках задіяні білки. Флор [14] зазначав, що взаємодія між організмами обумовлена генотипами обох організмів – продукт гена стійкості взаємодіє з відповідним продуктом гена авірулентності [13]. Проте взаємодія між патогеном та хазяїном не завжди відповідає канонічному ген-на-ген. Для низки генів описані алельні ряди, наприклад для гена *Pm3* пшениці м'якої, локусу *Mla* ячменю, обидва забезпечують стійкість до борошнистої роси у згаданих видів. Продукти алелів *Pm3a* та *Pm3f* мають різну здатність розпізнавати продукти генів авірулентності, хоча нуклеотидні послідовності цих алелів є найбільш схожими, порівняно з іншими [15]. Обидва алелі сприяють розвитку стійкості, але різною мірою [16]. Алель *Pm3a* забезпечує розпізнавання всіх ізолятів, які використовували під час дослідження, як і *Pm3f*, а також деякі додаткові. Для згаданих алелів існує і специфічність розпізнавання конкретних продуктів алелів *Avr*, наприклад *AvrPm3a2/f2* не розпізнається жодним іншим алелем *Pm3* [15]. Така характеристика обумовлена мотивом LxxLxLxx у С-кінцевих LRR, що було доведено через конструювання химерних білків, які

мали замінені амінокислоти. Функціональність PM3B, PM3C та PM3D залежить від амінокислотного складу N-кінцевих LRR, які взаємодіють з білком авірулентності. LRR працюють як сенсори для сприйняття змін у клітині під час проникнення патогену. Як N-, так і C-кінцеві LRR сприяють молекулярним взаємодіям, що забезпечують розпізнавання і розвиток певного типу резистентності. Комбінування функціональних LRR та відповідного домену ARC2, який передаватиме сигнал від LRR та забезпечуватиме активацію білку стійкості [16]. На специфічність взаємодії молекул патогену та хазяїна також впливають і супресори резистентності. У випадку *Pm3* таким супресором є *SvrPm3a1/f1*. У випадку таких взаємодій потрібно враховувати яким саме чином розвивається стійкість:

- через розпізнавання білка авірулентності відповідним білком стійкості;
- нездатність супресора інгібувати розпізнавання ефектора та подальшу передачу сигналу;
- потрібно враховувати, чи існують відмінності у експресії *AVR* та *R* [15].

З відкриттям генів резистентності та авірулентності почали формулювати інші моделі для пояснення стійкості / чутливості: модель охоронця (guard model), приманки (decoy model) [17] та її варіант модель інтегрованої приманки (Integrated-decoy model) [18], айсберга [19]. Відповідно до першої моделі, відбувається постійний моніторинг мішені ефекторів, у випадку модифікації мішені активуються R-білки та процеси для розвитку стійкості. R-білки, ніби охороняють мішені ефекторів. Приманкою називають білок хазяїна, який сам по собі функції для блокування розвитку захворювання та стійкості не виконує, але здатний імітувати мішень для ефектора. Тобто відбувається мімікрія білка-мішені хазяїна, функціональність якої контролюється білком стійкості R [17]. Модифікацією попередньої є модель інтегрованої приманки за якої пари R-білків здатні розпізнавати різні ефектори патогенів тільки парно. Білки транскрибуються з тісно зчеплених генів [18]. Мішенями для ефекторів у рослини можуть бути і компоненти чутливості, які в активному стані сприятимуть розвитку та поширенню патогену, вони є негативними

регуляторами імунітету. NLR контролюють мішені ефекторів та функціонують у одиницях взаємодії, до їхнього складу, крім мішені ефектора та NLR, входять перший та другий ефектори. Обидва ефекти викликають ефектор-спричинену чутливість (**E**ffector-**T**riggered **S**usceptibility, ETS). Такі одиниці знаходяться внизу "айсберга". Другий ефектор забезпечує мовчання одиниць і їх не можна виявити генетично, коли він є. Тому проводять таку аналогію з айсбергом, коли більша частина льодяної брили занурена під воду. Такі одиниці є, їхня кількість може бути значною, але їх не можна виявити та, відповідно, охарактеризувати. Проте за його відсутності можна ідентифікувати одиницю взаємодії «ефектор 1 – NLR». NLR є продуктом генів *R*. Така одиниця взаємодії є верхом айсберга. І якщо є відповідь рослини на молекули патогену, то результат такої взаємодії можна спостерігати та знайти її першопричину, гени, які за неї відповідають. Набір генів, для яких відомі також алелі, можуть кодувати ефектори та NLR, що сприяє різноманіттю обох та різному рівню вірулентності патогену. Частина з них може бути неефективною [17,19].

Модель айсберга спирається на модель зиг-загу, яка ґрунтується на коеволюції рослини та збудника, запропонована Джонсом та Данґлом [20]. Взаємодія хазяїна та патогену обумовлена двома шляхами. Першим шляхом є імунна відповідь, запущена патоген-асоційованими молекулярними структурами (профілями) (**P**athogen-**a**ssociated **m**olecular **p**attern, PAMP) імунна відповідь (PAMP-**t**riggered **i**mmunity, PTI). Другий – запущена ефектором імунна відповідь (**E**ffector-**t**riggered **i**mmunity, ETI), заснована на взаємодії ген-на-ген [2,20]. У рослин існують дві гілки імунної відповіді – позаклітинна та внутрішньоклітинна. У першому випадку відбувається трансмембранне взаємодія за допомогою рецепторів розпізнавання структур (**P**attern **R**ecognition **R**eceptors, PRRs) патоген- або мікроб-асоційованих молекулярних структур (**M**icrobial- or **p**athogen-**a**ssociated **m**olecular **p**atterns, MAMPS or PAMPs), прикладом яких є флагелін. Внутрішньоклітинний – передбачає участь білкових продуктів, котрі кодують гени резистентності *R*. До таких білків

належать білки з нуклеотидозв'язувальними доменами (**N**ucleotide **b**inding, NB) та доменами з повторами, багатими на лейцин (**L**eucine **r**ich **r**epeat, LRR) [20].

Зигзагоподібна модель має з 4 етапи (рис.1.1). На першому етапі MAMP / PAMP рослина сприймає за допомогою PRR, що призводить до імунної відповіді запущеної PAMP, тобто PTI. В подальшому патогени, які здатні долати PTI, транспортують ефектори, котрі блокують імунну відповідь, та сприяють розвитку, поширенню патогену, таким чином виникає ефектор-спричинена чутливість (ETS). На третьому етапі молекулу-ефектор здатні розпізнавати білки з NB-LRR (ще одне позначення – NLR) доменами, так розвивається імунна відповідь, викликана ефектором (**E**ffector-**t**riggered **i**mmunity, ETI). Патогени, які втратили ефектор, за допомогою якого взаємодіяли з рослинним організмом на попередніх етапах, але, можливо, набули нових ефекторів через горизонтальний потік генів, все ще здатні долати імунну відповідь. На останньому етапі такі ефектори забезпечують пригнічення ETI. Рослини у відповідь можуть набувати нові алелі генів *NLR*, тоді рослина може відповідати на проникнення патогену через активацію ETI [20,21]. ETI може закінчуватися запрограмованою клітинною смертю (**P**rogrammed **c**ell **d**eath, PCD), яка є реакцією гіперчутливості (**H**ypersensitive **r**esponse, HR), таким чином уражені клітини піддаються PCD та поширення збудника обмежується. Крім того можливий розвиток системної набутої резистентності (**S**ystemic **a**cquired **r**esistance, SAR) за якої відбувається накопичення фітогормону саліцилової кислоти [22]. Крім SA, спостерігають накопичення жасмонової кислоти (**J**asmonic **a**cid, JA) та етилену, який задіяний у сигнальних каскадах під час біотичного стресу [23]. SAR є проявом широкого спектру стійкості до патогенів, під час якого активується експресія гена *NPR1* (**N**onexpressor of **P**athogenesis-**R**elated genes 1, NPR1) та експресія кількох генів, які пов'язані з патогенезом (**P**athogenesis-**r**elated, PR), котрі кодують білки захисту від патогену [22].

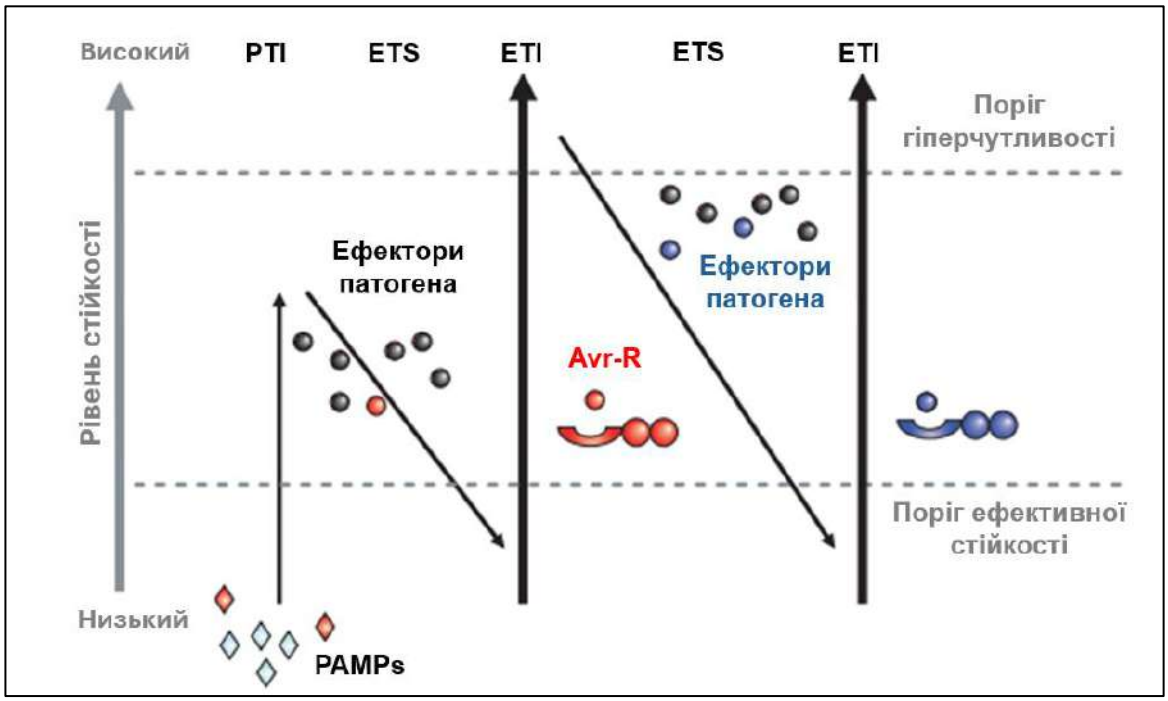


Рис. 1.1. Зигзагоподібна модель імунної відповіді у рослин [перекладено з 20].

Отже, рослина здатна взаємодіяти з патогеном на внутрішньоклітинному та позаклітинному рівнях. Успіх проникнення патогену залежить від розвитку більш вірулентних рас за відсутності алелів, продукти яких забезпечували б імунну відповідь у рослини-господаря.

1.1.1. Класифікація резистентності до борошнистої роси. Стійкість до грибних патогенів у злаків поділяють на 2 типи:

1) якісну стійкість, яку забезпечують расоспецифічні гени;

2) кількісну – декілька генів з адитивних ефектом, які об'єднані у локусах кількісних ознак (**Q**uantitative **t**rait **l**oci, QTL) [24].

Якісна стійкість характеризується або наявністю хвороби, або її відсутністю. У нащадків від таких рослин може спостерігатися бімодальний розподіл ознаки. На противагу якісній, рослини з кількісним виразом стійкості мають ознаки хвороби, збудник менше поширюється, тобто спостерігається неповний прояв резистентності. Нащадки від таких рослин мають безперервний розподіл фенотипів з різними ступенями ураження, який є результатом сегрегації алелів [25].

За іншою класифікацією, залежно від стадії онтогенетичного розвитку, виділяють стійкість паростків (seedling resistance) та дорослих рослин (adult resistance). Крім того, можна ще класифікувати на дві категорії: резистентність широкого спектру (**B**road-**s**pectrum **r**esistance, BSR) та расоспецифічну, які мають відмінні риси. Серед грибів описані різні раси, які можуть атакувати різні сорти пшениці з контрастним впливом на рослини [26]. За даними Ning and Wang, більш бажаною для покращення пшениці за ознакою стійкості є BSR, однак, більшість ідентифікованих на сьогодні генів стійкості забезпечують расоспецифічну резистентність. Такі гени є ефективними проти певного патогену, але в польових умовах рослини можуть уражатися грибом через наявність мутацій у популяції патогену, котрі долають гени *R*. Альтернативною, але водночас трудомісткою, є стратегія отримання генотипів одночано з декількома генами [27]. У випадку рису, маніпулювання експресією декількох генів, які забезпечують захист або задіяні у захисних сигнальних каскадах, вдалим є лише для декількох. Наприклад, у рису ген *Broad-spectrum resistance Kitaake-1* (*Bsr-k1*) є негативним регулятором BSR, алель *bsr-k1* надає неспецифічну BSR до *Magnaporthe oryzae* та *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* (*Xoo*). У мутантних рослин рису *bsr-k1* експресія гена *Bsr-k1* є конститутивною, а не індукується інокуляцією грибом *Magnaporthe oryzae*, який викликає пірикуляріоз (rise blast disease). Фенотип стійкості у мутанта *bsr-k1* є результатом мутації, яка призводить до передчасної термінації білка BSRK1, який містить тетратрикопептидний повтор (**T**etratrico**p**eptide **r**epeat, TPR) [26,27]. В ділянці 50 kb ідентифікована однонуклеотидна заміна гуаніну на аденін у положенні 2447 (G2447A), яка розташована на 3′-сайті сплайсингу інтрона 8 гена *Os10g0548200*. Секвенування мРНК показало, що у *bsr-k1* утворюється варіант транскрипту зі вставкою 71 bp, отриманого з інтрона 8, що викликає передчасну термінацію транскрипції (рис. 1.2) [28].

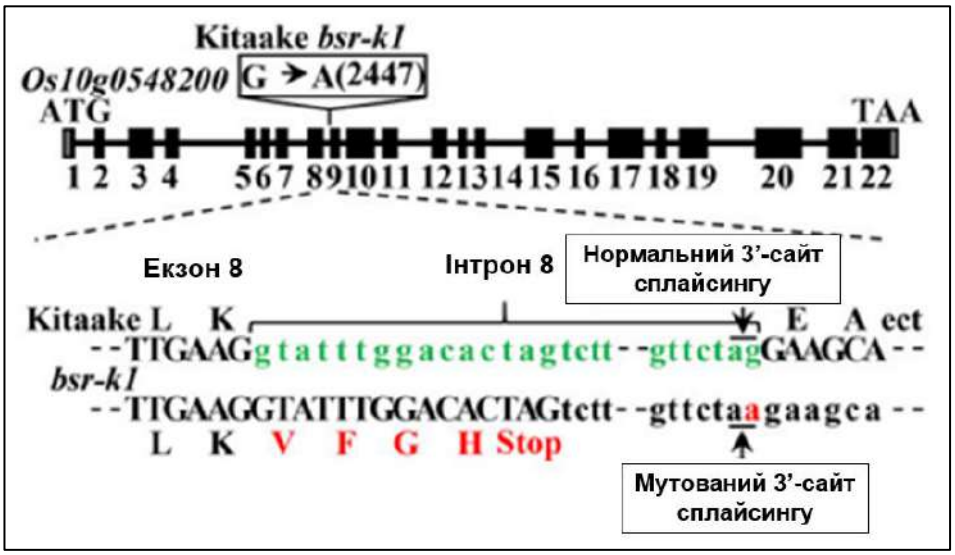


Рис. 1.2. Структура гена *Bsr-k1* та мутантного *bsr-k* [28].

BSR-K1 локалізується в цитоплазмі. Білки з TPR задіяні у метаболізмі мРНК. BSR-K1 зв'язується з мРНК фенілаланін аміак-ліази (**P**henylalanine **a**mmonia-**l**yase, PAL), що сприяє зміні їхнього положення (promotes their turnover) [28]. Фенілаланін аміак-ліаза видаляє аміак з фенілаланіну з утворенням *trans*-коричної кислоти, яка є попередником у біосинтезі лігнінів, флавоноїдів, кумаринів [29]. Мутантний білок bsr-k1 не здатний взаємодіяти з мРНК OsPAL, в результаті чого підвищується стійкість до *M. oryzae* через збільшення біосинтезу лігніну. Відповідно, нативний білок BSR-K1 є негативним регулятором BSR у рису. Крім того, мутантний алель *bsr-k1* не порушує агрономічно важливі характеристики, такі як масу тисячі зерен, довжину та ширину зерна, довжину волоті, кількості зерен з волоті, врожайність зерна на рослину [27,28].

Стійкість до борошнистої роси класифікують на кількісну та якісну (за виразом ознаки), широкого спектру та расоспецифічну (за генами стійкості), стійкість паростків та дорослих рослин (за стадіями онтогенетичного розвитку рослини).

1.1.2. Характеристика генів, які забезпечують стійкість до борошнистої роси. Ідентифіковано понад 80 генів у 54 локусах [30,31], за даними Dong et al. кількість генів / алелів дорівнює 89 [32], за інформацією

2024 року [33] ідентифіковано більше, ніж 140 генів / алелів *Pm* у 64 алелів у пшениці м’якої та споріднених видів. Гени, які ідентифіковані раніше у часі, більш детально охарактеризовані – їх походження, продукти генів, фізичне розташування на хромосомах (табл. 1.1) [34].

Таблиця 1.1 [34]

Гени стійкості до борошнистої роси та їхня характеристика

Ген стійкості	Локалізація у геномі пшениці	Продукти генів	Посилання
Широка специфічність (мультирезистентність)			
Pm2	5DS	рецептори типу NLRs	[35-37]
Pm12	6BS	відсутні відомості про продукт гена	[38-40]
Pm16	транслокація 6BS-6SS.6SL		[36,41]
Pm21	транслокація (6VS·6AL)	серинтреонінпротеїнкіназа Stpk-V	[42-44]
Pm24	1DS	білок тандемної кінази TKP з передбачуваним кіназо-псевдокіназним доменом, – WTK3	[41,45]
Pm38	7D	АТФ-зв’язувальний касетний транспортер або транспортер гексози	[41,46]
Pm39	1B	передбачуваний транспортер ABC	[47]
Pm40	7BS	відсутні відомості про продукт гена	[38,42,46]
Pm42	2BS		[48]
Pm46	5D	АТФ-зв’язувальний касетний транспортер або транспортер гексози	[41,46,47]
Pm63	довге плече 2B	відсутні відомості про продукт гена	[49]
Pm65	термінальний регіон 2AL		[50]
Pm66	$4S^{l}S.4BL$		[26,39]

Продовження табл.1.1

Расоспецифічна стійкість			
Pm3	коротке плече хромосоми 1A	білки з доменами coiled-coil (CC), сайтами зв'язування нуклеотидів ARC1 та ARC2 (NB-ARC), LRR.	[51,52]
Pm4a	2AL	передбачуваний химерний білок серин-треонін кіназою та кількома C2-доменами, трансмембранними ділянками	[38,53]
Pm4b	2AL	передбачуваний химерний білок	[38,53]
Pm5	7BL	рецептори типу NLRs	[35,54]
Pm8	транслокація 1BL.1RS	білки з доменами coiled-coil (CC), сайтами зв'язування нуклеотидів ARC1 та ARC2 (NB-ARC), LRR	[51]
Стійкість на різних стадіях онтогенетичного розвитку			
*Pm41**	3BL	білок з доменами CC-NBS-LRR (CNL)	[39,55]
*Pm61***	4AL	відсутні відомості про продукт гена	[56]
*Pm62****	2BS.2VL#5		[57]
*Pm67****	1DS.1VL#5		[57]
Відомості про тип стійкості (специфічності) відсутні			
Pm1	7AL канадського сорту пшениці Axminster	рецептори типу NLRs	[38]
Pm6	2BL.2GL	білки з сигальними пептидами, декількома LRRs, трансмембранним доменом, Ser/Thr кіназним доменом	[58,59]
Pm9	7AL	відсутні відомості про продукт гена	[60]
Pm10	1D		[46]
Pm11	6B		[46]
Pm13	3B.3D		[38]

Продовження табл.1.1

Pm14	6B	відсутні відомості про продукт гена	[46]
Pm15	7D		[46]
Pm19	7D		[46]
Pm20	6AL·6RS		[38,61]
Pm25	1A		[38,46]
Pm26	2B		[46]
Pm27	6B		[46]]
Pm28	1B		[46]
Pm29	7DL		[46,62]
Pm30	5BS		[63]
Pm32	1B		[46]
Pm33	2B		[46]
Pm34	5D		[46]
Pm35	5D		[46]
Pm36	5B		[46]
Pm37	7A		[46]
Pm43	2DL		[42,64]
Pm44	3A		[46]
Pm45	6D		[46]
Pm47	7BS		[46]
Pm49	2BS		[46]
Pm50	2A		[46]
Pm51	2BL		[46]
Pm52	2BL		[46]
Pm53	5B		[39,46,65]
Pm54	6BL		[66]
Pm55	5A		[42]
Pm57	2B		[32,67]
Pm60	7A	білки з доменами NBS та LRR	[39]
Pm64	2BL4	відсутні відомості про продукт гена	[68]

Примітка. Гени забезпечують стійкість: на всіх стадіях онтогенезу рослини (*), на стадії паростків (**), у дорослих рослин (***).

Дикорослі родичі пшениці м'якої є джерелом генів стійкості до *Bgt*. Близько половини генів привнесена до генетичного пулу пшениці м'якої від близькоспоріднених видів:

- *Aegilops* sp.: *Pm2* [36,37,69], *Pm12* [32,38,40], *Pm13* [38], *Pm19*, *Pm29*, *Pm32*, *Pm34*, *Pm35* [46], *Pm53* [39], *Pm57* [32], *Pm66* [39];
- жита посівного (*Secale cereale L.,* $2n = 2x = 14$, RR): *Pm7* [38], *Pm8* [Severine Hurni, 2014], *Pm20* [38];
- *Triticum* sp. – *Pm3* [51], *Pm4a*, *Pm4b* [38], *Pm6* [58], *Pm9* [60], *Pm10* [46], *Pm16* [41], *Pm25* [38], *Pm26*, *Pm27* [46], *Pm30* [63], *Pm33*, *Pm36*, *Pm37* [46], *Pm41* [39], *Pm42* [48], *Pm49*, *Pm50* [46], *Pm60* [39];
- *Dasypyrum villosum* (L.) P. Candargy (*Haynaldia villosa* Schur) ($2n = 2x = 14$, VV) – *Pm1* [38], *Pm21*, *Pm55* [42], *Pm62*, *Pm67* [57];
– *Thinopyrum intermedium – Pm40* [38], *Pm43* [42], *Pm51* [46].

Гени розсіяні по хромосомах пшениці м'якої нерівномірно, найбільша кількість на 2-й хромосомі геному В, при цьому відсутня приналежність генів переважно до одного з джерел їхнього походження [38,39,4246,48,51,58,60]. Деякі з генів були подолані патогеном та є неефективними, деякі через зчеплення з агрономічно невигідними генами складно використовувати для покращення пшениці за ознакою стійкості [30]. Крім того, гени зазвичай експресуються на різних стадіях онтогенезу рослини, при цьому рівні експресії різних генів коливаються і не є постійними [24].

Для генів стійкості до борошнистої також є характерним розташування у кластерах з генами, які забезпечують стійкість до інших патогенів [5,70-72]. Одним з прикладів є ген *Pm1*, який знаходиться у кластері з генами стійкості до іржі листя (*Puccinia triticina*) *Lr20* та іржі стебла (*P. graminis* f. sp. *tritici*) *Sr15* [5]. Ще одним – *Pm64*, який повністю зчеплений у фазі відштовхування з геном стійкості до смугастої іржі *Yr5*. Щоб виявити рекомбінантну лінію рослин з обома генами використовують великі сегрегуючі популяції. Така перевірка є важливою, оскільки передача обох генів є цінним ресурсом для забезпечення стійкості до обох захворювань, якщо в цьому є потреба, яка

залежить від поширення патогену [68]. Ген *Pm8* знаходиться у кластері з генами *Yr9*, *Lr26* та *Sr31*, які сприяють резистентності до жовтої (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*), листкової (*P. triticina*) та стеблової іржі (*P. graminis* f. sp. *tritici*), відповідно. Перелічені гени перенесені у геном пшениці м'якої через транслокації 1BL/1RS від жита сорту Петкус (1970-ті роки) [71,72]. Ще одним прикладом є локус *MLO (Mildew resistance locus O*) ячменю. *MLO* кодує білок плазматичної мембрани, який має 7 трансмембранних спіралей та С-термінальний кальмодулінозв'язувальний домен. Представники білків родини MLO задіяні у різноманітних процесах, крім забезпечення стійкості, це – спрямоване проростання пилкової трубки (AtMLO7/NORTIA) та тігмоморфогенез кореня (зміни росту залежно від механічних впливів) [73]. У гексаплоїдної пшениці є 3 ортологи *MLO* (*TaMlo*) у складі A, B та D геномах [71,72].

Деякі гени мають алельний ряд: *Pm1* (*1a-1e*), *Pm2* (*2a-2c*) [69], *Pm3* [3], *Pm4* (*4a-4d*), *Pm5* (*5a-5e*), *Pm24* (*24a-24b*), які локалізовані на хромосомах 7AL, 5DS, 1AS, 2AL, 7BL, 1DS, відповідно [69,74]. Найбільший алельний ряд має ген *Pm3*, нараховують 17 функціональних алелів (*Pm3a-g*; *Pm3k-t*) [3]. За одними даними алелі гена *Pm3* називають *Pm3a-j* [74], за іншими *Pm3a-g*; *Pm3k-t* [3]. Дані стосовно різних алелів уточнюються та деякі з послідовностей виключають з алельного ряду, наприклад через однакову послідовність з іншими алелями або генами. Найбільший алельний ряд має ген *Pm3*, нараховують 17 функціональних алелів (*Pm3a-g*; *Pm3k-t*). Продукти алелів мають високий рівень ідентичності амінокислотних послідовностей білків (>97%) [3]. Амінокислотні послідовності домену CC абсолютно консервативні (100%), в ділянках сайтів зв'язування нуклеотидів виявлений обмін послідовностями, що пояснюють внутрішньогенною рекомбінацією або генною конверсією між алелями. Алелі *Pm3a*, *Pm3b, Pm3d, Pm3f* утворюють справжній алельний ряд. Низький рівень розбіжностей між послідовностями перерахованих алелів узгоджується з відносно нещодавньою еволюцією резистентності завдяки *Pm3*. Деякі або більшість алелів локусу *Pm3* сучасної

пшениці утворилися після одомашнення виду [52,75]. Існують випадки, коли один з алелів має зміну у послідовності, така зміна забезпечуватиме підсилення функції або взагалі її прояв [45,54]. *Pm5e* кодує білок з нуклеотидозв'язувальним доменом та з лейцин-збагаченими повторами (NLR). Рідкісний несинонімічний однонуклеотидний варіант (**S**ingle **N**ucleotide **V**ariant, SNV) у послідовності, яка кодує С-кінцевий LRR домен – відповідає за підсилення функціональності білка Pm5e у сортів з китайської провінції Shaanxi [54]. Аналіз гаплотипів пшениці з різних провінцій Китаю показав, що рідкісна природна делеція 6 пар нуклеотидів (6-bp) у лізин-гліциновому кодоні кіназного домену Kin I (**K**inase I **d**omain, Kin I) генів *Pm24*, *Pm24b* і *MlHLT* є критичною для функції резистентності у ендемічних сортів пшениці китайської провінції. Після перевірки на алелізм показано, що швидше за все, перераховані гени є одним і тим же геном, відповідальним за стійкість до борошнистої роси. Спочатку проводили схрещування різних китайських сортів колекції CYC (Chinese wheat landraces Chiyacao), BHL (Baihulu) і HLT, у яких ідентифікували гени *Pm24*, *Pm24b*, and *MlHLT*, відповідно. Далі гібриди лишали для самозапилення та популяції F_2 фенотипували за допомогою ізоляту *Bgt* E09 в контрольованих тепличних умовах. Усі рослини F_2 від схрещувань були стійкими до гриба. Також три сорти були високо- або помірно стійкими (0-2) до 93 генетично відмінних ізолятів Bgt, зібраних з 45 повітів у 12 провінціях [45]. *MlHLT* описують, як домінантний ген, який контролює стійкість до гриба у сорту Hulutou. За допомогою порівняльного геномного аналізу ідентифікували колінеарні геномні ділянки локусу *MlHLT* на 1DS хромосомі *Aegilops tauschii*, другій хромосомі *Brachypodium distachyon*, п'ятій хромосомі рису та дев'ятій – сорго. Колінеарний порядок є результатом походження *MlHLT* від спільного предка [76]. Локус *MlHLT* картували між маркерами *Xwggc3148* та *Xwggc3026* у термінальному регіоні хромосоми 1DS пшениці. Картування проводили, створюючи картувальні популяції між стійкими та високочутливими сортами. У локусі *MlHLT* ідентифікували два гени рецептороподібної кінази RLK1 і RLK2, гени, які кодують білки з

тандемними доменами з кіназною активністю (**W**heat **T**andem **K**inase 3, WTK3), білки з сайтами зв'язування нуклеотидів, доменом згорнутої спіралі (спіраль-змійовик) та з багатим на лейцин повтором (CNL), гіпотетичний білок та рибосомний білок 50S L10 [45].

Серед ідентифікованих генів проводили порівняння послідовностей і було встановлено, що деякі з генів мають ідентичну послідовність, однак назву різну: *Pm18 = Pm1c*, *Pm22 = Pm1e, Pm23 = Pm4c, Pm31 = Pm21* [35], *Pm17 = Pm8*, *Pm48 = Pm46* [46]. Для гена *Pm17* не досягнуто консенсусу стосовно того чи є він алелем, чи все ж близьким паралогом гена *Pm8*. Обидва гени знаходять у складі пшенично-житньої транслокації 1AL.1RS. *Pm8* перенесений від сорту жита Petkus, а *Pm17* інтрогресований від лінії жита Insave. Вивчення кодувальних послідовностей *Pm17* та *Pm8* – подібні на 82,9% на рівні білків, домени LRR є найбільш відмінними. *Pm3* є ортологом *Pm17*/*Pm8* [77]. Алелі *Pm4b / Pm4c*, *Pm4d/Pm4e* абсолютно ідентичні за нуклеотидним складом в межах кожної пари. Алелі *Pm4* мають різне походження. *Pm4a* та *Pm4b* перенесені до пшениці м'якої з тетраплоїдної пшениці, в той час, як *Pm4d* – від *Triticum monococcum*. Походження *Pm4f*, *Pm4g* та *Pm4h* лишається невідомим [78]. У локусі *Pm60* ідентифіковано три функціональні алелі, які забезпечують стійкість (*Pm60*, *Pm60a*, *Pm60b*). Продукти алелів відрізняються між собою делецією 80 амінокислот (продукт *Pm60a*) або інсерцією (продукт *Pm60b*) в області LRR, порівняно з продуктом гена *Pm60* [39]. У випадку гена *Pm1*, який входить до складу кластеру генів стійкості та має алельні варіанти *Pm1b–Pm1e* у гексаплоїдної пшениці, для *Pm1e* є синтенія з *Pm22*, тобто зберігається порядок розташування генів/алелів на двох наборах хромосом, які порівнюються. Ген *Pm1b* ідентифікований у *T. monocccum*, *Pm1d* у *T. spelta* var. *duhamelianum*. В межах кластеру генів відсутня генетична рекомбінація. Продуктами є імунні рецептори NLR. Стабільна трансформація *Pm1a* забезпечує утворення фенотипу зі стабільною / сильною резистентністю у трансгенних рослин, якщо інфікувати рослин вірулентним збудником *Bgt*. За наявності грибного ефектора, експресія гена

стійкості у *Nicotiana benthamiana* індукує реакцію гіперчутливості [5]. Має повну генетичну асоціацію з геном стійкості до іржі листя *Lr20* та стеблової іржі *Sr15* [70]. Синтенія також спостерігається для *Pm57* (рис. 1.3), який розташований на 2-й хромосомі різних геномів:

- 2B між *X67593* (773,72Mb) – *X62492* (778,85Mb) у *T. aestivum*;
- 2D між маркерами *X67593* (629,31Mb) – *X62492* (633,79Mb) у *Ae. tauschii*;
- 2A між маркерами *X67593* (733,62Mb) – *X62492* (735,41Mb) у *T. urartu*;
- 2H між маркерами *X62492* (743,65Mb) – *X67593* (747,29Mb) у *Hordeum vulgare* [32] (рис. 1.3).

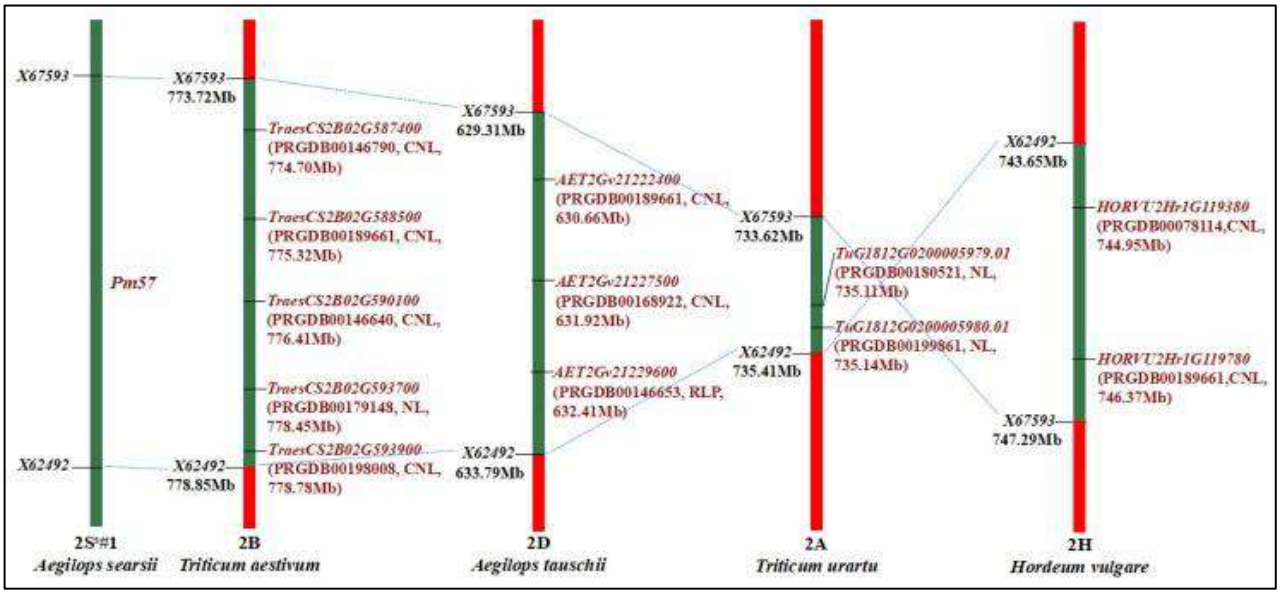


Рис. 1.3. Розташування *Pm57* у ділянках синтенії *T. aestivum*, *Ae. tauschii*, *T. urartu*, *H. vulgare* [32].

Точне картування деяких генів ускладнюється через відсутність рекомбінації між інтрогресованим сегментом та хромосомою пшениці. Така ситуація спостерігається для гена *Pm16* – відсутня рекомбінація між сегментом 6S *Ae. speltoides* та пшеничною хромосомою 6B [79]. *Pm21* не піддається молекулярно-генетичному картуванню, оскільки відсутні кон'югація (does not pair) та рекомбінація між 6VS і 6AS [43]. Аналогічна ситуація і з локусом *Pm6*. Щоб подолати супресію алогенної рекомбінації 2B/2G використовують стратегію на основі *ph1b* мутантів для створення інтрогресій зі зменшеними

фрагментами 2G (хромосома) від *Triticum timopheevii* (2n = 48, AAGG) для того, щоб здійснити точне картування *Pm6* [58]. Створюють також дисомні заміщені лінії 6R(6A), які мають імунітет до збудника борошнистої роси завдяки інтрогресії *Pm20*. Щоб індукувати робертсонівські транслокації отримують подвійні моносомні особини (6R та 6A) шляхом схрещування лінії заміщення з еуплоїдною, які в подальшому самозапилюються. Наявність транслокації перевіряють за допомогою цитогенетичних методів [61]. Завдяки компенсаторним робертсонівським транслокаціям від *Dasypyrum villosum* до генетичного пулу пшениці м'якої інтрогесовані *Pm21, Pm55, Pm62* [57,80].

Гени стійкості до борошнистої роси частково привнесені від близькоспоріднених видів гексаплоїдної пшениці. Деякі з генів *Pm* пшениці мають алельні ряди, синтенію з іншими видами, часом продукти різних генів чи алелів мають негативний взаємний ефект.

1.1.3. Продукти експресії генів стійкості. Білки, які кодують гени резистентності (**R**esistance genes, *R*), мають принаймні декілька основних мотивів: структуру спіраль-змійовик (**C**oiled-**c**oil, CC) на N-кінці, багатий на лейцин повтор (LRR), сайт зв'язування нуклеотидів (NBS), трансмембранні домени та протеїнкіназні, Toll/інтерлейкін-1 рецептор (TIR). Переважна більшість генів *R* кодують білки з доменами TIR, NBS, LRR, які належать до групи TNL. Гени, які кодують лише TIR та NBS входять до групи генів TN, деякі кодують білки тільки з доменом TIR (гени TX). Білки з доменами CC-NBS-LRR створюють групу CNL, ще одна група генів кодує білки, подібні до CNL, але без мотиву CC. Назва груп формується за першими літерами доменів або структур [4]. У білків з CNL специфікація активності відбувається за рахунок наявності LRR, хоча ці частини білків характеризуються більшою мінливістю [23]. У випадку іржі льону показано, що за амінокислотними послідовностями LRR відбувається диверсифікація. Є припущення, що така подія є проявом коеволюції патогену та господаря. Механізм еволюції включає неоднакову рекомбінацію та конверсію генів, які кодують домени, ймовірно, початково відбулася подія дуплікації гена, який кодує LRR з подальшим

розходженням за нуклеотидною послідовністю, що сприяє утворенню нових кодонів для амінокислот та зміни амінокислотного складу доменів [24,61]. Експресія генів, які кодують NLR, та активація їхніх продуктів знаходяться під точним регулюванням транскрипції, альтернативного сплайсингу за участі малих некодувальних РНК (non-coding **s**mall RNA, sRNA), трансляції, пострансляційної модифікації, димеризації або олігомеризації NLR та протеасомної деградації. Порушення активації NLR або надмірне накопичення може призвести відповідно до розвитку захворювань або автоімунних реакцій [23].

Гени резистентності рослин кодують рецептори, які активуються грибними ефекторами [24]. Прикладом таких рецепторів є внутрішньоклітинний рецептор з нуклеотидозв'язувальним сайтом та лейцин-багатими повторами (NLRs або NBS-LRR). Білки з доменами NBS та LRR класифікують, базуючись на особливостях N-кінцевих структур [81], багато з них мають домени, гомологічні з внутрішньоклітинними сигнальними доменами рецепторів Toll у *Drosophila* та інтерлейкіну (IL)-1 (TIR-NB-LRR) у ссавців [24,61]. У гексаплоїдної пшениці NLRs кодують: *Pm2*, *Pm3*, *Pm5*, *Pm8*, *Pm17*, *Pm21*, *Pm24, Pm38*, *Pm41*, *Pm46*, *Pm60* [61,82]. Найбільш характерною ознакою таких білків є варіабельна кількість карбокси-кінцевих LRR. Домени LRR є сайтами зв'язування білка з білком, зв'язування пептидів та лігандів, також є посередниками у взаємодії між білками та вуглеводами. Сайт зв'язування нуклеотидів є консервативним, з ним здатні зв'язуватися АТФ та ГТФ. NBS є частиною більшого домену NB-ARC (за функціональністю є АТФазою Р-типу), який гомологічний між продуктами генів стійкості та має подібність з ефекторами загибелі еукаріотичних клітин (Apaf-1 та Ced4) [81]. NB-ARC містить 3 співдомени: NB та ARC_1, ARC_2, ARC_3. NB відповідає з регулювання активності білків R. ARC_1, ARC_2 та ARC_3 формують різних форм пучки із спіралей. Специфічне зв'язування АТФ забезпечується за допомогою восьми прямих та чотирьох H_2O-опосередкованих взаємодій з різними консервативними залишками, які наявні у всіх співдоменах, крім ARC_3 [83]. За

аналогією з функцією Apaf-1, активація білків R може включати Avr-залежне вивільнення домену АТФази від інгібування С-кінцевими LRR, з подальшою мультимеризацією комплексу, який рекрутує додаткові білки в амінокінцевий домен для сигнальних подій нижчих за течією [81].

NLRs входять до складу резистосом. Структуру рослинної резистосоми встановили за допомогою кріогенної електронної мікроскопії (**cryo**genic **e**lectron **m**icroscopy – cryo-EM), до цього вивчали NLRs за допомогою методу рентгенівської кристалографії, однак, виникала проблема з очищення повнорозмірних рослинних внутрішньоклітинних NLRs, хоча за допомогою такого методу встановлена структура N-кінцевих доменів NLR. Структура білків CNL, які є найпоширенішим класом NLR у однодольних рослин, та білок активованої стійкості (HOP**Z**-**A**CTIVATED **R**ESISTANCE 1, ZAR1) була встановлена за допомогою cryo-EM. *Arabidopsis* ZAR1 є активатором імунних реакцій, оскільки задіяний у розпізнаванні бактеріальних ефекторів. Білок кінази 1, пов'язаної зі стійкістю (**R**ESISTANCE RELATED **K**INA**S**E 1, RKS1, також відома як ZRK1) конститутивно взаємодіє з доменом LRR ZAR1 [84].

Для білків, які забезпечують стійкість до грибних патогенів описане подвійне розпізнавання, тобто один продукт гена стійкості здатен сприймати спектр білків Avr, при цьому білки можуть мати різне походження. Наприклад, ген *Mi* томатів забезпечує стійкість до нематод та попелиць, алелі гена *RPP8/HRT* надають стійкість до ооміцетів та вірусів. Крім того, під час еволюції може створюватися алельний ряд в межах одного локусу, який забезпечуватиме розпізнавання декількох Avr [20].

Також описані консервативні дисахаридозв'язувальні малектин-подібні білки, які мають широкий спектр функціональності, крім забезпечення стійкості: взаємодія чоловічого та жіночого гаметофітів під час проростання пилкової трубки, запліднення яйцеклітини [85,86], задіяні у розвитку стійкості до біотичних та абіотичних стресів, передачі сигналів за участі гормонів [87], формуванні та рості кореневих волосків [86,88], подовженні клітин [89]. Малектини складаються з близько 190 амінокислотних залишків, були описані

як тваринні білки, однак, у рослин виявлені білкові домени, які гомологічні малектинам. У тваринних клітинах малектини знаходяться у просвіті ендоплазматичного ретикулуму, у рослин малектин-подібні домени зі збагаченими на лейцин повторами орієнтовані у позаклітинний простір та асоційовані з LRR [90,91]. У ЕПР малектини взаємодіють з олігосахаридтрансферазним комплексом та контролюють якість фолдингу білків. Малектин-подібні домени є у рослинних рецептор-подібних кіназ (**R**eceptor **L**ike **K**inases – RLKs), такими доменами є M/MLD-RLKs (Malectin/Malectin-like (M/ML) domain RLKs), THESEUS1 (THE1) та FERONIA (FER), які описані у *Arabidopsis thaliana.* Базуючись на філогенетичному аналізі білки з малективновими доменами поділяють на три клади: MLD-рецептор-подібні білки (MLD–**R**ECEPTOR-**L**IKE **P**ROTEIN – MLD–RLP), клада з рецепторними кіназами FERONIA (FER) та THESEUS1 (THE1), рецептор-подібні кінази IMPAIRED OOMYCETE SUSCEPTIBILITY 1 (IOS1). CrRLK1L FERONIA та IOS1 функціонують як скафолд-білки для регуляції рецепторів імунної відповіді LRR-RLK. Білок FER є скафолд-білком для рецепторів PAMP та позитивними регуляторами PTI, імунній відповіді рослин. На противагу FER, RALF23 (RAPID ALKALINIZATION FACTOR 23) є негативним регулятором, який залучений ще у регуляторних шляхах за участю MYC2 та жасмонової кислоти. RALF23 індукує швидке підлужування позаклітинного простору рослинних клітин [90].

В результаті експресії генів спостерігають і утворення декількох ізоформ продуктів генів, усі з яких потрібні для прояву резистентного фенотипу. В результаті експресія гена *Pm4b* після конститутивного альтернативного сплайсингу утворюються 2 ізоформи, обидві задіяні у формуванні расоспецифічної резистентності до *Bgt*. Обидва білки асоційовані з ЕПР. Ген кодує передбачуваний химерний білок – серин / треонін кіназу, множинні С2 домени та трансмембранні регіони [53].

Продукти генів стійкості до борошнистої роси мають спільну будову – це наявність доменів з повторами багатими на лейцин, нуклеотидозв’язувальних

доменів та структур спіраль-змійовик. За допомогою білків, які кодують гени *R*, відбувається розпізнавання грибних ефекторів та передача сигналів для розвитку імунної відповіді.

1.2. Деякі з факторів, які впливають на прояв стійкості до патогену, не враховуючи наявність генів стійкості у геномах

Наявність послідовностей генів стійкості у складі геномів не завжди пов'язано з проявом ознаки на рівні фенотипу. Рослини здатні реагувати на проникнення патогенів як на транскрипційному рівні, так і посттранскрипційному та посттрансляційному. Важливою також є епігенетична регуляція генів, як відповідь на біотичні та абіотичні стреси. Епігенетична модифікація послідовностей ДНК та гістонів є одним з механізмів регуляції експресії генів, яка викликає модифікацію хроматину без змін у послідовностях ДНК. До епігенетичних модифікацій належить зміни у метилюванні ДНК, модифікації гістонів та структури хроматину, такі модифікації можуть передаватися нащадкам. Перераховані зміни сприяють точній та інтегрованій регуляції експресії генів, що відбувається через взаємодії білок-білок, білок-ДНК, білок-РНК, РНК-ДНК-білок. Збереження та передача у поколіннях епігенетичних міток дозволяє рослинам набувати пам'яті про боротьбу зі збудниками захворювань [23].

Регуляторну функцію можуть виконувати малі РНК, які є некодувальними, наприклад мікроРНК (miRNAs). Таку функцію можуть виконувати не тільки РНК ендогенного походження. Пропонується [92], що sRNA можуть бути мобільними регуляторними молекулами, як в межах рослини, в якій вони синтезувалися, так і між різними рослинами, рослинами та патогенами. Таку функціональність відводять РНК екзогенного походження, тим, які можуть перебувати в середовищі. За допомогою мікроРНК відбувається комунікація, наприклад між сусідніми рослинами та індукування посттранскрипційного замовчування генів (**p**ost-**t**ranscriptional **g**ene **s**ilencing, PTGS). У регуляції

процесів в одному організмі можуть бути залучені і інші регуляторні молекули (гормони, органічні сполуки, інші некодувальні РНК), які надходять від організму іншого царства. У випадку РНК регуляція процесів за участі іншого організму відбувається шляхом РНК інтерференції (**c**ross-**k**ingdom sRNA **i**nterference, ckRNAi) [92,93]. РНК інтерференція може бути і міжвидова (*trans*-species RNA interference) в межах одного царства [94].

Проте не всі мікроРНК можуть транспортуватися між організмами та впливати на експресію генів у рослини чи патогену, іншої рослини. Прикладом мобільних мікроРНК є сигнальні модулі miR156/SPL та miR399/PHO2. Обидві РНК можуть індукувати утворення вторинних siРНК, що тільки збільшуватиме початкове замовчування генів через деградацію мРНК. Сигнальними модулями називають сукупність сигнальних молекул (рецептори, сигнальні ферменти, вторинні месенджерні молекули), які утворюють функціональний ланцюг для передачі сигналів [92,95]. Модуль miR156/SPL впливає на розвиток просторово-часової мережі формування імунної системи рослини в процесі її старіння, під час онтогенезу. Саму miR156 регулює чутливий до зміни віку рослини медіаторний комплекс CDK8-MED12/13, потім РНК вже націлена на транскрипційні фактори родини SPL [95]. У аробідопсиса, бавовника CDK8 (циклінзалежна кіназа типу Е) є частиною комплексу транскрипційного коактиватора Mediator. Обидва білки є багатофункціональними, залучені у регуляцію транскрипції генів. Однією з функцій є вплив на розвиток імунної відповіді у рослин при взаємодії з бактеріями та грибами. MED25 позитивно регулює експресію генів залежних від жасмонової кислоти. Жасмонова кислота залучена у відповіді на патогенів-нектротрофів [96,97]. SPL може напряму або опосередковано регулювати експресію захисних генів, формуючи віковий імунітет за участі сигнального модулю miR156-SPLs [92].

Між рослинами та патогенами можлива двоспрямована комунікація за допомогою некодувальних РНК [92]. Рослина може транспортувати свої ендогенні міРНК до патогену, щоб інгібувати або зменшувати його здатність інфікувати (патогенність) та здатності різною мірою розвивати та поширювати

інфекцію (вірулентність). В останньому випадку через націлювання на гени вірулентності, в той час як патоген спрямовує свої sRNAs до рослини, щоб перешкодити розвитку імунної відповіді [98]. У рослину та по рослині грибні регуляторні молекули транспортуються через плазмодесми та флоему, у зворотному напрямку через плазмодесми та септальні пори гриба, які мають структуру, подібну до плазмодесм, можливий ще транспорт через позаклітинні везикули [93].

Прикладом РНК, залученої у міжвидову регуляцію є 24-нуклеотидна Vd-sRNA (отримана з рРНК (VdrsR-1)) від ґрунтового гемібіотрофного гриба *Verticillium dahliae*, який викликає в'янення у низки рослин-господарів [94]. У арабідопсису Vd-sRNA взаємодіє з хазяйським (рослинним) AGO1 та призводить до розщеплення miR157d (є прекурсором MIR157d) рослини між 10 та 11 нуклеотидами. Зазначають, що існує селективний механізм доставки виключно VdsRNA у рослинні клітини та його завантаження у AGO1. Оскільки тільки ця РНК виявляється при штучному інфікуванні арабідопсиса патогеном. Цільовими для miR157 є гени *SPL*, які регулюють перехід від вегетативної стадії до цвітіння. В результаті впливу сигнального (регуляторного) модуля на ці гени рослина не переходить до цвітіння і продовжує вегетувати, що вигідно патогенові для збільшення кількості колоній та отримання поживних речовин від господаря [98]. Можливою причиною селективного транспортування може бути схожість патогенних sRNA до рослинних через наявність U на 5′-кінці [99].

Рослина-господар у відповідь може транспортувати свої sRNA до гриба, наприклад, щоб протидіяти РНК-інтерференції [92]. Завдяки секвенуванню всіх sРНК *V. dahlia*, який інфікував бавовник були ідентифіковані Ga-miR166 та Ga-miR159. Обидві міРНК запобігають вірулентності патогену через замовчування генів Ca^{2+}-залежної цистеїнової протеази кальпаїну (*Ca^{2+}-dependent cysteine protease calpain*, *clp-1*) та гідроксилази ізотриходерміну С-15 (*isotrichodermin C-15 hydroxylase*, *HiC-15*). Кальпаїнові протеази гриб використовує у процесах клітинної смерті свого господаря [100]. Другий фермент забезпечує синтез

токсинів тріхоценів у багатьох видів грибів, наприклад представників роду *Fusarium*. Тріхоцени є інгібіторами біосинтезу білку [101]. Подібні взаємодії за допомогою РНК між різними видами описані для таких пар господар - патоген: *A. thaliana – Botrytis cinerea*, *A. thaliana – Phytophthora capsici*, *A. thaliana – Sclerotinia sclerotiorum*, томати – *Botrytis cinerea*, ячмінь – *Fusarium graminearum*, бавовник – *V. dahliae* [93,99].

Рослини здатні секретувати у навколишнє середовище міРНК та такі РНК при цьому лишаються стабільними, вони здатні впливати на експресію генів у сусідніх рослинах з проявом цього на рівні фенотипу [102]. міРНК з середовища можуть поглинатися через коріння або через інші частини рослини, транспортуються по ксилемі [103]. Вперше вплив міРНК від однієї рослини на сусідню був виявлений при культивуванні рослин з використанням гідропоніки. Одна з рослин була дикого фенотипу, інша характеризувалася надмірною експресією miR156a, яка виділялась у навколишнє середовище та викликала зниження експресії генів PHO2/SPLs у рослини дикого типу. На рівні фенотипу такий вплив був у затримці переходу до цвітіння [102,104]. Цікавим є питання, чи може інфікована рослина, секретуючи у середовище міРНК сприяти активації імунітету у сусідніх здорових рослин. Проте такої інформації серед переглянутої літератури не було знайдено.

Наступним фактором впливу на прояв ознаки є взаємодія білків. Від рецепторів, які взаємодіють з ефекторами патогену, сигнал про їхнє проникнення має передаватися далі до ядра, якщо первинна взаємодія молекул рослини з ефекторами не призвела до інгібування поширення інфекції. Регуляція такого типу може відбуватися за рахунок комплексу ядерної пори (**N**uclear **p**ore **c**omplex – NPC). Проникнення патогену може індукувати сайленсинг генів, які мали б забезпечувати регуляцію альтернативного сплайсингу, генів, задіяних у формуванні NPC. Згідно з [22], за його участю пригнічується експресія 29 генів. NPC є мультибілковим комплексом, який контролює експресію генів шляхом транспортування транскрипційних факторів. До складу NPC входять нуклеопорини та імпортини, нуклеопорини

Nup96 та Nup88, α3- та β – імпортини, які регулюють експресію генів резистентності, та генів, які контролюють PTI та ETI [22]. Однак грибний патоген рису *Magnaporthe oryzae* секретує ефектор AvrPiz-t, який інгібує нукопорин Nup98, як результат знижується експресія генів резистентності, що сприяє підвищенню сприйнятливості рослини. Таким шляхом відбувається пригнічення базального вродженого імунітету також і у пшениці збудником борошнистої роси, активність ядерного порового комплексу та експресія генів резистентності [105].

Для двох генів стійкості до борошнистої роси відомо, що їхні продукти можуть взаємодіяти між собою, що призводитиме до втрати функціональності обох білків, які мали би сприяти стійкості до патогену. Прикладом цього є взаємодія продуктів пшеничного гена *Pm3* та *Pm8,* який інтрогресований від жита посівного, гени ортологи. Продукт гена *Pm3* вважають домінантним супресором *Pm8*. Експресія гена *Pm3* є достатньою для пригнічення расоспецифічної стійкості, яка забезпечується *Pm8*. Щоб підтвердити такий вплив створювали гомозиготні лінії за обома генами одночасно. Рослини мали однакові рівні продуктів генів та були схожими до рівнів у гомозиготних ліній, але окремо за кожним геном. Таке спостереження дозволило зробить припущення, що пригнічення експресії *Pm8* за участі *Pm3* відбувається за рахунок посттрансляційних процесів, як результат – утворюються нефункціональні білкові структури (комплекси). Цілком ймовірно, що усі функціональні алелі гена *Pm3* можуть блокувати активність продуктів *Pm8* [51]. Крім того, різні алелі *Pm3* негативно впливають один на одного. Як і в попередньому прикладі, рівні мРНК та білків, у лініях пшениці з попарними комбінаціями алелів *Pm3*, є незмінними. За допомогою тимчасової експресії алелів у *Nicotiana benthamiana* ідентифікована N-кінцева частина домену LRR, яка має вирішальне значення для супресії. Такі результати можуть свідчити про те, що експресія близькоспоріднених генів перенесених з вторинного генофонду у поліплоїдні види може призводити до домінантно-негативних взаємодій. Такі взаємні впливи різних генів / алелів можуть несприятливо

впливати на стратегію створення стійких сортів через пірамідинг декількох генів чи алелів [106].

Для прояву ефективності *Pm4b* (походить від тетраплоїдної пшениці) потрібно, щоб були утворені два продукти. В результаті конститутивного альтернативного сплайсингу утворюється дві мРНК, які транслюються у дві ізоформи Pm4b-V1 (560 амінокислот) та Pm4b-V2 (747 амінокислот). Деякі алелі гену *Pm4* забезпечують расоспецифічну стійкість не тільки до *Bgt*, а і до *Magnaporthe oryzae Triticum* (*MoT*) (*Pm4a*, *Pm4b*, *Pm4d* та *Pm4h*), один алель ефективний проти *MoT*, але не проти *Bgt*, та один алель є неефективним проти обох патогенів (*Pm4g*) [78]. Специфічність розпізнавання ефекторів різних рас патогену відбувається завдяки NLR. Крім того, специфічність може визначатися і наявністю різних алелів гена та поліморфізму у дві амінокислоти у петлі активації кіназного домену S_TKc зі специфічністю до серину / треоніну. Через деякий час після розпізнавання ефекторів патогену запускається Pm4b-опосередкована реакція гіперчутливості. За відсутності AvrPm4, Pm4_V1 та Pm4_V2 утворюють гетерокомплекс, взаємодіючи через домени C2, та знаходяться в такому стані у мембрані ЕПР [53]. Одна ізоформа на С-кінці має C2C-домен, як інша – C2D-домен, сполучений з С-кінцевим доменом фосфорибозилтрансферази з двома трансмембранними доменами [107]. Розпізнавання AvrPm4 відбувається через домени C2C/D (кіназні домени), після чого відбуваються конформаційні зміни та активація кіназної активності, що потрібно для імунної відповіді на проникнення гриба. Такі події відбуваються тільки за наявності обох ізоформ [53].

На розвиток стійкості у рослини-господаря можуть впливати, як взаємодія між ендогенними молекулами, так і регуляторні молекули патогену можуть вносити свою лепту. В будь-якому разі прояв стійкості потребує тонкого регулювання, як з боку господаря, так і патогену.

РОЗДІЛ 2
МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Рослинний матеріал

Сорти озимої пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L.) (*2n*=42, AABBDD): Панна, Вдала, Лелека, Одеська 267, Селянка, Тіра, Ніконія (селекції Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення (СГІ-НЦНС), м. Одеса, Україна) та Аврора селекції Краснодарського НДІСГ (м. Краснодар, СРСР). Геномно-заміщені амфідиплоїди: Авротіка (*2n* = 42, AABBTT), Авродес (*2n* = 42, AABBSS), Аврозис (*2n* = 42, AABBS^{sh}S^{sh}) та Авролата (*2n* = 42, AABBUU). У кожного з амфідиплоїдів заміщено субгеном D пшениці м'якої Аврори на один з геномів диплоїдного виду: *Amblyopyrum muticum* Boiss. (van Slageren) (*Aegilops mutica* Boiss) (*2n* = 14, TT), *Aegilops speltoides* (*2n* = 14, SS), *Aegilops sharonensis* (*2n*=14, S^{sh}S^{sh}), *Aegilops umbellulata* (*2n* = 14, UU). Амфідиплоїди створені за методикою Жирова Є.Г. [цит. за 108].

Рослинний матеріал гібридного походження, який вивчали за ознакою стійкості, створений за участі гексаплоїдних інтрогресивних ліній та сортів пшениці. Інтрогресивні лінії були створені методом змішування хромосом субгеному D пшениці та геному диплоїда. Схрещували певний амфідиплоїд (материнський компонент) та сорт Аврора. Лініями вважаємо гібриди F_5, які були дібрані за кількістю хромосом. Для отримання F_5 відбирали F_4 з 40-43 хромосоми, оскільки такі рослини могли дати 42-хромосомні (гексаплоїдні нащадки) та потенційно мають інтрогресований хроматин [109]. Використовували 10 ліній-похідних серії «tica» та по одній-дві лінії для решти амфідиплоїдів. За участі ліній та сортів отримані популяції, які розщеплюються за дослідною ознакою, отримано декілька поколінь гібридів, отриманих від однієї комбінації схрещування. На рис. 2.1 наведена схема

створення гібридного матеріалу, де зеленим кольором обведені стійкі до збудника борошнистої роси генотипи, червоним – чутливі.

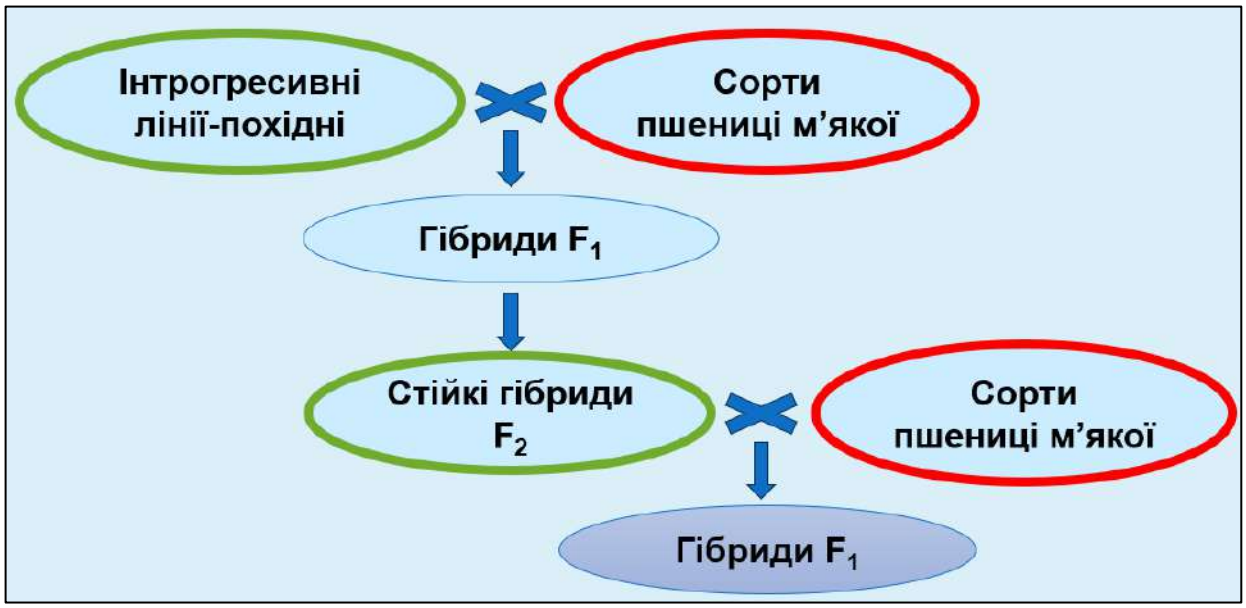


Рис. 2.1. Схема створення популяцій, які розщеплюються (зеленим кольором позначені стійкі генотипи, червоним – ті, що уражуються).

На першому етапі створення популяцій схрещували певну інтрогресивну лінію з певним сортом. Отримані гібриди лишали для самозапилення та стійкі рослини F_2 знову залучали у схрещування з сортами. Сорт на цьому етапі міг відрізнятися від сорту на першому етапі гібридизації. Поміж решти такі гібриди використовували для вивчення мейотичного поділу у материнських клітинах пилку (МКП). Отримані рослини всіх поколінь вивчали за стійкістю до борошнистої роси та структурою консервативних послідовностей генів стійкості.

2.2. Реактиви, розчини та обладнання

1. Для виділення ДНК:

- буфер ЦТАБ: 20мМ ЕДТА (pH 8.0), 100мМ Трис-HCl (pH 8.0), 2% ЦТАБ, 1,4М NaCl;

- суміш хлороформ-ізоаміловий спирт у співвідношенні об’ємів 24:1;

- розчин РНКази (10мкг/мл);

- 70% етиловий спирт;

- ізопропіловий спирт;

- ТЕ-буфер (для розчинення висушеної ДНК): 1мМ ЕДТА (pH 8.0); 10 мМ Трис-HCl (pH 8.0).

2. Для електрофорезу продуктів ампліфікації в агарозному гелі:

- 1,9% агарозний гель: 1,9г агарози, 5мкл бромистого етидію (10мг/мл) в 100мл гелю;

- 20х SB-буфер (електродний): 33г борної кислоти, 38,2г $Na_2B_4O_7x10H_2O$ (бура), загальний об’єм один літр;

- 6Х буфер для нанесення зразків у гель: 10мМ Трис-HCl (pH 7.6), 60% гліцерину, 60мМ ЕДТА, 1-2 кристали ксиленціанолу та бромфенолового синього.

Для фіксації та виготовлення чавлених препаратів:

- фіксатор Карнуа: 6 частин 96% етилового спирту, 3 частини хлороформу та 1 частина крижаної оцтової кислоти;

- для фарбування хромосом - 2% розчин ацетокарміну у 45% оцтовій кислоті;

- 5% водний розчин пектинази для мацерації.

Обладнання: центрифуга MiniSpinPlus (Eppendorf, Німеччина), центрифуга Centrifuge 5418 (Eppendorf, Німеччина) , спектрофотометр «СФ-2000» (Спектр, Санкт-Петербург, Росія), льодогенератор FM-120 DE-50 «ICEMAKER» (HOSHIZAKI, США), водяна баня БЛ-100 (НХП, Київ), джерело живлення для електрофорезу (Bio-Rad, США), міні-камера для горизонтального електрофорезу «Horizon 11-14» (Lifetechnologies, США), ваги лабораторні AD-60 (AXIS, Польща), ультрафіолетова лампа (UV/White Light Transilluminator TMW-20), цифрова камера Nikon D3200 (Японія), мікроскоп з флюоресцентним блоком Leica DM LB2 (Німеччина), стерилізатор паровий горизонтальний

настільний ГК-10-1-«ТЗМОИ». Морозильні та холодильні камери, кімната для вирощування рослин.

Використано реактиви компаній: «Sigma» (США), «Thermoscientific» (США), «SolisBiodine» (Естонія), «Amresco» (США), китайські та вітчизняні реактиви (хімічно чисті та особливо чисті для аналізу).

2.3. Оцінка рослинного матеріалу за ознакою стійкості до борошнистої роси

Оцінку стійкості дослідних рослин (батьківські генотипи та гібриди) проводили у польових умовах до виходу колоса з трубки. Оцінювали окремо кожну рослину. Результати оцінки зазначали на етикетці рослини зі вказуванням польового номеру та порядкового номеру рослини. Оцінювали гібридів за 9-бальною шкалою (табл. 2.1) [цит. за 110].

Таблиця 2.1

Ступінь ураження рослин переведений у бали

Фенотип рослини	Характеристика	Відсоток ураження	Оцінка у балах
стійка	повністю стійка рослина	0%	9
	ураження на листках нижнього ярусу	5%	8
	більш значне ураження прикореневої зони	10%	7
сприйнятлива з різним ступенем ураження	суттєве ураження листя нижнього ярусу та незначне – середнього	20%	6
	сильне поширення гриба на нижньому та середньому ярусах	до 40%	5-6
	суттєве ураження всього листя	60%	3-4
	наявність пустул по всій рослині, включаючи колос	80%	1-2

2.4. Методика штучної гібридизації

Рослини, які слугували материнськими компонентами схрещування емаскулювали за допомогою пінцета, видаляли пиляки з усіх квіток колосу, після чого такі колоси ізолювали пергаментаментними пакетами. Наймолодшу квітку з колоска видаляли. Через декілька днів, після дозрівання приймочки маточки, запилювали рослини пилком батьківського компоненту, попередньо підрізавши колоскові луски. Якщо була різниця у часі між цвітінням батьківських рослин, колосся зі зрілим пилком зберігали протягом декількох днів за +4°С.

2.3. Методи роботи з ДНК

2.3.1. Виділення ДНК з рослинного матеріалу. ДНК виділяли з листків рослин контрастних за ознакою інтересу (стійкі та уражені), вирощених у польових умовах. У ступках з рідким азотом гомогенізували листя до порошкоподібного стану, після чого переносили у пробірку типу еппендорф та додавали буфер ЦТАБ з розчином РНКази (10мг/мл) у співвідношенні 100:1. Вміст пробірки перемішували та прогрівали на водяній бані протягом години за температури 65ºС. Депротеїнізацію зразків проводили шляхом додавання до водної фази рівного об`єму хлороформу:ізоамілового спирту (24:1). Для забезпечення кращого контакту між рослинним матеріалом та сумішшю використовували автоматичну лабораторну мішалку, після чого центрифугували протягом 10хв (10 000xg). Після центрифугування вміст пробірки розділявся на три фази, у верхній фазі знаходилася ДНК (водна фаза), яку переносили у чисту пробірку та повторювали етап депротеїнізації ще раз. Для осадження послуговувалися охолодженим ізопропанолом, додаючи його рівний до супернатанту об`єм . Центрифугували протягом 10хв, з прискоренням 10 000xg у центрифузі з охолодженням (4ºС), ДНК лишається на дні пробірки, супернатант зливали. З метою очищення ДНК від залишків солей та пігментів

до осаду додавали 200мкл етилового спирту, перемішували та залишали зразки на ніч за температури -20ºС. Наступного дня зранку зливали спирт, просушували осад та розчиняли ДНК у ТЕ буфері [111 з модифікаціями].

2.3.2. Полімеразна ланцюгова реакція. Склад ПЛР-суміші на 1 дослідний зразок (загальний об`єм суміші – 30мкл, з яких 3мкл – ДНК певного генотипу, 27мкл – суміш для ПЛР) наведено у таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Склад суміші для ампліфікації ДНК

Компонент ПЛР-суміші	Об`єм	Кількість речовини у суміші
dH_2O	6,96мкл	-
буфер 10х	3мкл	1х
25мМ $MgCl_2$	1,8мкл	1,5мМ
суміш dNTP	3мкл	0,2мМ
праймер №1	6мкл	12,5рМ
праймер №2	6мкл	12,5рМ
ДНК-полімераза (10U / мкл)	0,24мкл	2U

Ампліфікацію проводили за наступних умов: 94°С – 5хв, 94°С – 1хв, $t_{гібр.}$ – 1хв, 72°С – 2хв, 72°С – 7хв. Температура гібридизації залежала від того, які праймери об’єднані у пару та була різною для різних комбінацій [112 з модифікаціями]. Температури плавлення праймерів наведені у пункті 2.3.4. Для частини праймерів температура гібридизації була підібрана, як середнє арифметичне між температурами плавлень кожного з праймерів, які входили у пару, якщо ці температури були різними. Для комбінацій, для яких такий підхід не працював, використовували градієнтний ПЛР. Для $t_{гібр.}$ встановлювали діапазон від 53,7°С до 61,4°С, решта умов, як написано вище. Збільшення кількості цільових послідовностей проводили протягом 35 циклів.

Для підвищення специфічності гібридизації використовували методику Touchdown PCR [113]. Ампліфікатор програмували наступним чином:

1	95°C – 3хв	6	95°C – 30с
2	95°C – 30с	7	55°C – 45с
3	61°C – 45с	8	72°C – 1хв
	- 1°C з кожним циклом	9	повернення до шостого кроку двадцять разів
4	72°C – 1хв		
5	повернення до другого кроку десять разів	10	72°C – 5хв

2.3.3. Горизонтальний електрофорез продуктів ампліфікації у агарозному гелі [114]. Для розділення продуктів ампліфікації використовували 1,9% гель, виготовлений на SB-буфері, візуалізацію проводили за допомогою бромистого етидію. Наважку агарози та відповідний об`єм 1х SB буферу з`єднували у термостійкій колбі та нагрівали у мікрохвильовій печі до повного плавлення агарози, періодично помішуючи, допоки гель ставав прозорим. 1х буфер SB готували з 10х, 1л якого містить 38,2г бури ($Na_2B_4O_7$ х $10H_2O$) та 33г борної кислоти (H_3BO_3), буфер готували на дистильованій воді. Задля запобігання руйнації бромистого етидію додавали його у помірно гарячий розчин (температура близько 60°C), після чого гель перемішували та заливали у камеру для електрофорезу, вставивши у гель гребінку для формування слотів. Після тужавіння гелю проводили розділення продуктів ампліфікації у електричному полі, змішуючи їх з 6х буфером нанесення відповідного складу у співвідношенні 1:5 (буфер:ДНК).

Умови розділення: 200В, 80-130мА. Тривалість – 30хв, для кращого розділення багатокомпонентних спектрів, які складаються з компонентів близьких за рухливістю – декілька годин.

2.3.4. Послідовності праймерів до генів стійкості та їхніх аналогів. Цільовими послідовностями були консервативні послідовності генів стійкості, які ампліфікували використовуючи праймери, частина послідовностей яких

взято з літературних джерел [115-118], праймери до гену стійкості до борошнистої роси *Pm8* (1RS·1BL) та алелів *Pm3* (1AS) (доменів LRR, кінази 2, Р-петлі) та один праймер до регіону, який кодує висококонсервативну послідовність з метіоніну, гістидину та аспартату (MHD) гену *Pm8* розроблені у лабораторії раніше [112] (табл.2.4).

Таблиця 2.4

Перелік праймерів та їхніх характеристик

Праймери до консервативних послідовностей генів стійкості до патогенів			
Праймер	Послідовність	Вміст G+C, %	Температура плавлення, ℃
RLRR rev	ACACTGGTCCATGAGGTT	55,22	50,00
RLRR for	CGCAACCACTAGAGTAAC	50,00	52,48
Cre3Lr-F	CACACACTCGTCAGTCTGCC	60,00	60,94
XLRR rev	CCCATAGACCGGACTGTT	55,56	55,55
Cre3-k3	CTGCAGTAAGCAAAGCAACG	50,00	58,32
Cre3 P-loop	GCGGGTCTGGGAAATCTACC	60,00	60,18
Праймери до консервативних послідовностей гена *Pm8* та алелів *Pm3*			
Pm8-LRR-L	GCATGCCTTGAAGCTTTGTA	45,00	59,07
Pm8-LRR-R	CTGTCGCAAACAGAAGTCCA	50,00	60,02
Pm8-MHD-L	CGATCTTATGCATGATATTGC	38,10	55,87

Решта праймерів створена до різних генів *Pm* під час дослідження з використанням послідовностей, депонованих у біологічній базі даних GenBank. Для порівняння послідовностей одного гена (алелі / сиквенси з різних рослинних зразків / послідовності отримані різними лабораторіями) використовували множинне вирівнювання послідовностей у NCBI Multiple Sequence Alignment Viewer [119], версія 1.25.0. Визначали, чи є статистично значущою різниця між порівнюваними послідовностями через розрахунок критерію Колмогорова-Смірнова у програмному забезпеченні GeneDoc [120], критерій Ф. Тадзіми у DnaSP6 [121]. Перед співставленням сиквенсів вирівнювали їх за допомогою CLUSTALW [122]. Послідовності праймерів до відібраних генів стійкості отримували послуговуючись онлайн-ресурсом Primer3 [123] (табл. 2.5).

Таблиця 2.5

Перелік праймерів до генів стійкості до борошнистої роси пшениці м`якої та їхні характеристикb

Праймер	Ген	Послідовність	Вміст G+C, %	Температура плавлення,℃
Pm2-1	*Pm2*	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
Pm3-1	алелі *Pm3*	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 AATGCTCTCTTGCAGCTGGT	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 GGCACTGGGCTCTGTACTTT	55	59,35
		R GATGCTGCAATGGGCTGAAC	55	59,35
Pm3-7		L GTTGCTGCTCTGGGTTTGTG	55	59,35
		R CACTGCTTCATGTGCGATGG	55	59,35
Pm4b-1	*Pm4*	L AGATTGGACGCGGTGGATTT	50	57,30
		R CTCCTTCGCGAACTTCTGGT	55	59,35
Pm4b-2		L TCCGTCAGCAAATGGTTCGA	50	57,30
		R GTACGACGCTCACCACTAGG	60	61,40
Pm21-1	*Pm21*	L CCCCACATTGTTCATCGGGA	55	59,35
		R GCTAATTGTAGCGGGCTTGC	55	59,35
Pm21-2		L GAGCTAGCAAGGGCAACAGA	55	59,35
		R CCGTGTCACTTGTCCTCGAA	55	59,35

Продовження таблиці 2.5

Pm24-WTK-1	*Pm24*	L TCCAAGTGACGAAGAACCCG	55	59,35
		R CAATTGGACAACCTGCACGG	55	59,35
Pm24-WTK-2		L CTGCAGCATCACTTTGGCAG	55	59,35
		R TAGCAGAGCAGTTGTTCGGG	55	59,4
Pm41-1	*Pm41*	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

2.4. Визначеня стабільності дослідних рослин під час мікроспорогенезу методом чавлених препаратів

Рослини, використані у дослідженні, вирощували у польових умовах. Для мікроскопічного аналізу збирали з них колоси, коли колос був у соломині між другим та третім листками, після чого колос вилучали і поміщали у фіксатор Карнуа, який змінювали наступного ранку. У свіжому фіксаторі матеріал зберігався тривалий час за +4°С. Фарбували 2% розчином ацетокарміну, приготованого на 45% оцтовій кислоті, поміщали колоси у барвник за 10-12 годин до дослідження для кращого профарбовування. Під стереоскопічним мікроскопом з більш зрілих квіток колосків, починаючи з середини колоса, діставали по три пиляки та поміщали у краплину 45% оцтової кислоти на предметному склі. Послуговуючись препарувальною голкою вивільняли материнські клітини пилку (МКП). Для забезпечення кращого профарбовування можна додавати краплину розчину ацетокарміну чи насиченого розчину тривалентного хлориду заліза, після чого препарат прогрівати над полум’ям спиртівки, не надмірно нагріваючи його, до відходу парів [124]. Опісля накривали скло з нанесеними клітинами покривним склом та аналізували під об’єктивами 10Х, 40Х, 60Х, окуляр – 10х. Вивчали мікроспорогенез на стадіях першого та другого поділу мейозу, які дозволяв отримати індивідуальний розвиток кожного з генотипів.

2.5. Статистична обробка результатів

Використовували критерії Тадзіми [125], Колмогорова-Смірнова, Шапіро-Уілка, рангів *R* Уілкоксона-Уайта, Кроскала-Уоліса, t-критерій Стьюдента, z-критерій [126] на різних етапах дослідження. Для розрахунків за зазначеними критеріями послуговувалися електронними таблицями Microsoft Excel, програмним забезпеченням GeneDoc [120], DnaSP6 [121].

РОЗДІЛ 3
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Вивчення стійкості до борошнистої роси проводили з використанням рослинного матеріалу гібридного походження, який має чужинний хроматин (інтрогресії) в складі якого можуть бути послідовності, котрі забезпечують стійкість. Або ж такий хроматин може індукувати зміни пшеничних послідовностей, що теж може позитивно впливати на прояв ознаки, який може залежати від молекулярно-генетичного середовища в якому опинилася ділянка (-и) геному, котра контролює (-ють) ознаку. Щоб прослідкувати це використовували амфідиплоїди, які мають геноми різних диплоїдних видів. Ймовірно, чужинні геноми у амфідиплоїдів є джерелами бажаних генів. Для кожного з амфідиплоїдів було створено декілька ліній, які і залучали у схрещування. Тестували як відбуватиметься передача ознаки від набору ліній до геномів різних сортів пшениці м'якої. Гібридний матеріал створювали за участі ліній, оскільки їхні геноми мають більшу гомологію із пшеничними геномами, це має сприяти більшій стабільності отриманих рослин-нащадків. За попередніми спостереженнями стійкий гібрид у поколіннях може ставати чутливим до патогену. Припускають, що послідовності стійкості є чужинними, вони можуть втрачатися через відсутність гомологічних ділянок для кон'югації під час мейотичного поділу. Цебто мейоз забезпечує сортування хроматину у материнських клітинах пилку (МКП) та материнській клітині макроспори (МКМ), який потрапить до складу клітин, залучених у процесах запилення та запліднення.

Стійкість до патогенів може бути обумовлена декількома факторами: наявністю генів стійкості *R*, що кодують білки різних типів, залучені у розпізнавання патогенів чи розвиток стійкості, взаємодії продуктів генів *R*. Якщо вивчається ознака стійкості у рослин гібридного походження, то мають враховуватись також процеси мейотичного поділу. Від того, якими будуть нащадки залежить не тільки генетичний склад гамет, а і те які гамети будуть

об’єднуватися для утворення нащадків. Якщо утворюються гамети з незбалансованою, нередукованою кількістю хромосом, то такі гамети мають бути елімінованні. Тому вивчення стійкості починали зі створення популяцій, які розщеплюються за ознакою-інтересу, з залученням гексаплоїдних інтрогресивних ліній-похідних амфідиплоїдів для перенесення бажаної ознаки на генетичне тло пшениці м’якої та спостереження за поведінкою ознаки при поєднанні різних батьківських генотипів. Створений рослинний матеріал (батьківські генотипи та гібриди) оцінювали на стійкість до збудника борошнистої роси у польових умовах. Оцінювали гібридів з метою визначення прояву ознаки за різних схрещувань та в подальшому пошуку зв’язку між фенотипом на рівні організму та молекулярним фенотипом. Щоб аналізувати отримані генотипи за молекулярним фенотипом потрібно створювати маркерну систему з використанням послідовностей генів, які систематично представлені, наявність ділянок може варіювати залежно від гена. Нуклеотидний склад таких консервативних ділянок може бути пов’язаний з певним проявом ознаки. Тому спочатку аналізували послідовності генів стійкості до борошнистої роси для пошуку консервативних ділянок з метою створення праймерів, які фланкуватимуть ці ділянки, та визначення їхньої присутності у складі геномів. Вивчали хроматин на іншому рівні організації – поведінку хромосом під час мейотичного поділу у батьківських рослин (сорти, амфідиплоїди), гібридів різних поколінь та отриманих за різних напрямків схрещувань. Щоб в подальшому співставляти хромосомні асоціації цитологічно нестабільного, але стійкого амфідиплоїда, з такими ж гібридів. Вивчення ознаки на різних рівнях організації хроматину може дозволити прослідкувати динамічні зміни, які трапляються з гібридними геномами за можливої наявності чужинного хроматину.

3.1. Оцінка інтрогресивних ліній та гібридних популяцій за ознакою стійкість до борошнистої роси

Інтрогресивні лінії та гібриди F_1 висівали в один рік і оцінювали одночасно двічі – на весні до стадії виходу колоса в трубку і після виходу флагового листа.

3.1.1. Характеристика інтрогресивних ліній. Тут наведено оцінку лише для ліній *T. aestivum/Am. muticum*, гібриди з якими використовували далі для отримання гібридів та їхнього цитологічного та молекулярно-генетичного вивчення.

В таблиці 3.1 видно, що рослини всіх п’яти ліній, які виросли з насінин, отриманих від інтрогресивних ліній *T. aestivum/Am. muticum*, які на момент їхнього створення у 2014 році і першого висіву в полі мали бал стійкості 9–8 (повна резистентність до збудника), не демонстрували одноманітність щодо ознаки інтересу. Кожна лінія мала кілька рослин (феноменологічна оцінка від 3% до 53%), які вражались борошнистою росою на рівні 4–1 балів.

Таблиця 3.1

Інформація про стабільність/мінливість інтрогресивних ліній *T. aestivum/Am. muticum* за стійкістю до суміші польових рас збудника борошнистої роси

Назва лінії	Кількість рослин	Розщеплення за стійкістю	
		бали 9–7 (стійкі)	бали 4-1(нестійкі)
tica1015	41	35	6
tica1075	17	8	9
tica1103	59	56	3
tica1024	39	36	3
tica1084	36	35	1

Наведені результати призвели до кількох практичних висновків: по-перше, гібридизація за участю інтрогресивних ліній має виконуватися тільки з застосуванням окремих зареєстрованих під індивідуальними номерами рослин лінії з подальшою оцінкою стійкості рослин, що виростуть з насінин цієї

рослини; по-друге, гібриди F_1 мають оцінюватися індивідуально за кожною рослиною незважаючи на свою теоретичну одноманітність; по-третє, співвідношення розщеплення у популяціях F_2 навряд чи можна використовувати як джерело інформації про кількість генів, за якими відбувається розщеплення.

3.1.2. Характеристика гібридів F_1 від схрещування стійких інтрогресивних ліній з сортами пшениці м'якої. Дані оцінки рослин F_1 від схрещування стійких (контролювали) рослин ліній *T. aestivum/Am. muticum* з сортами пшениці м'якої подано в таблиці 3.2 такого самого формату, що і попередня.

Таблиця 3.2

Інформація про стабільність/мінливість гібридів F_1 від схрещування інтрогресивних ліній *T. aestivum/Am. muticum* з сортами пшениці м'якої за стійкістю до суміші польових рас збудника борошнистої роси

Назва лінії	Сорт пшениці м'якої	Кількість рослин	Розщеплення за стійкістю	
			бали 9–7 (стійкі)	бали 4-1(нестійкі)
tica1015	Вдала (♀)[1)]	10	10	
tica1015	Панна (♀)	3	–	3
tica1015	Вдала	2	2	–
tica1015	Панна	7	5	2
tica1015	Селянка	3	–	3
tica1015	Ніконія	9	–	9
tica1075	Вдала (♀)	5	4	1
tica1075	Панна (♀)	7	–	7
tica1075	Селянка (♀)	2	–	2
tica1075	Ніконія (♀)	2	–	2
tica1075	Вдала	1	–	1

Продовження табл.3.2

tica1075	Панна	5	–	5
tica1075	Ніконія	10	–	10
tica1058	Панна	2	2	–
tica1103	Панна (♀)	3	–	3
tica1103	Одеська 267(♀)	4	4	–
tica1103	Панна	2	2	–
tica1103	Одеська 267	3	3	–
tica1024	Ніконія(♀)		–	1
tica1024	Ніконія	1	1	–
tica1024	Вдала	3	–	3
tica1024	Лелека	6	–	6
tica1084	Вдала(♀)	2	–	2
tica1084	Панна(♀)	9	–	9
tica1084	Одеська 267(♀)	3	–	3
tica1084	Лелека(♀)	1	–	1
tica1084	Ніконія	2	2	–
tica1084	Вдала	20	7	13
tica1084	Одеська 267	8	5	3
tica1084	Лелека	5	–	5
tica1084	Тіра	5	–	5

Примітка. [1)]: ♀ – материнський компонент схрещування.

Гени *Pm* пшениці, як і більшість інших *R* генів, домінантні. На нашому матеріалі це було підтверджено з самого початку роботи зі створення інтрогресивних ліній: гібриди від схрещування Авротіки (стійка) з сортом пшениці Аврора (вражається) були стійкими. Ця інформація отримана від

оригінаторів ліній і відносяться до 2010-2011 років, початок створення ліній. Судячи з наведених в таблиці 3.2 даних, не можна стверджувати, що ген стійкості *Pm,* який захищає Авротіку від збудника борошнистої роси, є домінантним, тому що гібриди не є однорідно-домінантними. Однак не всі вони є однорідно-рецесивними (нестійкими), хоча низка випадків в таблиці 3.2 показує саме такий стан гібридів F_1. І все ж зважаючи на маленькі обсяги вибірок, які формувались тільки з застосуванням однієї рослини лінії для схрещування, не можна стверджувати певно, що ці міні-популяції є однорідними. Тобто головна відмінність від очікуваних результатів – неоднорідність гібридів F_1 від схрещування інтрогресивних ліній, стійких до борошнистої роси, з чутливими сортами пшениці м'якої. В попередньому пункті було показано, що стійкість до збудника втрачається деякими рослинами і не відомо, на якому етапі це відбувається. Беручи до уваги той факт, що залучаючи окрему рослину лінії до гібридизації, автор дослідження завжди переконувався, що бал стійкості такої рослини 9–8. Якщо гібрид такої рослини з сортом м'якої пшениці є нестійким, це означає, що процеси, що призводять до втрати стійкості, відбуваються або у гаметогенезі інтрогресивної лінії, або в онтогенезі гібридної рослини ще до стадії її першої оцінки.

Зробити якесь узагальнення відносно залежності результатів розщеплення гібридів F_1 в залежності від сорту, з яким схрещували інтрогресивну лінію, на наш погляд, зарано. Потрібно ще накопичувати дані. Єдине, що видно вже тепер, використання інтрогресивної лінії у якості батьківського компонента схрещування збільшує появу чутливих рослин серед гібридів F_1. Хоча для сортів Панна і Одеська 267 цей висновок не є повністю правильним.

Практичний висновок з цієї частини полягає в тому, що по-перше, передати стійкий фенотип через гібридизацію лінії може виявитися проблематичним до повної неможливості. І по-друге, гібридні рослини F_1 мають піддаватися індивідуальній ретельній перевірці і отримувати загальний пул насінин F_2 всіх рослин F_1, як це часто робиться за звичайної (не інтрогресивної) гібридизації не можна.

3.2. Пошук генів стійкості до борошнистої роси серед доступних у біологічній базі даних GenBank та порівняння їхніх послідовностей

Пошук послідовностей генів стійкості *Pm* у базі даних GenBank здійснювали, щоб створити праймери та перевіряти за їхньою допомогою батьківські генотипи та створені за їхньою участю популяції, що розщеплюються за дослідною ознакою, на наявність / відсутність послідовностей, притаманних цим генам. Відбирали гени за наступними критеріями: доступність сиквенсу кодувальної ділянки гена, наявність інформації про генний продукт, тип стійкості. В подальшій роботі працювали з послідовностями семи генів: *Pm2, Pm3, Pm4b, Pm8*, *Pm21, Pm24, Pm41*. *Pm2* та *Pm24* мають алелі (*2a-2c* та *24a-24b*, відповідно) та *Pm3* – алельний ряд (*a-j*, *l-r, k*). У випадку останнього гена для частини послідовностей інформація є спірною – чи деповнований сиквенс є новим алелем, чи новосиквенованим, але уже описаним у іншого генотипу. Тому для більшості послідовностей *Pm3* написані порядковані номери без буквенного позначення, як це роблять для різних алелів *Pm*. Відібрані гени мають різне походження (види роду *Triticum*, *Aegilops* та жито посівне) та поширені на хромосомах різних субгеномів пшениці м'якої (табл. 3.3). При позначенні хромосомної локалізації у таблиці спочатку вказано номер хромосоми, потім приналежність до субгеному пшениці та плеча хромосоми, де S – коротке плече, L – довге. Наприклад, *Pm2* локалізований у 5 хромосомі субгеному D, короткому плечі.

Серед генів, які відібрали, для *Pm2*, *Pm3*, *Pm21* знайшли декілька послідовностей, які є або алелями одного гена, або ці сиквенси отримано з різних рослинних зразків, різними лабораторіями. У літературних джерелах [45] для гена *Pm24* зазначають два алелі, однак, доступна лише одна секвенована послідовність, тому провести порівняння послідовностей цих двох алелів не вдалося. Для *Pm2* у GenBank знайшли сім послідовностей. Ген у геном пшениці м'якої перенесений від *Ae. taushii* [37], тому серед послідовностей, які порівнювали було сім сиквенсів (алелі *h, g, i, j, f, e, d*),

Таблиця 3.3

Перелік генів стійкості, які відібрали, та їхні характеристики

Ген	Джерело	Алелі (за наявності)	Хромосомна локалізація	Продукт експресії гена	Стійкість, яку забезпечує ген	Джерело
Pm2	*Aegilops taushii*	*Pm2b, Pm2c, PmLX66, PmW14*	5DS	білок типу NLR	мультирезистентність	[35,37]
Pm3	*Triticum sp.*	*Pm3a-j* та *Pm3l-r Pm3k*	1AS	білки з доменами CC, NB, LRR	расоспецифічна	[51,52]
Pm4b	*Triticum carthlicum*	відсутні	2AL	передбачуваний химерний білок – серин/треонін кіназа з множинними C2-доменами та трансмембранними регіонами	расоспецифічна	[38,53]
Pm8	жито	відсутні	1BL·1RS	внутрішньоклітинний імунний рецептор з доменами NB та LRR	расоспецифічна	[127]
Pm21	6SV *Haynaldia villosa*	є, відсутня номенклатура	6VS·6AL	NBS-LRR	мультирезистентність	[128]
Pm24	Китайський зразок Hulutou	*Pm24a, b*	1DS	тандемна кіназа з передбачуваним кіназо-псевдокіназним доменом WTK3	мультирезистентність	[41,45]
Pm41	*Triticum turgidum* var. *dicoccoides*	відсутні	3BL	NBS-LRR	стійкість на різних стадіях онтогенетичного розвитку	[39,55]

отриманих з рослинного матеріалу цього виду та один з *T. aestivum*. Для *Pm3* у GenBank депоновано послідовності генів, отримані з *Triticum monococcum, Triticum aestivum*, *Triticum turgidum subsp. durum, Triticum dicoccoides*. Під час порівняння до уваги не брали псевдогени, неповні сиквенси. Для послідовності з кодом доступу AY146587.2, ізольованої з *Triticum turgidum subsp. durum*, розміщена нуклеотидна послідовність локусу *Pm3*, включно з мобільними генетичними елементами. При співставленні послідовностей наявність у складі сиквенсу мобільних генетичних елементів не впливатиме на збільшення рівня розбіжностей між послідовностями, оскільки вони вирівняні. Програмне забезпечення, яке використовували, не враховує пробіли (gaps). Для *Pm21* у GenBank розміщено три сиквенси, ізольовані з *Triticum aestivum*, які і використовували. У додатку Б перераховані назви послідовностей з кодами доступів з GenBank з якими працювали.

В межах кожного з генів визначали у програмному забезпеченні GeneDoc [120], які є відмінності між сиквенсами. Для *Pm2*, який кодує білок з N-термінальним кінцем (50-420 нуклеотид), NB-ARC (691-1466 нуклеотид) та протеїнкіназоподібний домен (3176-3743) (PKc-like). Перша кодувальна ділянка найменш варіабельна та має одну транзицію та одну трансверсію. У другій є і інші зміни – одно- (T,G,C), дво- (TT, TG) інсерції / делеції. На відміну від раніше зазначених двох, у регіоні, який кодує подібний за активністю до протеїнкінази домен, є транзиції та трансверсії, розташовані поруч. На рис. 3.1 наведені тільки послідовності, які кодують функціональні домени білків стійкості, некодувальні ділянки пропущені.

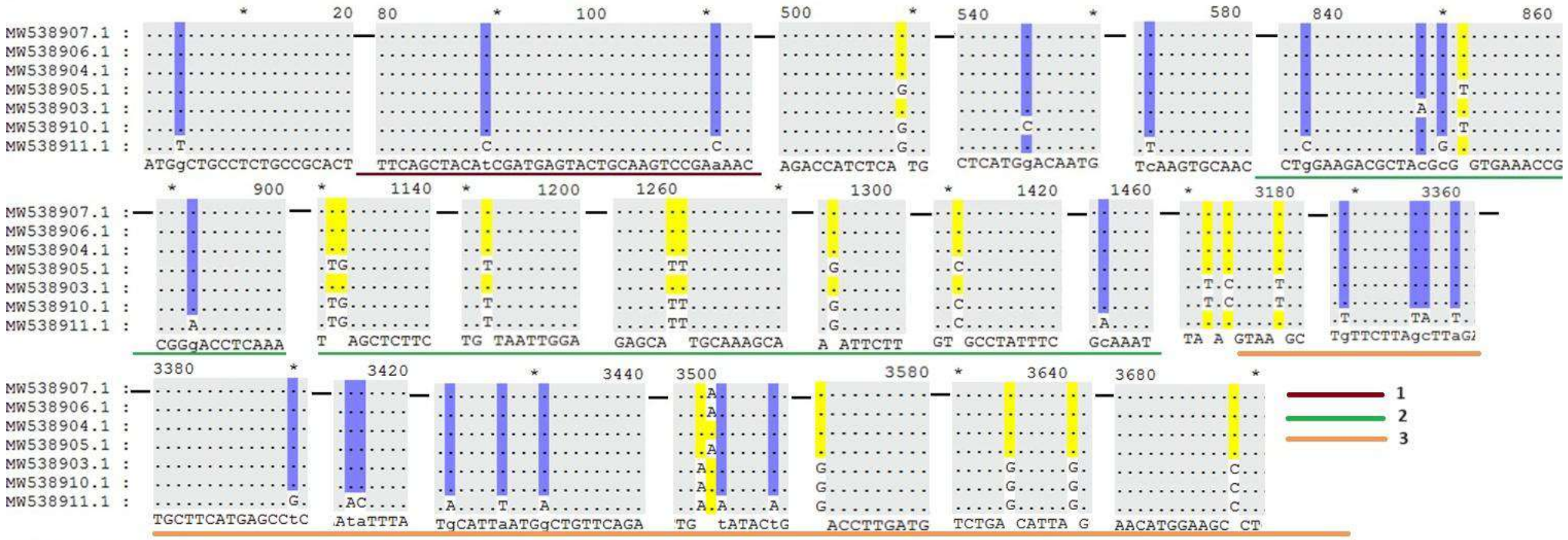


Рис. 3.1. Вирівняні послідовності гена *Pm2* у GeneDoc. Нуклеотидні послідовності, які кодують:

1 – Rx N-термінальну ділянку білка;

2 – NB-ARC;

3 – домен, подібний за активністю до протеїнкінази.

З генами *Pm3* та *Pm21* виявили аналогічні типи відмінностей у нуклеотидних послідовностях. Вирівнювали послідовності гена *Pm3* за допомогою NCBI Multiple Sequence Alignment Viewer [122], версія 1.25.0, оскільки мали 106 сиквенсів і таке вирівнювання більш краще демонструє в яких кодуючих ділянках зосереджені відмінності. Вирівнювання наведено у додатку В. З сиквенсами *Pm3* найбільша кількість змін згрупована у послідовностях, які кодують повтори, багаті на лейцин, особливо у другій ділянці (з близько 2600 до 3700 нуклеотиду) (додаток В). Зміни нуклеотидного складу послідовностей, які кодують LRR, будуть впливати і на амінокислотний склад білків (позначені синіми вертикальними лініями). На рисунку 3.2 наведені кількості поліморфних сайтів для вирівняних послідовностей, деякі з сиквенсів мали на початку послідовності вставки транспозонів, які у визначення відмінностей не включаються, тому на початку графіку є пропуск.

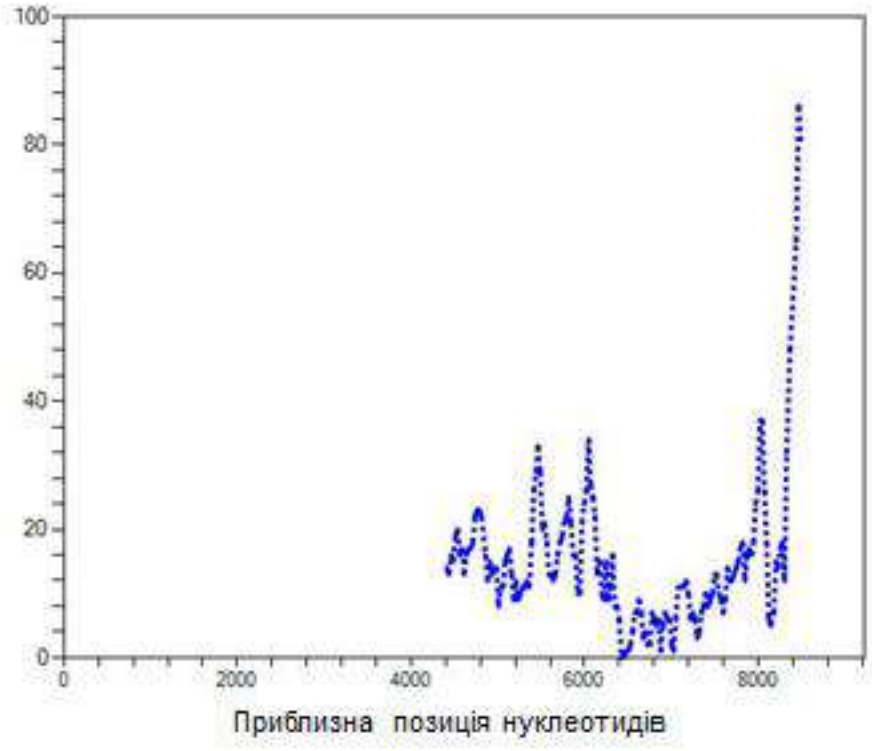


Рис.3.2. Кількості поліморфних сайтів у вирівняних послідовностях гена *Pm3*.

Крім того, що є різні відмінності між послідовностями важливо знати, чи є статистично достовірною ця різниця, щоб далі таку інформацію використовувати для розробки праймерів. За нульову гіпотезу взяли припущення, що розбіжності є випадковими. Якщо припущення підтверджувалося, то в подальшому праймери створювали лише до одного з сиквенсів в межах кожного з генів, вибираючи певні кодувальні ділянки.

Мірою відмінності між сиквенсами слугувало значення критерію D Ф. Тадзіми [125], яке розраховували за допомогою програмного забезпечення DnaSP6 [121], попередньо провівши множинне вирівнювання послідовностей, які співставляли, у CLUSTALW [122], вибирали формат файлу .fasta. У DnaSP6 порівняння послідовностей відбувається методом ковзного вікна (sliding window), яке поступово переміщається по нуклеотидній послідовності. Вікно – це ділянка ДНК певного розміру, в межах якої почергово з певним кроком співставляються нуклеотиди. У нашому випадку розмір вікна – 100 нуклеотидів, крок – 25 нуклеотидів. Місця (сайти) з пропусками не враховуються при розрахунку довжини вікна, всі вікна мають однакову кількість вирівняних («чистих») нуклеотидів. Показники, які розраховуються у кожному вікні. Для послідовностей ДНК визначали кількість поліморфних сайтів (segregating sites, S) та середню кількість нуклеотидних відмінностей, які отримують через попарне порівняння сиквенсів. Показник кількості поліморфних сайтів не сам по собі хорошим показником відмінностей між послідовностями, оскільки залежить від розміру вибірки. Коли розмір вибірки малий значення показників великі, зі збільшенням розміру – показники зменшуються. За допомогою зазначених показників розраховують критерій D, розроблений Ф. Тадзімою [125]. При розрахунку D припускають, що всі поліморфізми є випадково нейтральними, тобто не піддаються добору. D розраховують за формулою:

$$D = \frac{k - \frac{S}{a_n}}{\sqrt{Var(k - \frac{S}{a_n})}}$$, де

k – середнє значення кількості відмінних нуклеотидів на послідовність, S – кількість поліморфних сайтів, a_n – кількість пар порівнянь і та j послідовностей та розраховується як $a_n = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i}$, де n – розмір вибірки (кількість послідовностей, яка порівнюється), i – індекс сумації.

Емпіричні значення критерію Тадзіми D є статистично недостовірними для генів *Pm2* та *Pm3*, тобто розбіжності між послідовностями є випадковими на прийнятому рівні значущості (табл.3.4). Тому для створення праймерів до послідовностей генів брали лише одну послідовність (в межах кожного гена) та далі її використовували.

Таблиця 3.4

Результати порівняння послідовностей генів за критерієм Тадзіми

Назва гена, послідовності якого порівнювалися	*Pm2*	*Pm3*	*Pm21*
Довжина вікна та розмір кроку	100 та 25, відповідно		
Довжина порівнюванюваних послідовностей (кількість сайтів порівняння)	4425	9177	2588
Загальна кількість нуклеотидів (сайтів) порівняння, виключаючи прогалини у послідовностях	4402	4016	2377
Кількість поліморфних сайтів, S	104	622	88
Середнє значення відмінних нуклеотидів, k	43,14	62,39	59,00
Нуклеотидна різноманітність, π	0,009	-1,63	0,02
Критерій Тадзіми, D	0,09**	0,10*	#

Примітки:

1) ** p<0,01
2) * p<0,05
3) # – для розрахунку значення критерію D потрібно 4 або більше послідовностей.

Для *Pm21* критерій Тадзіми не розраховували, оскільки для його використання потрібно мати чотири або більше послідовностей, тому для порівняння сиквенсів послуговувалися критерієм Колмогорова-Смірнова у програмі GeneDoc. Як і в попередньому випадку нульовою гіпотезою було припущення, що відмінності у нуклеотидному вмісті послідовностей є випадковими. Використовували вирівняні сиквенси у CLUSTALW. Критерій забезпечує сувору оцінку (rigorous assessment) відмінностей двох розподілів [129]. Результат порівнянь зображено у вигляді графіка, де червона лінія вказує на відсоток ідентичності між послідовностями. На осі ординат нанесені оцінки вирівнювання або порівняння послідовностей. Вони розподіляються за відсотком ідентичності (вісь абсцис) між парою порівнюваних послідовностей. В нашому випадку було три пари порівнянь (рис. 3.5).

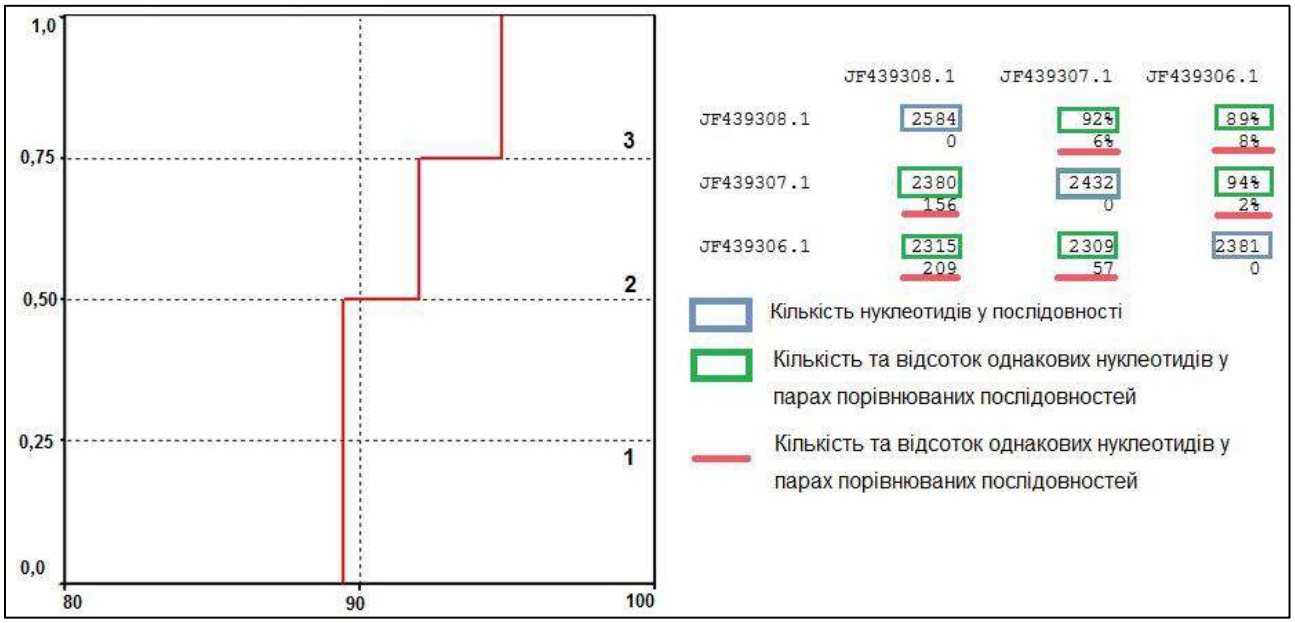


Рис. 3.5. Порівняння послідовностей гена *Pm21*, ізольованих з *Triticum aestivum* сорту Yang Mai 158: JF439308.1 – гена серин / треонінової протеїнкінази Stpk-B (*Stpk-B*); JF439307.1 – гена серин / треонінової протеїнкінази Stpk-D *(Stpk-D)*; JF439306.1 – гена серин / треонінової протеїнкінази Stpk-A *(Stpk-A)*. Цифри (1-3) на графіку з правого боку вказують на пари порівнянь послідовностей.

На графіку пари розташовані у порядку зростання відсотка подібності: перша – *Stpk-B* та *Stpk-A* (89%), *Stpk-B* та *Stpk-D* (92%), *Stpk-D* та *Stpk-A* – 94%. З наближенням червоної ламаної лінії до правої вертикальної осі з позначкою 100, тим більша гомологія. На рівні значущості 0,05 прийняли нульову гіпотезу – розраховані значення критерію менші, ніж критичне 1,36 для критерію Колмогорова-Смірнова, хоч між послідовностями є розбіжності, але вони не є статистично значущими. Емпіричні значення критерію знаходяться в межах від нуля до одиниці. Тобто є ділянки, які регулярно представлені у послідовностях.

В результаті проведених аналізу сиквенсів були розроблені послідовності праймерів за допомогою онлайн-ресурсу Primer3 [123], які обмежують різні ділянки відібраних послідовностей генів стійкості (рис.3.6), які кодують: N-термінальні ділянки білків стійкості, домен з протеїнкіназоподібною активністю (PKc), домен NB-ARC з субдоменами NB, ARC1 та ARC2, багаті на лейцин ділянки (LRR), каталітичний домен серин / треонінових кіназ, споріднених серин/треонінових кіназ (STKc – IRAK), рецептор-асоційованих кіназ інтерлейкіну-1. Послідовності праймерів наведені у розділі 2.3.4. Результати, наведені у цьому підрозділі опубліковані в [130].

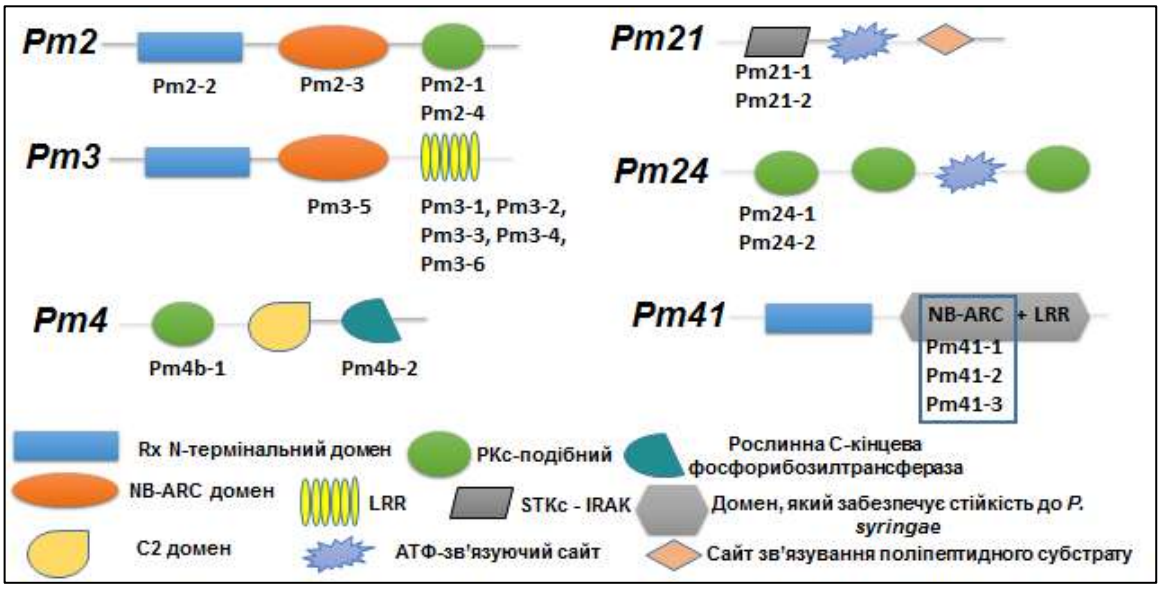


Рис. 3.6. Структура генів стійкості, за доменами білків, які вони кодують, та перелік назв праймерів до цих ділянок генів.

Послідовності генів *Pm2*, *Pm3*, *Pm21* мають декілька послідовностей у GenBank, які хоч і мають відмінності (транзиції та трансверсії, інсерції / делеції у різних ділянках), проте такі відмінності не є статистично значущими. Така перевірка дозволила використовувати лише одну послідовність в межах кожного з генів для створення праймерів. До регіонів, які кодують домени, пов'язані зі стійкістю, за допомогою Primer3 розробили 20 пар праймерів до різних ділянок генів *Pm*. Праймери створені до кодувальних частин генів. Для частини праймерів, коли вони поєднуються у комбінації, то можуть захоплюватися і некодувальні ділянки. Такі комбінації все одно лишали, щоб потім їх використовувати для вивчення рослинного матеріалу. По-перше, некодувальні ділянки генів частіше піддаються змінам, порівняно з кодувальними, це може бути додатковим джерелом мінливості, наприклад утворюватимуться різні транскрипти з однієї і тієї ж послідовності ДНК через альтернативний сплайсинг. По-друге, за допомогою секвенування можна визначити якими змінами у послідовностях забезпечена різниця у ампліфікації між генотипами з контрастним проявом ознаки. По-третє, їхнє використання закладає можливість подальшого вивчення гібридів з інтрогресіями уже на рівні транскриптів.

3.3. Порівняння генотипів за структурою послідовностей, характерних для генів стійкості

Сорти пшениці м'якої, гексаплоїдні лінії-похідні амфідиплоїдів Авротіка, Авродес, Аврозис та Авролата були вихідними генотипами при створенні популяцій, які розщеплюються за дослідною ознакою, тому перевіряли їх та самі амфідиплоїди з комбінаціями праймерів до консервативних послідовностей генів стійкості. Для пошуку нуклеотидних послідовностей інтересу використовували два підходи: вивчення рослинного матеріалу за допомогою праймерів, які фланкують відомі (конкретні) послідовності генів *Pm*, та шляхом поєднання у пари праймерів, які фланкують консервативні

ділянки генів стійкості до різних патогенів (цист нематод, *P. syringae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). Для другого підходу послуговувалися методикою поліморфізму аналогів генів стійкості (**R**esistance **G**ene **A**nalog **P**olymorphism, RGAP), розробленої Ченом та співавторами [115]. Аналогами (Resistance gene analog, RGA) називають послідовності, які можуть бути потенційними генами стійкості через наявність у них ділянок, які кодують консервативні домени білків резистентності. Наявність RGA визначають через повногеномне секвенування та аналіз структури геному з передбаченням кодувальних частин генів та їхніх продуктів, їхнього функціонального призначення [132].

З використанням двох підходів для аналізу послідовностей генів *R* аналізували спочатку батьківські генотипи, щоб з використанням отриманих результатів відібрати комбінації праймерів, які б забезпечували різницю у спектрах між батьками з контрастним фенотипом. Джерелом стійкості є амфідиплоїд, від якого за допомогою інтрогресивних ліній відбувається перенесення бажаної ознаки до сортів, то порівнювали і молекулярний фенотип, отриманий з використанням праймерів, між амфідиплоїдом та його лініями-похідними. За допомогою Авротіки отримано серію інтрогресивних ліній (серія «tica») та більшість рослинного матеріалу гібридного походження. Більша кількість ліній дозволить прослідкувати передачу хроматину від стійкого амфідиплоїда. У випадку Аврозису, Авродесу та Авролати для створення гібридних популяцій використовували по одній-дві лінії, залежно від амфідиплоїда. Також лінії tica відносно нещодавно створені [109], що дозволяє ідентифікувати більше генетичне різноманіття, порівняно з похідними інших амфідиплоїдів, які отримані в минулому столітті [цит. за 108]. Тому при відборі молекулярних маркерів для вивчення популяцій, які розщеплюються, перш за все аналізували генотипи, пов’язані з Авротікою. Для роботи було сформовано дві групи порівнянь. В першу входили Авротіка та сорти, в другу – Авротіка та її інтрогресивні лінії. Відбір придатних молекулярних маркерів з використанням інших амфідиплоїдів та їхніх ліній-похідних не проводили.

3.3.1. Співставлення спектрів, отриманих з праймерами до генів *Pm.*

За допомогою праймерів до *Pm* ідентифікували різні регіони *Pm2, Pm3, Pm4b*, *Pm21, Pm41*, але не з усіма генотипами. Не виявили у дослідних геномах послідовностей, характерних для *Pm24*. У Авротіки ідентифікували тільки послідовності *Pm3*, за винятком одного з регіонів, який кодує багаті на лейцин повтори (з парою праймерів Pm3-6). Під час аналізу сортів пшениці м'якої та ліній Авротіки спостерігали поліморфізм лише за мінорними компонентами спектру у деяких випадках – мінорний компонент мав більшу або меншу рухливість, порівняно з основним, або продукт з певним генотипом був відсутній.

Послідовності, притаманні для *Pm2*, у дослідних сортів пшениці м'якої не завжди є. З комбінацією Pm2-2 електрофоретичні спектри різних генотипів відрізнялися як за мінорними компонентами, так і за мажорним (у таблиці це компонент під номером 2) (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру з праймерами до *Pm2*

Дослідні генотипи	Комбінації праймерів				
	Pm2-2			Pm2-3	Pm2-4
	Номер компоненту електрофоретичного спектру				
	1	2	3	1	1
Авротіка	0	0	0	0	0
Аврора	1	1	1	1	1
Тіра	1	1	1	0	1
Панна	1	1	0	1	0
Лелека	1	1	1	0	0
Одеська 267	0	0	0	0	0
Селянка	0	0	0	0	0
Вдала	0	0	0	0	0
Ніконія	0	0	0	0	0

Основний компонент відсутній під час ампліфікації з ДНК сорту Одеська 267, Селянка, Вдала та Ніконія. Амплікони з іншими парами праймерів можна

охарактеризувати тільки за наявністю або відсутністю єдиного компонента. У геном пшениці *Pm2* перенесений від *Ae. taushii*, який є донором субгеному D, тому очікували виявити цей ген у складі пшеничних геномів. Відсутня ампліфікація з ДНК амфідиплоїда Авротіка з усіма праймерами. Амфідиплоїд походить від пшениці сорту Аврора, яка за нашими результатами, має послідовності гена у складі геному, але її субгеном D замінений на T геном *Amblyopirum muticum*, що могло і вплинути на результат ампліфікації.

З комбінаціями до різних частин гена *Pm3* отримано продукти ампліфікації з усіма генотипами. З Pm3-1, Pm3-2, Pm3-3, Pm3-4 у випадку всіх сортів пшениці м'якої наявний лише один компонент у спектрі, в межах кожної з пар сорти не розрізняються (рис. 3.5). З ДНК Авротіки тільки з Pm3-5 не вдалося отримати продукту ампліфікації (рис. 3.5А). Використання праймерів Pm3-5 дозволило ідентифікувати поліморфізм за фрагментом меншої молекулярної маси, який є у Аврори, проте відсутній у решти сортів, з ДНК амфідиплоїда спостерігали нуль-алель за дослідною послідовністю. Оскільки з Авротікою не було отримано продукту, з ДНК ліній амфідиплоїду ампліфікацію не проводили. З Pm3-1, Pm3-2, Pm3-4 поліморфізму між інтрогресивними лініями та Авротікою не спостерігали, наведений приклад на рис. 3.5 В. Крім того, послідовності, ампліфіковані з Pm3-1 та Pm3-2 мають однакову рухливість у електрофоретичному полі. В той же час зі згаданими генотипами та Pm3-3 є поліморфізм за мінорними компонентами спектру, які є більш рухливими у електричному полі (tica1007, tica1075 (2018), tica1075 (2021), tica1084, tica1130, tica1187, tica1089, tica1094), що відрізняє зазначені лінії від амфідиплоїду та сорту Аврора. Ця комбінація фланкує одну з ділянок гена, яка кодує багаті на лейцин повтори, які вважають найбільш варіабельними частинами білків стійкості, в чому ми теж переконались під час порівняння різних сиквенсів гена *Pm3*. Є різниця у спектрі із Pm3-3 всередині ліній tica1063 та tica1075 за мінорним компонентом, оскільки аналізували їхню ДНК, виділену із зерен вихідного матеріалу та генерації, отриманих у 2018 році та 2021, відповідно (рис. 3.3 Г). Для ДНК tica1075 (2018) спостерігали відсутність ампліфікації. З

ДНК сортів ідентифікований один мажорний компонент та декілька важчих, які при більш тривалому розділенні не спостерігали.

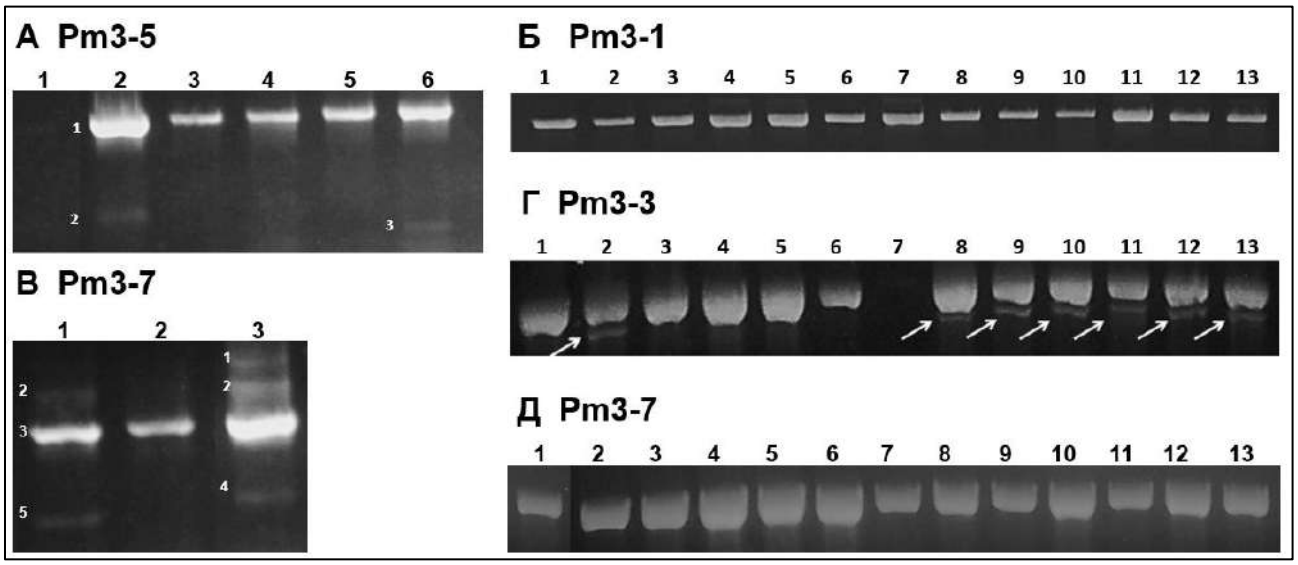


Рис. 3.5. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації з праймерами до генів стійкості. А, В: 1 – Авротіка; 2 – Аврора; 3 – Тіра; 4 – Панна; 5 – Лелека; 6 – Одеська 267. Б, Г, Д: 1 – Авротіка; 2 – tica1007; 3 – tica1049; 4 – tica1058; 5 – tica1063/1 (2018); 6 – tica1063 (2021); 7 – tica1075 (2018); 8 – tica1075 (2021); 9 – tica1084; 10 – tica1130; 11 – tica1187; 12 – tica1089; 13 – tica1094.

За спектрами, отриманими з Pm3-7, Аврора та Авротіка не розрізняються, але це робить їх відмінними від низки ліній, для яких ідентифіковано один важчий компонент (tica1187), або два (tica1049, tica1058, tica1063 (2021), tica1075) (див. рис. 3.5 Д). Знову ж за важчим компонентом є різниця між лініями tica1063 та tica1075 різних генерацій. Також за мінорними компоненти вдалося розрізнити генотипи амфідиплоїда, Тіри та Аврори. Останній сорт має лише один компонент у спектрі. За фрагментами з меншою молекулярною масою, відносно мажорного, розрізняються Тіра та Авротіка (див. рис. 3.5 В).

З комбінацією праймерів Pm4b-1 у сорту Тіра, порівняно з Авророю, яка має один компонент у спектрі, отримано два додаткові амплікони з меншою молекулярною масою. З ДНК решти генотипів ампліфікація не відбулася.

Праймери фланкують частину гена, яка кодує домен, подібний за активністю до протеїнкінази. До іншої частини гена, яка кодує С-кінцеву фосфорибозилтрансферазу рослин, розроблені праймери не гібридизувалися або ця ділянка зазнала змін у генотипів, які аналізували, порівняно з послідовністю у базі даних GenBank. З послідовності гена *Pm4* можуть утворюватися два сплайс-варіанти, з яких синтезуватимуться дві ізоформи (Pm4b-V1 та Pm4b-V2) з різною кількістю амінокислот (560 та 747, відповідно). Ген забезпечує расоспецифічну стійкість, для розвитку якої потрібні обидві ізоформи [78].

Для пошуку гена *Pm21* у геномах використовували дві комбінації. З однією з них (Pm21-1) вдалося ідентифікувати 3 фрагменти з різною рухливістю лише з ДНК сорту Аврора. З ДНК решти сортів успіху не було. З другою комбінацією праймерів продуктів ампліфікації, придатних для аналізу не отримано. Послідовності гена *Pm24* не ідентифікували. Ген секвенований з китайського місцевого зразка (landrace) Hulutou, не був перенесений від інших видів під час створення сорту, культивування [45], тому *Pm24* може і не бути у сортів європейської частини континенту або його послідовність, до якої створені праймери, зазнала змін. З праймерами, які фланкують кодувальну частину NB-ARC домену білка у складі гена *Pm41*, не отримано інформації про структуру цих ділянок у дослідних генотипів.

Якщо ампліфікації не відбувалося з ДНК амфідиплоїда Авротіка, то ПЛР не проводили з ДНК ліній з інтрогресіями. Джерелом послідовностей, які забезпечують стійкість є амфідиплоїд, за допомогою інтрогресивних ліній відбувається передача цих послідовностей до сортів пшениці м’якої, які культивують. Проте припущення про невикористання праймерів може бути хибним через ймовірні перебудови, які відбуваються у гібридних геномах. В результаті таких перебудов можуть виникати нові послідовності, пов’язані зі стійкістю, при цьому таких послідовностей може і не бути у резистентного батька. Найбільш варіабельними серед досліджених є послідовності гена *Pm2*, які кодують Rx N-термінальний (комбінація праймерів Pm2-2),

протеїнкіназоподібний домени (Pm2-4). За результатами біоінформатичного аналізу перша кодувальна ділянка серед решти у *Pm2* є найменш варіабельною, що не узгоджується з отриманими результатами ампліфікації. *Pm3* варіює за послідовностями, які кодують одні з повторів, багатих на лейцин. З комбінацією Pm3-5 у складі геному Авротіки не виявили кодувальних Rx N-термінальний домен та частину NB-ARC. Решту послідовностей *Pm3,* до яких створювали праймери, у сортів виявили, але продукт ампліфікації є мономорфним.

3.3.2. Аналіз генотипів з використанням методики поліморфізму аналогів генів стійкості. Використання методики поліморфізму аналогів генів стійкості (RGAP) дозволяє отримувати поліморфні багатокомпонентні спектри з праймерами до послідовностей, які пов’язують зі стійкістю до різних патогенів у рослин, не обов’язково до борошнистої роси. Гени стійкості мають консервативні ділянки, представленість яких в одному гені, так нуклеотидний склад, якщо така ділянка є в гені, можуть варіювати. Крім того, стійкість до патогенів різного таксономічного походження можуть забезпечувати одні і ті ж послідовності. Рослинний матеріал, який вивчаємо, добираємо за здатністю чи ні розвивати імунну відповідь при взаємодії зі збудником борошнистої роси, тому ідентифіковані послідовності можуть бути пов’язані зі стійкістю до зазначеного патогену. В одну комбінацію можуть входити праймери, які фланкують різні кодувальні послідовності, одночасно два ліві або два праві праймери, праймери, створені до різних генів. В цьому випадку додатковим етапом був підбір температури гібридизації праймерів з матрицею за допомогою градієнтної ПЛР, використання Touchdown ПЛР для підвищення специфічності ампліфікації. Другий підхід використовували, коли компоненти спектру були дифузними. Отримали 31 пару праймерів, при цьому не використовували лише один праймер з вдвічі більшою кількістю в ПЛР-суміші, що теж є можливим для цієї методики. Інформацію про частину послідовностей праймерів взято із літературних джерел [115-118], частина була створена у лабораторії раніше [112]. Праймери фланкують послідовності, які кодують

повтори, багаті на лейцин, різні частини кіназного домену, домену зв'язування нуклеотидів. Один з праймерів створений до послідовності, яка кодує карбокситермінальний кінець ARC2 (частина АТФази NB-ARC), який є висококонсервативною ділянкою з метіоніну, гістидину та аспартату (methionine-histidine-aspartate, MHD) [132] (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Характеристика праймерів, використаних у роботі

Праймер	Домен білка	Ген стійкості	Стійкість до патогену	Хазяїн	Джерело
RLRR rev	LRR	*Rps2*	*Pseudomonas syringae*	*Arabidopsis*	[115]
RLRR for					
Cre3Lr-F		*Cre3*	цисти нематод	*Triticum aestivum*	[116]
XLRR rev		*Xa21*	*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*	*Oryza sativa*	[116]
Cre3-k3	Кіназа 3	*Cre3*	цисти нематод	*Triticum aestivum*	[117]
Cre3 P-loop	P-loop (петля)				[118]
Pm8-LRR-L	LRR	*Pm8*	*Bgt*		[112]
Pm8-LRR-R	LRR				
Pm8-MHD-L	MHD				

Використані праймери, фланкують різні кодувальні послідовності генів стійкості до *Pseudomonas syringae*, цист нематод, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, збудника борошнистої роси. Ген *Cre3*, картованоий на дистальній ділянці довгого плеча хромосоми 2D пшениці та кодує цитоплазматичний рецептор типу NBS-LRR [133]. Ті комбінації, які давали успішну ампліфікації у випадку методики RGAP, наведені у таблиці 3.7 та їхні послідовності у розділі 2.3.4, як і комбінації праймерів до генів стійкості *Pm*.

Таблиця 3.7

Перелік комбінацій праймерів та їхніх температур гібридизації з ДНК-матрицею

№ з/п	Комбінації праймерів	$t_{гібр.}$	№ з/п	Комбінації праймерів	$t_{гібр.}$
1	Pm8-LRR-R + Pm8-LRR-L	58,4, TD-ПЛР	14	Pm8-LRR-L + RLRRrev	54,2
2	Pm8-LRR-R + Pm8-MHD-L	56,7	15	Pm8-LRR-R +Cre3k3	57
3	Cre3k3 + Cre3Lr-F	54,2	16	Pm8-LRR-R + Cre3-P-loop	53,7
4	RLRRrev + Cre3_P-loop	54,2	17	Pm8-LRR-R + XLRRrev	53,7
5	RLRRfor + Cre3_P-loop	53,7	18	Cre3k3 + Pm8-MHD-L	53,7
6	RLRRrev + XLRRrev	53,7	19	Cre3k3 + XLRRrev	53,7
7	Cre3LrF + XLRRrev	53,7	20	Cre3LrF +Pm8-MHD-L	61,4
8	Cre3LrF + Cre3_P-loop	53,7	21	Cre3LrF + Cre3_P-loop	60,8
9	Cre3k3 + Cre3_P-loop	56,7	22	Pm8-LRR-R + Pm8-MHD-L	59,9
10	Cre3k3 + XLRRrev	56,7	23	RLRRfor + XLRRrev	56,7
11	Pm8-LRR-R + Cre3-Lr-F	53,7	24	Cre3k3 + RLRRfor	56,7
12	RLRRrev + RLRRfor	53,7	25	Pm8-LRR-L + XLRRrev	56,7
13	RLRRrev + Cre3Lr-F	58,4			

Примітки:

1) $t_{гібр.}$ – температура гібридизації праймерів з ДНК-марицею;

2) TD-ПЛР – Touch-down ПЛР.

Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації, отриманих за методикою RGAP, є більш різноманітними, тому для зручності компоненти характеризували за двійковою системою: «1» – наявний компонент, «0» – відсутній. Різниця між генотипами була у варіації за присутністю / відсутністю конкретних ампліфікованих фрагментів. Попарне співставлення спектрів, отриманих з ДНК стійких та уражених генотипів, дозволить шукати зв’язок між електрофоретичним спектром та проявом ознаки на рівні організму, щоб

використовувати в подальшому цю інформацію для аналізу гібридів, створених за участі рослин з контрастним фенотипом.

Отримали електрофоретичні спектри, придатні для аналізу, з 25 парами праймерів. За деякими фрагментами спектри могли бути мономорфними, за іншими – полімофними, за якими можна віддиференціювати контрастні за ознакою інтересу генотипи. Для зручності сформували два блоки. До складу першого входили Авротіка та всі її інтрогресивні лінії-похідні, другого – Авротіка та всі сорти-учасники схрещувань. В межах кожного з блоків проводили попарні порівняння спектрів кожного зі зразків з Авротікою, оскільки саме вона є джерелом послідовностей, які забезпечують її стійкістю до гриба, і які намагаємося передати за допомогою ліній у геноми сортів. Аврору до складу другої групи не включали, оскільки хоч вона є і батьком для ліній, але вражається патогеном.

Амфідиплоїд містить тетракомпонент від сорту Аврора, тому можна прослідкувати, чи відбуваються зміни у геномах А та В після заміщення субгеному гексаплоїдної пшениці D на Т від дикорослого диплоїда *Am. muticum*. Тому очікували отримати подібність між спектрами Авротіки та Аврори. З комбінаціями праймерів Cre3LrF + XLRRrev, Cre3k3 + XLRRrev, Pm8-LRR-L + XLRRrev, Cre3k3 + Cre3_P-loop, RLRRrev + RLRRfor, RLRRrev + Cre3_P-loop, Cre3k3 + RLRRfor різниця між згаданими генотипами є у відсутності деяких ампліконів, за рештою – спектри мономорфні. На рисунку 3.6 наведені приклади таких спектрів. Частина номерів компонентів спектру пропущена через те, що робили наскрізну нумерація для компонентів всіх дослідних генотипів, а на рис.3.6 наведені тільки два.

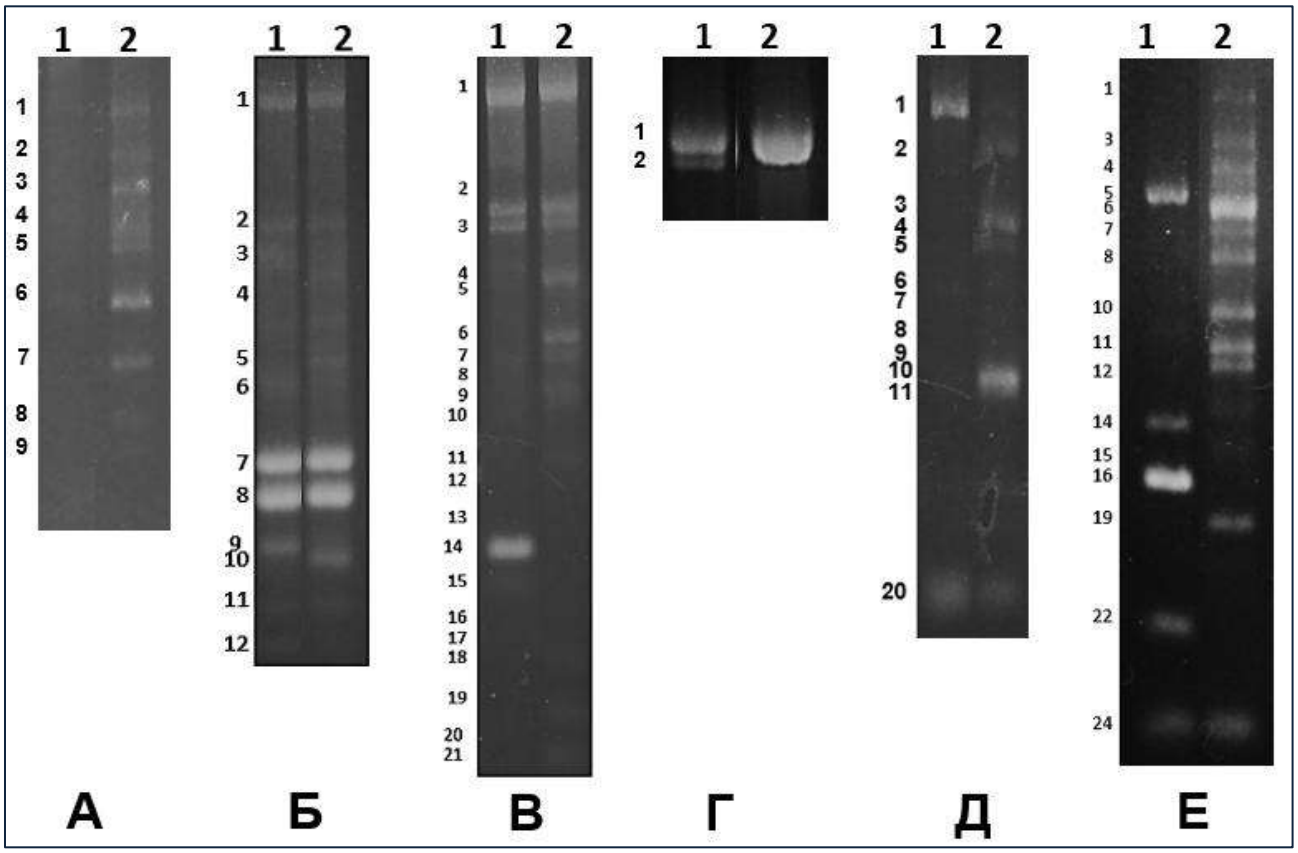


Рис. 3.6. Розділення продуктів ампліфікації з комбінаціями праймерів Cre3LrF + XLRRrev (А), Cre3k3 + XLRRrev (Б), Pm8-LRR-L + XLRRrev (В), Cre3k3 + Cre3_P-loop (Г), RLRRrev +Cre3_P-loop (Д), Cre3k3 + RLRRfor (Е) та ДНК Авротіки (1) та Аврори (2).

Перелічені комбінації праймерів створені до послідовностей, які кодують повтори багаті на лейцин (у назві праймерів є LRR), кіназні домени (Cre3) з висококонсервативною Р-петлею (P-loop). Серед зазначених праймерів тільки Pm8-LRR-L створений до послідовностей гена стійкості до борошнистої роси *Pm8*. За ділянками гена *Pm8*, які обмежують Pm8-LRR-R + Pm8-MHD-L, Авротіка та Аврора не відрізняються. З Pm8-LRR-L + XLRRrev у амфідиплоїда менша кількість ампліфікованих послідовностей, ніж з ДНК сорту, є три фрагменти з однаковою рухливістю, які, ймовірно, походять від Аврори, а не від *A. muticum*. RLRRfor + Cre3_P-loop – Аврора має нуль-алель, порівняно з амфідиплоїдом. З комбінаціями праймерів Pm8-LRR-R +Cre3k3, Cre3k3 + Pm8-MHD-L, Pm8-LRR-R + Cre3-Lr-F, Cre3k3 + XLRRrev, Cre3LrF +Pm8-MHD-L, RLRRfor + XLRRrev, Pm8-LRR-L + RLRRrev Аврора має нуль-алелі, порівняно

з Авротікою. Описані випадки наведені на рис.3.7. З ДНК Авротіки та Cre3LrF+Cre3_P-loop не відбулася ампліфікація, однак, в геномах Аврори та всіх дослідних ліній є послідовності, котрі фланкували праймери. Відрізняються електрофоретичні спектри як сорту та ліній, так і ліній між собою. Можна припустити, що виявили послідовності сорту Аврора у складі ДНК ліній, проте така ДНК зазнала змін в результаті інтрогресивної гібридизації і може бути результатом перебудов.

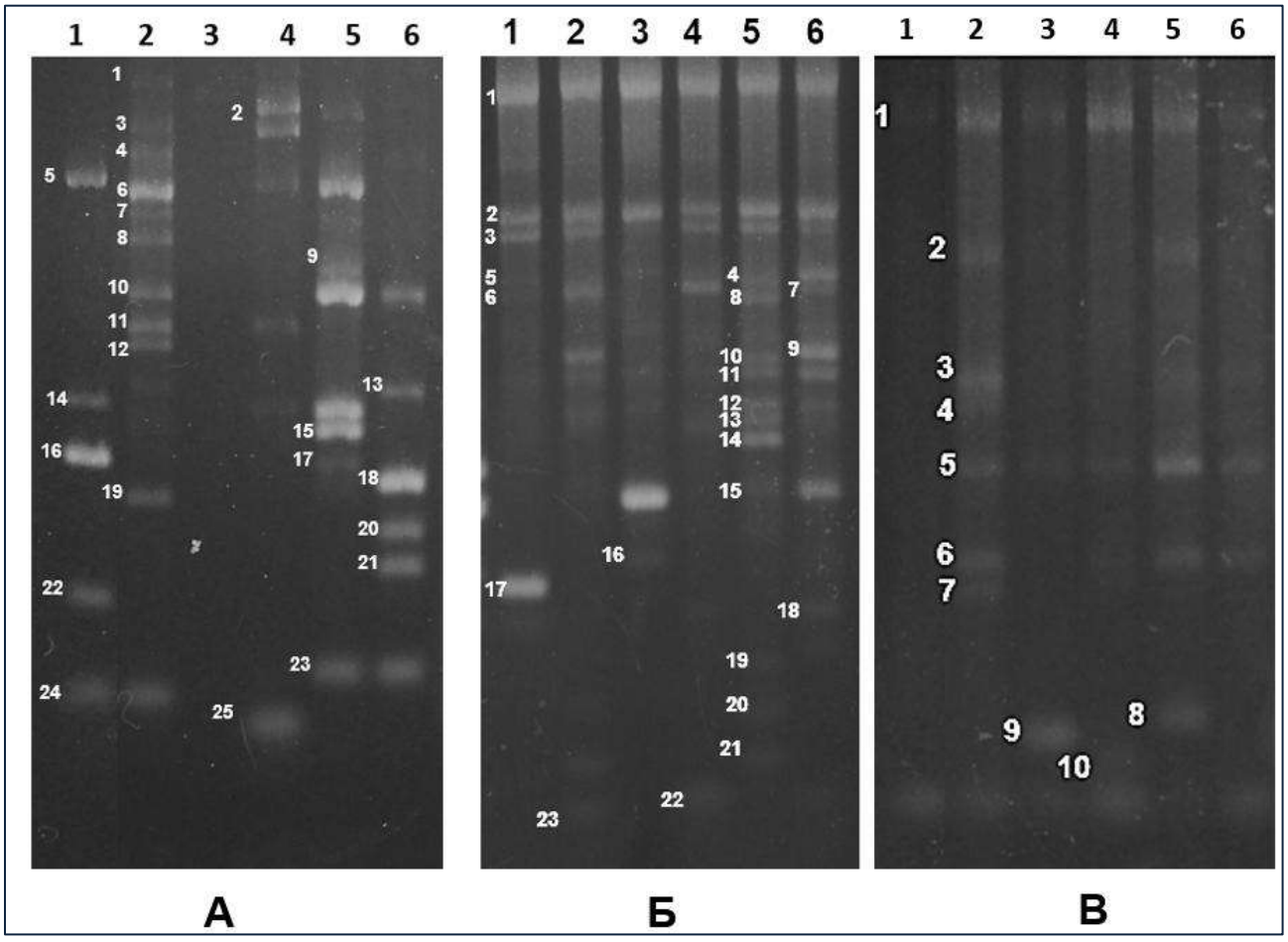


Рис. 3.7. Розділення продуктів з комбінаціями праймерів Cre3k3 + RLRRfor (А), Pm8-LRR-L + XLRRrev (Б), RLRRfor + XLRRrev (В) та ДНК Авротіки (1) та сортів пшениці м’якої (2 – Аврори; 3 – Тіри; 4 – Панни; 5 – Лелеки; 6 – Одеської 276).

Спектри Авротіки та інтрогресивних ліній порівнювали за ампліконами, отриманими з 14 комбінаціями праймерів з 25, решта – були

неінформативними. Неінформативними вважали спектри, коли при порівнянні Авротіки та Аврори для першої відсутні компоненти («0»), коли їх множини характеризувати за системою «0 / 1». Інтрогресивні лінії мали більшу представленість ампліконів та їхню варіабельність (є / немає). Ймовірно, такі спостереження пов'язані з різною кількістю хроматину, який інтрогресивні лінії отримали від геному Т Авротіки. Наявність інтрогресій могла викликати нестабільність геномів ліній по крайній мірі за послідовностями, за якими спостерігали. Проте така нестабільність не впливає на прояв ознаки, оскільки стійкими є що Авротіка, що її похідні. Для деяких інтрогресивних ліній були випадки відсутності ампліфікації з певними комбінаціями (табл.3.8). Набільш частою така ситуація є для tica1049. У пари були поєднані праймери до ділянок, які кодують повтори, багаті на лейцин, різні частини кіназного домену продукта гену *Cre3*.

Таблиця 3.8

Інтрогресивні лінії та комбінації праймерів з якими відсутня ампліфікація

№ з/п	Інтрогресивні лінії	Використані комбінації праймерів
1	tica1049, tica1094	RLRRrev + XLRRrev
2	tica1049, tica1058 та tica1094	Cre3k3 + XLRRrev
3	tica1063 (2018, 2021), tica1089 та tica1094	Cre3k3 + Cre3Lr-F
4	tica1049	Cre3Lr-F + XLRRrev
5	tica1187	Cre3k3 + Cre3_P-loop
6	tica1049, tica1094	Cre3k3 + XLRRrev

Випадки 2-3 є спільними з амфідиплоїдом, в якого теж не утворювалося продукту в результаті ампліфікації. Серед 14 використаних комбінацій для скринування генотипів ліній та амфідиплоїду з трьома (Pm8-LRR-R + Pm8-LRR-L, Cre3k3 + XLRRrev, Cre3k3 + Cre3Lr-F) вони є однаковими у відсутності успішної ампліфікації. При цьому зі згаданими праймерами виявляли ділянки, які вони фланкують у складі чутливих генотипів. Результати розділення ампліконів, переведені у двійкову систему винесені у додаток Г.

Сорти пшениці м’якої однозначно відрізняються від амфідиплоїда Авротіка за ампліфікацією з комбінаціями Cre3LrF + Cre3_P-loop, Pm8-LRR-R + Cre3-Lr-F, Cre3LrF +Pm8-MHD-L, Cre3LrF + XLRRrev, оскільки з ДНК амфідиплоїда відсутня ампліфікація. Проте така ситуація є неінформативною для аналізу гібридних популяцій, які можуть мати їхній генетичний матеріал, тому що складно з’ясувати походження таких послідовностей у контрастних за фенотипом батьків. Цікавить передача послідовностей від резистентної Авротіки і буде складно прослідкувати зв’язок між резистентною рослиною та відсутнім компонентом спектру. Авротіку та сорти одеської селекції за переведеними у двійкову систему спектрами можна відрізнити за парами праймерів: RLRRrev + Cre3_P-loop, Cre3LrF + XLRRrev, Pm8-LRR-L + RLRRrev, Pm8-LRR-R + Cre3LrF, Cre3k3 + RLRRfor, Pm8-LRR-L + XLRRrev, RLRRfor + XLRRrev. Приклади таких спектрів наведені на рисунку 3.7, решта результатів внесені у таблиці та розміщені у додатку Д. Генотипи поліморфні лише за одним ампліконом з парами Cre3LrF + Cre3_P-loop, RLRRfor + Cre3_P-loop, RLRRrev + RLRRfor, Cre3k3 + Cre3_P-loop, Pm8-LRR-R + Pm8-MHD-L, коли відсутність компонента переважно характеризувала Авротіку. Амплікони сортів та амфідиплоїду з праймерами Cre3LrF + Cre3_P-loop не відрізняються, електрофоретичні спектри характеризуються лише одним компонентом. З комбінацією Cre3k3 + Pm8-MHD-L продукт є тільки з ДНК Авротіки (два компоненти) та сорт Панна має один компонент з більшою рухливістю, за всіма ампліконами ці два генотипи відрізняються.

Для праймерів, які створені до послідовностей, які кодують LRR, компоненти у електрофоретичних спектрах розташовуються блоками, коли декілька продуктів ампліфікації з подібною рухливістю розташовані поруч. Якщо такий блок присутній, то в його межах може бути варіювання за представленістю компонентів у спектрі. Наприклад, з комбінацією праймерів RLRRrev + XLRRrev та ДНК ліній та амфідиплоїда перший блок утворюють компоненти 1-6, другий – 7-9, третій – 10-14 (рис. 3.8). З ДНК всіх ліній, за винятком лінії tica1063 (2021) (продукт відсутній), спектр мономорфний. Ще з

генотипами ліній, амфідиплоїда та Cre3LrF + XLRRrev, Cre3k3 + Cre3LrF, ДНК сортів та Pm8-LRR-L + Cre3k3 було подібне розташування. З Cre3k3 + XLRRrev, як з ДНК сортів, так і з амфідиплоїдом та лініями спостерігали розташування ампліконів блоками.

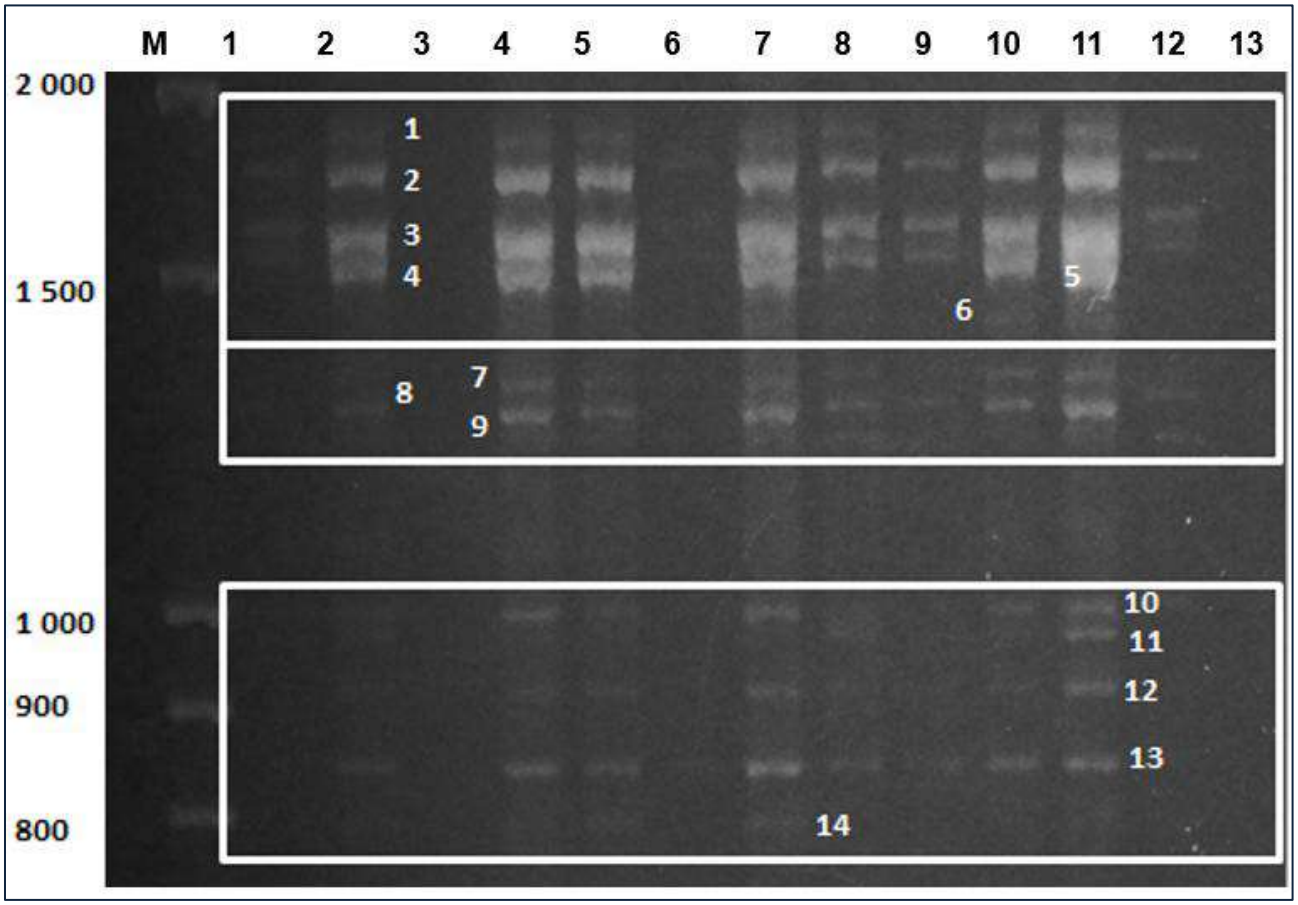


Рис. 3.8. Електрофоретичні спектри ампліконів, отриманих з комбінацією праймерів RLRRrev + XLRRrev та ДНК Авротіки (1) та інтрогресивних ліній (2– tica1007, 3 – tica1049, 4 – tica1058, 5 – tica1063 (2018), 6 – tica1063 (2021), 7 – tica1075 (2018), 8 – tica1075 (2021), 9 – tica1084, 10 – tica1130, 11 – tica1187, 12 – tica1089, 13 – tica1094). M – маркер молекулярних мас 100bp DNA Ladder (Solis Biodyne).

Різні родини генів групи NBS-LRR згруповані у кластери через сегментну або тандемну дуплікацію [134,135], різні ділянки, які кодують LRR розташовані одна за одною поміж некодуючими частинами, наприклад як у гена *Pm3*, який має дві такі ділянки різної довжини, розташовані ближче до 3’-кінця. В межах

таких кодуючих ділянок можливе варіювання за їх нуклеотидним складом (див. рис.3.1). Гени NBS-LRR нерівномірно розподілені по геномах через дуплікацію або транслокацію цілих хромосомних сегментів (сегментна дуплікація), а не через малі за розмірами події ектопічної дуплікації [136]. Гени різних класів, розташовані у одному кластері можуть забезпечувати розпізнавання одного виду патогену. Гени стійкості до різних патогенів можуть мати подібний нуклеотидний склад, тому за методикою RGAP чітко не можемо сказати, що отримали амплікони з послідовностями, які забезпечують стійкість саме до борошнистої роси.

В деяких випадках стійкі генотипи не мали продуктів ампліфікації з низкою комбінацій праймерів, при цьому чутливі до *Bgt* сорти мали. Між продуктами генів стійкості можлива взаємодія на рівні білків, наприклад це описано для продуктів різних функціональних алелів *Pm3* між собою та при їх взаємодії з білком Pm8. Згадані гени є паралогами, *Pm8* інтрогресований з жита посівного [16,51], *Pm3* – пшеничний. Така взаємодія призводить до втрати активності білків стійкості через утворення нефункціональних комплексів і рослина може бути сприйнятливою до патогену, маючи функціональні гени стійкості. Тому спробуємо присутити, що стійкість Авротіки чи її ліній-похідних може виникати не тільки через інтрогресії, які мали гени стійкості, але і через втрату їхніх послідовностей, або через комбінування цих двох явищ.

Маючи праймери до консервативних послідовностей генів стійкості, наприклад, створені нами, під час дослідження, можна спробувати їх поєднувати у нові комбінації за принципом RGAP, що може бути продовженням роботи та розширенням кількості молекулярних маркерів на основі ПЛР. Дослідження рослинного матеріалу з використанням методики RGAP дає більше інформації про представленість ділянок у геномі, які можуть бути задіяними у розвиток стійкості, оскільки електрофоретичні спектри є поліморфними та можна відслідковувати зміни цих послідовностей у контрастних за ознакою фенотипів. За порівняннями генотипів, проведеними за методикою RGAP, для подальшого скринування популяцій, які

розщеплюються, за поліморфністю та багатокомпонентністю спектрів можна відібрати 14 комбінацій праймерів: Pm8-LRR-L + Cre3k3, Cre3k3 + RLRRfor, Cre3k3 + XLRRrev, Pm8-LRR-L + XLRRrev, RLRRrev + XLRRrev, RLRRrev + Cre3_P-loop, Cre3k3 + Cre3_P-loop, Pm8-LRR-R + Pm8-MHD-L, Cre3LrF + XLRRrev, Cre3LrF + Cre3_P-loop, Cre3k3 + Cre3LrF, Pm8-LRR-R + Cre3LrF, Pm8-LRR-L + RLRRrev, RLRRfor + XLRRrev. При цьому добирали праймери, щоб резистентний генотип не характеризувався відсутністю ампліфікації.

Результати, наведені у підрозділі, опубліковані у [137].

3.3. Групування множини генотипів за поліморфними спектрами, отриманими за методикою RGAP

На рівні фенотипу досліджували стійкі генотипи (Авротіка та його лінії) та, ті що уражуються борошнистою росою (сорти). Попри те, що стійкі генотипи мали варіабельні електрофоретичні спектри за наявністю / відсутністю певних компонентів, всі вони лишаються резистентними до патогену протягом років спостережень. Результати вивчення структури генів стійкості узгоджуються з результатами вивчення геномів ліній з використанням мікросателітів, як маркерних послідовностей [109], – інтрогресивні лінії варіабельні за послідовностями, які ймовірно отримали від амфідиплоїда. Тому за допомогою програмного забезпечення STRUCTURE версія 2.3.4 [138] спробували визначити, чи можна за отриманими електрофоретичними спектрами об’єднати Авротіку та її лінії в одну групу (популяцію), чи за отриманими компонентами генотипи розрізняються. Також перевіряли, чи можна з використанням отриманого молекулярного фенотипу з комбінаціями праймерів за методикою RGAP відрізнити стійку Авротіку від сортів, які сприйнятливі до патогену. Працювали з двома групами: 1 – Авротіка та сорти пшениці м’якої селекції СГІ-НЦНС та Краснодарського НДІСГ ім. П.П. Лук'яненка; 2 – амфідиплоїд та його інтрогресивні лінії. Використовували результати розділення ампліконів, отримані з комбінаціями праймерів за

методикою RGAP, до консервативних послідовностей генів стійкості, кожен компонент нумерували. Для позначення наявності / відсутності ідентифікованих послідовностей в складі конкретних генотипів використовували двійкову систему, припускаючи, що один алель кодує один компонент спектру.

Програмне забезпечення STRUCTURE 2.3.4, розроблене Прічардом та співавторами [139] дозволяє ідентифіковувати генетично однорідні кластери (підгрупи, субпопуляції) особин в межах популяції (групи) з використанням молекулярних маркерів за допомогою алгоритму Баєса. Кожна з груп характеризується набором частот алелів для кожного локусу та генотипу. Розробники програми використовують термін «популяція» для визначення її структури з певним типом молекулярних маркерів. За визначенням, популяцією називають групу організмів, об’єднану родинними зв’язками. У нашому випадку частина організмів однієї групи не є родичами напряму.

За замовчуванням передбачається, що маркерні локуси не зчеплені та є рівновага за зчепленням (linkage equilibrium) локусів один відносно одного та в популяції. Припускається, що є рівновага, відповідно до закону Харді-Вайнберга. Кожен алель у всіх досліджених локусах для кожного генотипу успадковується незалежно від інших алелів. Через вибір налаштувань у програмі, вибору моделі для побудови структури відбувається пошук осіб, які можуть об'єднуватися у один кластер. Враховуючи налаштування, відбувається розрахунок відхилення від рівноваги Харді-Вайнберга та рівноваги за зчепленням, здійснюється пошук осіб, які не перебувають у дисбалансі з подальшим обрахунком імовірності кожної особини бути віднесеною до певного кластеру. Серед доступних є моделі походження (ancestral models) (без домішок, з домішками, модель зв’язку, модель з врахуванням попередньої інформації про популяцію), моделі частот алелів (незалежних частот та частот, які корелюють (correlated allele frequencies)). Домішками вважають організми, які випадково потрапили до вибірки та є сторонніми. Або такий організм має частини геномів, які походять від предків з різних популяцій, тобто організм

змішаного походження. Модель з домішками рекомендують використовувати для більшості аналізів, оскільки домішки характерні для реальних даних, для вивчення організмів гібридного походження. За допомогою показника Діріхле (Dirichlet) α відбувається відображення рівнів домішок. При α>>1 алелі дослідних організмів є у всіх популяціях у рівних пропорціях, тобто частини геномів конкретного організму походять від К популяцій. Значення α<<1 вказує на те, що певна особина походить тільки з однієї популяції, домішок не має. За замовчуванням значення α дорівнює 1, користувач може його підбирати та змінювати.

Моделі другого типу враховують родинні зв'язки, щоб вираховувати частоти алелів. Припускається, що К популяцій, в які розподілені організми з вибірки, походять від однієї предкової. Через наявність дрейфу та різних ефективних розмірів для окремих популяцій частоти алелів у К популяціях будуть схожими. Алелі в різних кластерах корелюватимуть через спільне походження. Генетична кореляція може виникати двома шляхами:

1 – через вплив окремих генів на більше, ніж одну ознаку (плейотропна дія генів);

2 – алелі різних генів успадковуються як одне ціле (нерівновага за зчепленням). Кожен з генів може впливати на прояв лише однієї ознаки.

Тобто ознаки на які впливають такі гени будуть успадковуватися не незалежно. Якщо на одну з ознак буде діяти природний добір, то відбуватиметься і зміна іншої ознаки [140]. Вибір моделі з частотами, які корелюють, збільшує ймовірність виявити диференціацію в популяції, навіть, коли особини різних субпопуляцій мають недавні родинні зв'язки. Якщо обирати модель незалежних частот алелів, то мають бути точні відомості, що особини з вибірки не мають родинних зв'язків, існує диференціація. За інформацією розробників, моделі з незалежними частотами та з корельованими частотами дають подібні результати, різниця між ними буде лише у випадку сильної кореляції між алелями у популяції.

Може враховуватися попередня інформація про популяцію, наприклад фенотип, географічне походження індивідуумів. За доступною інформацією для частини організмів, які сприймаються, як зразки для навчання, відбувається розподіл решти організмів по субпопуляціях. На відміну від коефіцієнтів F Райта, для аналізу структури популяції не потрібно першочергово розподіляти популяцію на субпопуляції або деми, щоб в подальшому їх аналізувати. Розподіл на субпопуляції зазвичай визначається географічним походженням або фенотипом. В нашому випадку за географічним походженням організми не можна розмежувати, оскільки їх вирощуємо на одному полі.

Розраховується логарифмічна ймовірність для кожного значення K, щоб оцінити більш ймовірну кількість кластерів. Кількісно оцінюється ймовірність віднесення особин до певної субпопуляції (кластеру), такі результати є наближенням і не дають абсолютну оцінку. За даними розробників [139], програма здатна виявляти від двох до чотирьох високодиференційованих демів, можлива і більша кількість, але з меншим рівним диференціації. Для побудови структури популяцій зачасту використовують мікросателітні маркери, оскільки вони є кодомінантними та вискокополіморфними, однак, за результатами Евано та співавторів [141] програма добре працює і з домінантними маркерами, наприклад AFLP, при цьому можна не зазначати котрий з алелів є рецесивним, якщо відсутні відомості про це.

Перед отриманням результатів, які можна аналізувати потрібно переконатися, чи узгоджуються результати між різними запусками програми, тому бажано виконати кілька незалежних симуляцій для кожного значення K. Для оцінки K необхідно дозволити програмі змінювати значення α під час роботи. Перевірити узгодженість результатів можна через перегляд графіку зміни α під час виконання роботи програмою. Мають бути відсутні великі коливання.

Для знаходження кількості субпопуляцій K, на яку можуть бути підрозділені дослідні організми в межах кожної зі сформованих груп («Авротіка та лінії», «Авротіка та сорти»), встановлювали Burn-in

period (період вигорання) – 3, кількістю повторів для кожного значення К (від 1 до 13) – 10 000 MCMC (Markov Chain Monte Carlo). Burn-in period – розмовний термін, який описує викидання певних повторів (ітерацій) на початку запуску MCMC перед тим як програма почне враховувати отримані результати, як репрезентативні. Це потрібно для зменшення впливу початкових обрахунків на кінцевий результат. Встановлюють в межах 10 000-100 000. Перевірити, чи достатнім є обраний період можна через параметр «Графік». На графіку не мають значною мірою коливатися значення, які обраховує програма. Якщо це відбувається вкінці періоду вигорання, то потрібно його збільшувати. Щоб підібрати оптимальне значення періоду, можна декілька разів запускати програму для різних значень К та різної кількості кроків MCMC, щоб подивитися, чи змінюються коливання обрахованих значень на графіку. Для кожного К проводили 10 незалежних повторів. Використовували модель без домішок.

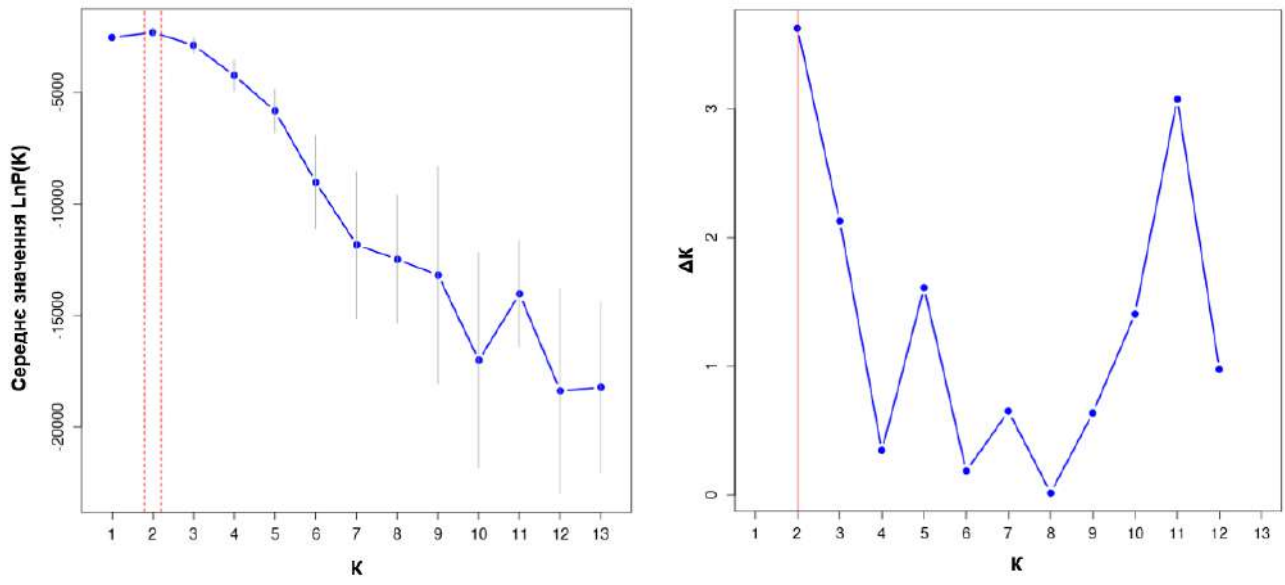
У випадку першої групи організмів, яку утворювали Авротіка та 12 ліній-похідних, використовували спектри, отримані з 10 комбінаціями. Працювали з 65 компонентами, припускали, що це 65 окремих локусів (табл.3.9).

Таблиця 3.9

Комбінації праймерів, використані при побудові структури групи «Авротіка та її інтрогресивні лінії»

№ з/п	Комбінація праймерів	Максимальна кількість компонентів у спектрі
1	Pm8-LRR-R + Pm8-LRR-L	2
2	RLRRrev + XLRRrev	14
3	Cre3k3 + Cre3_P-loop	3
4	Cre3k3 + Cre3Lr-F	8
5	Pm8-LRR-R + Pm8-MHD-L	3
6	RLRRrev + Cre3_P-loop	2
7	RLRRfor + Cre3_P-loop	1
8	Cre3LrF + XLRRrev	12
9	Cre3LrF + Cre3_P-loop	11
10	Cre3k3 + XLRRrev	9

Модель без домішок припускає, що кожна особина, яка входить до складу популяції походить лише від одного спільного предка, та обраховує апостеріорну ймовірність того, що такі організми належатимуть до певної субпопуляції. Дослідні організми створені з використанням Авротіки та сорту Аврора, тобто вони мають спільні батьківські генотипи та ці лінії добирали за стійкістю до борошнистої роси протягом років спостережень, тому вважатимемо, що жодна з цих ліній не є сторонньою. Використовуючи отримані програмою результати можна визначити оптимальну кількість кластерів або субпопуляцій за допомогою орієнтовних вказівок з [139] або скористатися CLUMPAK (Cluster Markov Packager Across K) [142], створеним за методикою Evanno та співавторів [141] для пошуку ΔK (дельта K, оптимальна кількість груп), що ми і зробили. Також для оцінки структури популяції використовують логарифм правдоповідбності, щоб визначити ΔK. За отриманими даними збільшення середнього значення логарифму правдоподібності [LnP(D)] є найбільшим при значенні K = 2 (рис. 3.9 А та Б). На графіку А нанесені середні значення логарифмів правдоподібності від K (синя ламана лінія) та стандратні відхилення (сірі вертикальні лінії).



А Б

Рис. 3.9. Розподіл логарифмів правдоподібності [LnP(D)] (А) та оптимальної кількості субпопуляцій (ΔK) для значень від 1 до 13.

Тому найбільш ймовірним є розподіл організмів на дві субпопуляції (рис. 3.10): перша – зеленого кольору, друга – помаранчевого. Стовпчаста діаграма побудована на основі оптимальної К. Розподіл організмів на кластери відбувається за вирахуваними ймовірностями, що організм належить саме до цього кластеру. Гранична ймовірність того, що організм буде віднесено до певного кластеру – 0,5. Авротіка, інтрогресивні лінії tica1049, tica1063 (2021), tica1089, tica1094 утворюють першу субпопуляцію або кластер, другу – інтрогресивні лінії tica1007, tica1075 (2018, 2021), tica1130, tica1187. Вносять вклад в обидві субпопуляції tica1058, tica1063 (2018, 2021), tica1084.

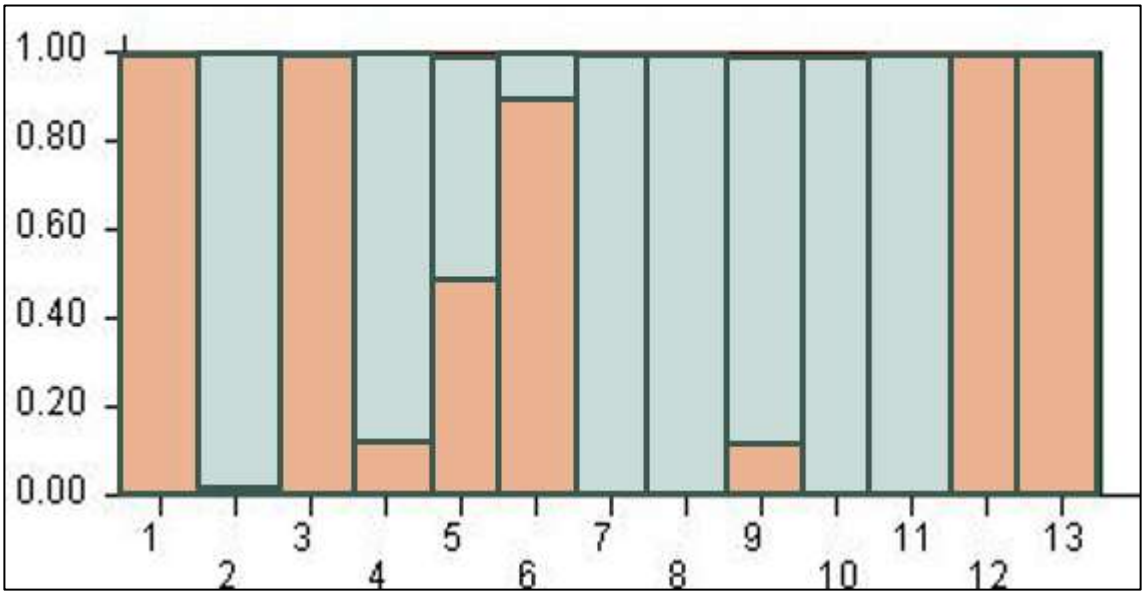


Рис. 3.10. Структура популяції, утвореної генотипами, які мають різну кількість генетичного матеріалу від *Amblyopyrum muticum* (амфідиплоїд та інтрогресивні лінії, створені за його участі (2-13)): 1 – Авротіка, 2 – tica1007, 3 – tica1049, 4 – tica1058, 5 - 6 – tica1063/1 (2018 та 2021, відповідно), 7 - 8 – tica1075/1 (2018 та 2021, відповідно), 9 – tica1084, 10 – tica1130, 11 – tica1187, 12 – tica1089, 13 – tica1094.

Частка особин від загальної, яка входить до першої підгрупи – 0,559, другої – 0,441. Розрахована середня відстань (очікувана гетерозиготність) між особинами в одній субпопуляції для першої дорівнює 0,183, для другої – 0,263.

Кожен організм може робити вклад (входити) тільки в один кластер або одночасно в обидва (табл.3.10).

Таблиця 3.10

Частоти вкладу різних генотипів до генетичної структури однієї з двох підгруп

Генотип	Внесок генотипу у підгрупу	
	1	2
Авротіка	0,008	0,992
tica1007	0,971	0,029
tica1049	0,002	0,998
tica1058	0,872	0,128
tica1063 (2018)	0,508	0,492
tica1063 (2021)	0,038	0,962
tica1075 (2018)	0,999	0,001
tica1075 (2021)	0,998	0,002
tica1084	0,866	0,134
tica1130	0,995	0,005
tica1187	0,996	0,004
tica1089	0,010	0,990
tica1094	0,002	0,998

Хоч інтроресивні лінії і створені з використанням одного й того ж амфідиплоїда, але не всі з них потрапили у одну субпопуляції з амфідиплоїдом, що говорить про дифереціацію між цими організмами, однак, вона не впливає на стійкість до борошнистої роси. Підроздільність на субпопуляції на основі консервативних послідовностей генів стійкості підтверджує те, що лінії отримали від Авротіки різну кількість генетичного матеріалу, хоча би тих послідовностей, за якими спостерігали.

Амфідиплоїд є джерелом послідовностей, які можуть викликати стійкість до борошнистої роси, тому виникає питання – чи можна Авротіку та сорти об’єднати в одну групу за проаналізованими ділянками. Для Авротіки та сортів пшениці м’якої, які брали участь у схрещуваннях, теж аналізували структуру популяції, щоб зрозуміти чи вони відрізняються між собою за дослідними

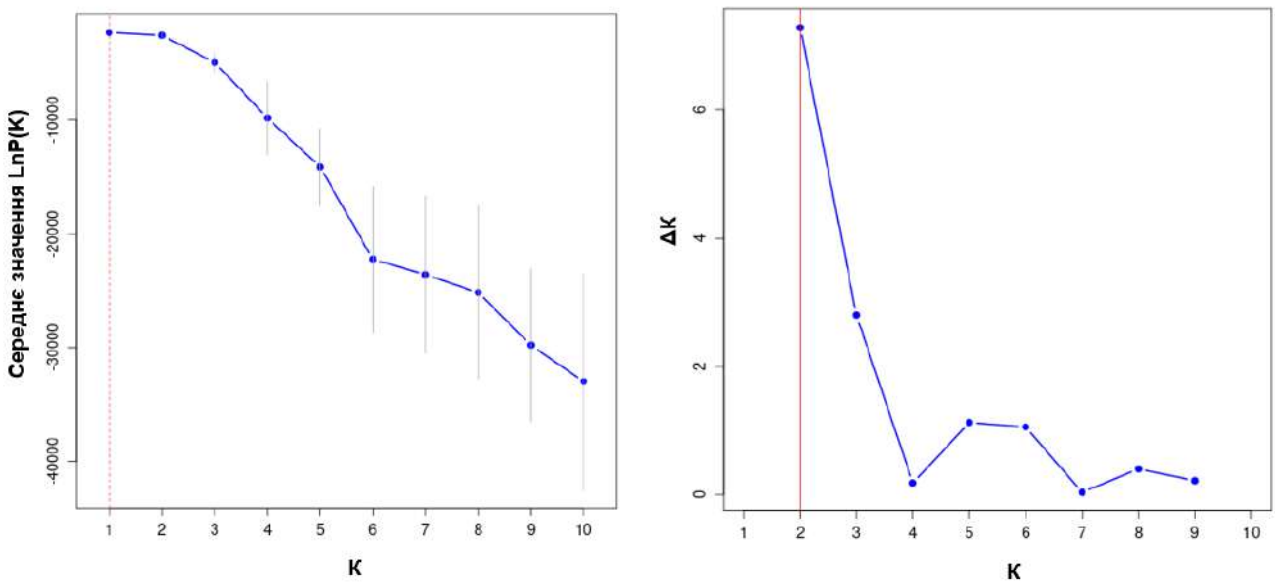
ділянками геномів. Приймали їх за одну популяцію, оскільки Авротіка містить геноми А та В від сорту пшениці м'якої Аврора, що можна прийняти за їх спільне походження. В цьому випадку використовували модель з домішками, оскільки така модель дозволяє припустити, що особини мають генетичний матеріал різного походження, тобто не від одного предка. Авротіка має генетичний матеріал і від дикорослого диплоїдного виду. Перелік комбінацій праймерів, результати з якими використовували під час вивчення сформованої групи Авротіки, сортів пшениці м'якої селекції СГІ-НЦНС (Тіра, Панна, Лелека, Одесьска 267) та Краснодарського НДІСГ (Аврора) наведений у табл.3.11. Всього використано 16 комбінацій праймерів, загальна кількість проаналізованих компонентів спектру – 133.

Таблиця 3.11

Комбінації праймерів, використані при побудові структури групи Авротіки та сортів пшениці м'якої різних селекційних установ

№ з/п	Комбінація праймерів	Максимальна кількість компонентів у спектрі
1	Cre3k3 + RLRRfor	25
2	Pm8-LRR-R + Pm8-MHD-L	2
3	RLRRrev + Cre3_P-loop	15
4	RLRRfor + Cre3_P-loop	2
5	Cre3Lr-F + XLRRrev	9
6	Cre3Lr-F + Cre3_P-loop	3
7	Cre3k3 + Cre3_P-loop	2
8	Cre3k3 + XLRRrev	14
9	Pm8-LRR-R + Cre3Lr-F	4
10	RLRRrev + RLRRfor	5
11	Pm8-LRR-L + RLRRrev	6
12	Pm8-LRR-R + Cre3k3	7
13	Cre3k3 + Pm8-MHD-L	3
14	Cre3Lr-F + Pm8-MHD-L	4
15	RLRRfor + XLRRrev	10
16	Pm8-LRR-L + XLRRrev	22

Використовували значення K від 1 до 6, для кожної кількості субпопуляцій робили по 10 повторів. Оптимальним є розподіл групи на дві підгрупи (рис.3.11), хоч розподіл ймовірностей підроздільності на дві групи та нерозподілу популяції є майже однаковим.



А Б

Рис. 3.11. Розподіл логарифмів правдоподібності [LnP(D)] (А) та оптимальної кількості субпопуляцій (ΔK) для кількості субпопуляцій від однієї до десяти.

При розподілі на дві субпопуляції було очікувано, що в одну підгрупу потраплять Авротіка в парі з Авророю або амфідиплоїд буде одиноким, однак, цього не сталося. В один кластер потравили Авротіка та сорт Тіра селекції СГІ-НЦНС (рис. 3.12). Решта сортів СГІ-НЦНС об’єднані у інший кластер.

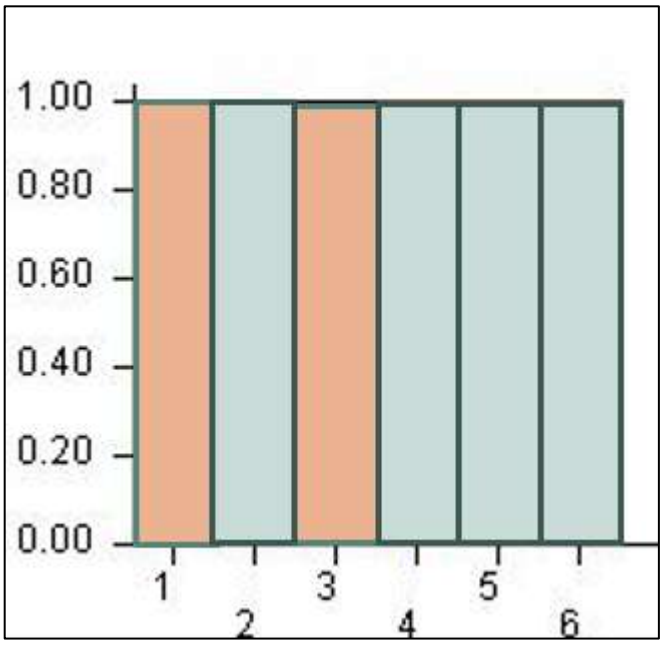


Рис. 3.12. Структура групи, утвореної з Авротіки та сортів пшениці м'якої: 1 – Авротіка, 2 – Аврора, 3 – Тіра, 4 – Панна, 5 – Лелека, 6 – Одеська 267.

Перший кластер утворюють 0,335 організмів з загальної, другий – 0,665. Субпопуляції в своїх межах характеризуються, як гомогенні та високодиференційовані між собою. Деякі генотипи роблять мінімальний вклад в інший кластер (табл. 3.12). Частка таких генотипів 0,001 або 0,003.

Таблиця 3.12

Частоти внесків різних генотипів до генетичної структури однієї з двох підгруп

Генотип	Внесок генотипу у підгрупу	
	1	2
Авротіка	0,001	0,999
Аврора	0,999	0,001
Тіра	0,001	0,999
Панна	0,995	0,005
Лелека	0,999	0,001
Одеська 267	0,997	0,003

У дослідженні використані сорти, створені у різних селекційних закладах, тобто вони мають різне походження. При створенні сорту Аврора були залучені сорти пшениці м'якої Нойцухт, Безоста 1, Безоста 4 [цитовано за 110]. Проте і створення сортів з використанням різних селекційних програмам не дозволило їх диференціювали на різні підгрупи з використаними молекулярними маркерами. Можливо тому, що досліджували такий рослинний матеріал за послідовностями генів стійкості, які мають консервативні ділянки. У сортів гени стійкості можуть бути неефективними, проте зберігатимуться в їхніх геномах. Проте одну підгрупу утворюють стійка Авротіка та сорт Тіра, який певною мірою вражається борошнистою росою. Можливо, ідентифіковані з доступними комбінаціями праймерів, послідовності не є критичним для опірності патогенові, прояву ознаки на рівні фенотипу. Крім того, досліджували тільки нуклеотидні послідовності певних ділянок геному, а їх наявність не завжди буде пов'язана з проявом певного фенотипу через вплив епігенетичних змін, просторових взаємодій між білками стійкості, циркулювання різних рас патогенів. Отже, розподіл дослідних генотипів на різні кластери під час аналізу ампліконів, отриманих з комбінаціями праймерів за методикою RGAP, свідчить про різницю між ними, проте за отриманими результатами не вдалося віддиференціювати чуливі сорти та резистентну Авротіку.

3.4. Мінливість генотипів з генетичним матеріалом від *Amblyopyrum muticum*

Авротіка має спільні субгеноми A та B з сортом пшениці м'якої Аврора, множина інтрогресивних ліній Авротіки створена за участі згаданого сорту. Тому спостерігаючи за електрофоретичними спектрами, отриманими з відібраними комбінаціями праймерів до консервативних послідовностей генів стійкості, очікували отримати певну подібність цих спектрів. Так само очікували спостерігати подібні спектри двох ліній (tica1063 та tica1075), які аналізували у двох поколіннях (рослини 2018 та 2021 років). За наявності

консервативних ділянок у їхніх геномах, які фланкують праймери, можна прослідкувати які ділянки хромосом яких субгеномів будуть передаватися нащадкам, якщо така інформація відома, як для праймерів до генів *Pm*. Якщо аналізуються ділянки геномів, ампліфіковані з парами праймерів, створеними за методикою RGAP, то можна відслідковувати тільки факт передачі конкретного амплікону та потенційних змін, які могли відбутися через порівняння цього амплікону, отриманого з ДНК батьківських генотипів та рослини-гібриду. Перспективним матеріалом для вивчення таких змін можуть бути інтрогресивні лінії, хоч вони всі і походять від одного амфідиплоїда, проте можуть отримати різну кількість генетичного матеріалу геному Т, який містить Авротіка. Припускаємо, що саме з цим геномом пов'язана стійкість, що Авротіки, що ліній.

Інтрогресивні лінії tica1063 та tica1075 представлені вихідним генотипом (рослина 2018 року) та поколінням (2021). Продукти ампліфікації ідентичні в межах ліній з праймерами Pm8-LRR-R + Pm8-LRR-L та Cre3k3+XLRRrev, Pm8-LRR-R + Pm8-MHD-L, тільки для tica1063 – з RLRRrev+Cre3_P-loop, Cre3Lr-F + Cre3_P-loop та тільки для tica1075 – Cre3k3+Cre3_P-loop, Cre3k3 + Cre3Lr-F (рис. 3.13).

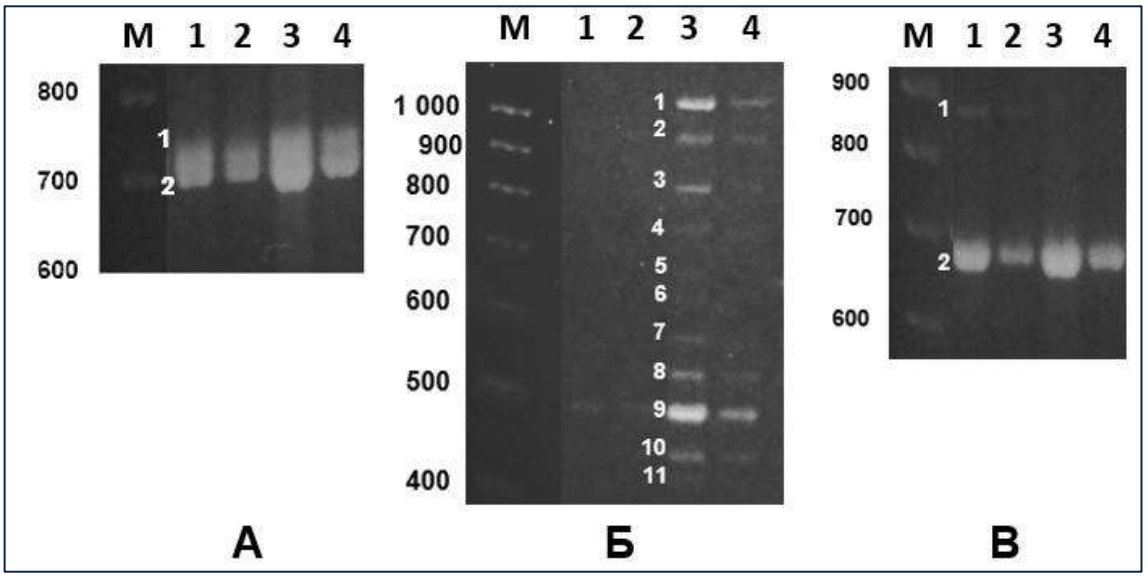


Рис.3.13. Мінливість електрофоретичних спектрів, отриманих з ДНК інтрогресивних ліній Авротіки різних поколінь (1 – tica1063 (2018), 2 – tica1063

(2021), 3 – tica1075 (2018), 4 – tica1075 (2021) та комбінаціями праймерів Pm8-LRR-R + Pm8-MHD-L (А), Cre3LrF + Cre3_P-loop (Б), Cre3k3 + Cre3_P-loop (В). М – маркер молекулярних мас 100bp DNA Ladder (Solis Biodyne).

Варіабельність за різними компонентами спектрів у ліній різна. Наприклад, з RLRRrev + XLRRrev лінія tica1063 більш мінлива (2 компоненти з 14 є однаковими), порівняно з tica1075, в якої за компонентами 11 та 14 спостерігали різницю (див. рис.3.8).

Різні покоління інтрогресивної лінії tica1063 є однаковими у відсутності ампліфікації з праймерами Cre3k3 + Cre3Lr-F. Для tica1075 такого не спостерігали, але з комбінацією праймерів RLRRrev + Cre3_P-loop з ДНК одного з поколінь tica1075 ампліфікація відбувається, з ДНК іншого – ні. Це вказує на певну нестабільність геномів інтрогресивних ліній в контексті послідовностей інтересу, які можуть бути пов’язані зі стійкістю.

Можна зробити припущення, що геноми інтрогресивних ліній протягом поколінь зазнають перебудов на рівні нуклеотидних послідовностей. Однак, такі зміни можуть як сприяти більшій нуклеотидній різноманітності, так і навпаки. За допомогою ПЛР-ампліфікації та розділення продуктів ампліфікації у агарозному гелі можна прослідкувати тільки зміни, які охоплюються відносно великі ділянки геномів, виявлення яких може забезпечити роздільна здатність агарозного сита. При цьому відсутня конкретизація що це за зміни, для цього потрібно використовувати, наприклад секвенування. Збільшення кількості послідовностей може відбуватися через дуплікацію, переважно тандемну, сегментна зустрічається рідко. Хоч лінії і зберігають стійкість у поколіннях, однак, деякі ділянки, які можуть забезпечувати стійкість до грибних патогенів можуть втрачатися або зазнаватимуть змін. Оцінити значимість таких втрат при розвитку стійкості навряд чи вдасться через наявність і інших механізмів, які роблять вклад в її розвиток – епігенетичні зміни послідовностей, взаємодії на рівні продуктів генів, вплив фітогормонів. Стійкість до борошнистої роси у амфідиплоїда та ліній є на різних стадіях онтогенетичного розвитку та

передається з покоління в покоління при самозапиленні (вертикальна стійкість). В різні роки культивування генотипи з інтрогресіями можуть взаємодіяти з різними расами патогену при вирощуванні рослинного матеріалу у польових умовах. Щорічне циркулювання різних рас обумовлене змінами клімату, різною кількістю опадів, температурою. За більш ранніми даними з 40-х років минулого століття [цитовано за 77], стійкість до борошнистої роси пов'язана з експресією одного домінантного гена і це притаманно для вертикальної стійкості. Остання виникає при взаємодії конкретних продуктів гена стійкості рослини та авірулентності патогену, ця стійкість є високоспецифічною та обумовлена набором генів [143]. Тому під час ампліфікації можуть бути виявлені не один ген, а низка, які мають спільні консервативні послідовності. Також в такий спосіб можуть бути ідентифіковані аналоги генів стійкості, які мають притаманну для *R*-генів структуру. Резистентність до борошнистої роси можуть зумовлювати не лише гени *Pm*. Оскільки добираємо рослини у польових у мовах за опірністю до конкретного збудника, то молекулярними методами можуть бути виявлені послідовності, які, ймовірно, залучені у реакції організму на патоген. Ці послідовності можуть походити з різних геномів (A, B, D, T) або бути продуктами рекомбінації. Лінії Авротіки, переважно, мали більшу варіабельність ампліконів за рухливістю в електричному полі, порівняно з амфідиплоїдом та сортами, що можна пояснити наявністю різної кількості чужинного хроматину в їхніх геномах, перенесеного через гібридизацію, та можливими змінами цих послідовностей. Хоч такі відмінності у електрофоретичних спектрах спостерігаються, проте ці зміни не заважають Авротіці та її лініям-похідним бути роками стійкими. За отриманими результатами до складу геномів інтрогресивних ліній потрапили частини генетичного матеріалу, як від амфідиплоїда, так і від сорту Аврора. Може бути і ситуація, що при переміщенні послідовностей Авротіки у нове, відмінне від пшеничного, генетичне середовище і колись неефективні гени перестають бути такими. Це можна пов'язати і з різними регуляторними молекулами, залученими у прояв гену. Якщо продовжувати вивчати мінливість генотипів,

які поєднують генетичний матеріал різних видів, то можна і надалі використовувати ознаку «стійкість до борошнистої роси», як модель для спостереження за цими змінами.

3.5. Виділення особин з популяцій, які розщеплюються за стійкістю до борошнистої роси, за отриманими молекулярними фенотипами. Груповий аналіз популяцій

Для вивчення популяцій, які розщеплюються, за ознакою стійкості до борошнистої роси використовували консервативні послідовності генів стійкості, як маркерні. Консервативні послідовності, залежно від гена, завжди знаходяться в його складі, але в межах них можлива варіація за нуклеотидним вмістом, що дозволяє їх використовувати, як молекулярні маркери. За наявності поліморфізму такі маркери є інформативними для виявлення змін в послідовностях генів, в нашому випадку під час інтрогресивної гібридизації. З використанням батьківських генотипів створений набір популяцій, які розщеплюються. В одну популяцію об’єднані рослини, які походять від однієї із інтрогресивних ліній Авротіки або від ліній інших амфідиплоїдів (Аврозис, Авродес, Авролата). В попередніх підрозділах аналізували тільки амфідиплоїд Авротіка та його лінії, оскільки за їхньої участі була створена більша кількість рослинного матеріалу. При вивченні популяцій, що розщеплюють, додали і рослини, які є похідні від схрещувань ліній з інтрогресіями від інших амфідиплоїдів з низкою сортів. Хоч таких рослин небагато, проте згадані амфідиплоїди мають геноми від різних дикорослих видів, які потенційно можуть слугувати джерелом стійкості. І щоб в такий спосіб розширити матеріал для вивчення генів *Pm*. Популяції отримані в різних напрямках схрещування, коли генотип з чужинним хроматином міг бути як батьком, так і матір’ю, є декілька поколінь нащадків (F_{1-3}) та гібриди отримані з використанням різних сортів пшениці м’якої, це більше тисячі рослин, з яких виділена ДНК. Отримані гібриди першого покоління за участі стійких гібридів F_2, які також

використовували для вивчення стабільності мейотичного поділу, щоб спробувати пов’язати особливості поділу та дослідну ознаку. Гібриди, які були стійкими у другому поколінні, але розщепилися на стійких та уражених у третьому, є неінформативними, оскільки вони були гетерозиготами, тому при створенні груп ДНК ними нехтували. Велика кількість рослин гібридного походження обумовлена:

- кількістю виконаних схрещувань для тестування різних генотипів (стійкі та уражені) за комбінацій схрещувань та напрямів. Від кожного схрещування могли отримувати декілька десятків зернин;

- здатністю знаходити гетерозиготні організми, якщо такі утворюються, за результатами схрещувань серед низки нащадків;

- зі збільшенням кількості нащадків, які можуть мати послідовності стійкості, зростає ймовірність знайти послідовність, яка є критичною для розвитку стійкості та в якій можливі зміни через інтрогресивну гібридизацію на рівні нуклеотидного складу чи епігенетичні, пов’язані з набуттям або втратою ознаки. Останнє припущення не тестували у поточному дослідженні;

- велика вибірка дозволяє виключити хибні негативні результати, коли маркер, за яким слідкують визначений як мономорфним, хоча він таким не є. При цьому хибні позитивні результати будуть рідкісними, оскільки у випадку правильно зробленої оцінки фенотипу (на рівні організму та ДНК) гомозиготний організм не може розщеплюватися у наступних поколіннях. За літературними даними [144] стійкість до патогенів рослин забезпечують домінантні або гени з неповним домінуванням.

Для вивчення створених популяцій за ознакою інтересу, використовують груповий аналіз популяцій, які розщеплюються (**B**ulked **s**egregant **a**nalysis, BSA), розроблений Міхельмором [145]. Для цього методу потрібна ДНК батьківських генотипів (амфідиплоїди, їхні лінії-похідні та сорти пшениці м’якої), які контрастні за ознакою, та ДНК рослин з популяцій, які розщеплюються, об’єднані у дві групи (bulks). Якщо мали ДНК від рослин з проміжною стійкістю, рослини були незначною мірою уражені, то

ампліфікували їх окремо. Ці рослини мали оцінку 7-8 за 9-бальною шкалою, за 80-бальною – 10 балів. Оскільки популяції розщеплюються, тому до однієї групи входитиме ДНК від стійких рослин, до іншої – від уражених. До складу стійкої групи додавали і ДНК від певного амфідиплоїда та лінії або ліній, якщо їх декілька було задіяно на першому етапі схрещування. Якщо мали ДНК від рослин з проміжною стійкістю, то ампліфікували її окремо, щоб перевірити чи відрізнятимуться їх амплікони від рослин з екстремальними фенотипами. Рослинний матеріал оцінювали у польових умовах за 9-бальною шкалою, стійкими є рослини з оцінкою 9–7, решта – різною мірою уражені. Джерелом стійкості є амфідиплоїди, лінії при цьому мають молекулярну основу стійкості та є «мостом» / засобом для перенесення бажаних послідовностей з амфідиплоїда до сортів через більшу подібність їхніх геномів, тому ДНК від лінії додавали до групи злитої (об’єднаної) ДНК від резистентних рослин. Для амфідиплоїдів є декілька різних ліній. При створенні груп зважали на лінію, яка залучалася у схрещування. Працювали з чотирма амфідиплоїдами: Авротіка, Аврозис, Авродес, Авролата (табл. 3.13). Для всіх амфідиплоїдів, крім Авротіки, мали 15 гібридів або менше. У таблиці 3.13 наведені номери гібридів, використані при створенні груп. Одна з популяцій походить від схрещування ліній tica1061 та tica1063, тому їхні нащадки записані разом. В таблицю не включені гібриди, які розщеплювалися за ознакою стійкості, в поколіннях. В останньому стовпці таблиці наведений перелік сортів пшениці м’якої, які залучали у створення гібридів. ДНК з деяких ліній не виділяли через відстуність матеріалу для виділення, тому вони не включені у стійкі групи. У стовпці «стійкі гібриди» також внесені номери рослин, які мають проміжну стійкість і їх у групу з ДНК від стійких рослин не додавали.

Під час порівняння спектрів між стійкою та ураженою групою зважали також, чи відрізняється амплікон стійкої групи від амплікону, отриманого з ДНК рослин з незначним рівнем ураження. Якщо спостерігали різницю у рухливості компонента між стійкою та ураженою групами та амплікон генотипів з проміжною стійкістю не був таким, як з ДНК стійкої групи, то в

подальшому ДНК від множини рослин, які входили у групи, ампліфікували окремо, щоб визначити котрий з генотипів забезпечив відмінність від уражених рослин.

Таблиця 3.13

Перелік ДНК, згрупованої за приналежністю до амфідиплоїдів та інтрогресивних ліній

Амфідиплоїд Аврозис		
стійкі генотипи	уражені гібриди	сорти пшениці
- інтрогресивна лінія: res 141; - F_2: 10 рослин	F_2: 5 рослин	Вдала, Панна
Амфідиплоїд Авродес		
- інтрогресивна лінія: res 26; - F_2: 9 рослин	F_2: 5 рослин	Панна, Селянка
Амфідиплоїд Аврола та		
- інтрогресивна лінія: res 193; - F_2: 8 рослин	F_2: 4 рослини	Одеська 267, Аврора
Амфідиплоїд Авротіка		
інтрогресивна лінія 1007/1 та 1011		
- інтрогресивна лінія 1007/1; - F_2: 4 рослини	F_2: 10 рослин	Лелека, Одеська267
інтрогресивна лінія tica1049		
- інтрогресивна лінія tica1049; - F_1: 44 рослини; - F_2: 28 рослин	- F_1: відсутні; - F_2: 12 рослин	Ніконія, Аврора, Панна, Лелека
Генотипи з проміжною стійкістю (оцінка 7-8 у всіх)		
- F_1: 9 рослин; - F_2: 3 рослини		

Продовження табл. 3.13

інтрогресивна лінія tica1058		
- інтрогресивна лінія tica1058; - F_1: популяція 4 (4/1, 4/10, 4/16, 4/17, 4/18, 4/4, 4/8, 4/9); - F_2: 741/3, 742/1, 743/5, 743/8, 744/6, 749/9, 751/1, 751/2, 751/3, 752/4, 753/5, 756/7, 757/8	- F_1: відсутні; - F_2: 742/11, 744/12, 745/13, 746/14, 746/15	Панна Панна, Аврора

Продовження табл.3.13

інтрогресивні лінії tica1061 та tica1063		
- інтрогресивні лінії tica1061 та tica1063; - F_1: 2 рослини; - F_2: 23 рослини	- F_1: відсутні; - F_2: 15 рослин	Тіра, Селянка, Одеська 267, Вдала
Генотипи з проміжною стійкістю (оцінка 7-8 у всіх)		
- F_1: 1 рослина; - F_2: 2 рослини		
інтрогресивна лінія tica1075		
- інтрогресивна лінія tica1075; - F_1: 10 рослин; - F_2: 12 рослин	- F_1: 9 рослин; - F_2: 12 рослин	Селянка, Ніконія, Вдала, Панна
Генотипи з проміжною стійкістю		
- F_2: 3 рослини		
інтрогресивна лінія tica1084		
- інтрогресивна лінія 1084/2; - F_1: 15 рослин; - F_2: 22 рослини	- F_1: відсутні; - F_2: 8 рослин	Лелека, Вдала, Панна, Одеська 267, Тіра, Ніконія
Генотипи з проміжною стійкістю (оцінка 7-8 у всіх)		
- F_1: 2 рослини; - F_2: 3 рослини		
інтрогресивна лінія tica1130		
- інтрогресивна лінія tica1130; - F_2: 15 рослин	- F_2: 13 рослин	Панна, Ніконія, Тіра, Одеська 267
інтрогресивна лінія tica1187		
- F_1: 39 рослин; - F_2: 22 рослини	- F_1: 5 рослин; - F_2: 20 рослин	Лелека, Одеська 267, Вдала, Тіра
Генотипи з проміжною стійкістю		
- F_1: 6 рослин		

Продовження табл. 3.13

інтрогресивна лінія tica1094		
- F_2: 5 рослин	- F_2: 4 рослини	Селянка, Панна
інтрогресивна лінія tica1103		
- F_1: 2 рослини; - F_2: 13 рослин	- F_1: 3 рослини; - F_2: 12 рослин	Ніконія, Лелека, Панна, Одеська 267

Батьківськими генотипами є інтрогресивні лінії амфідиплоїдів Авротіки, Аврозису, Авродесу та Авролати та сорти пшениці м'якої. У нашому випадку придатними молекулярними маркерами є консервативні послідовності генів стійкості. У поєднанні з BSA використовували і методику RGAP. На попередньому етапі вивчення батьківських генотипів нами відібрані 14 пар праймерів. Відбір комбінацій полягав у пошуку компоненту електрофоретичного спектру, який був би серед усіх дослідних генотипів, йому присвоювали позначку «1», присутній у стійких генотипів (амфідиплоїд та його лінії) та уражених (сорти). Бо за компонентом, присутнім з ДНК обох батьків, серед нащадків можна прослідкувати його мінливість. Для компонентів, які з ДНК від одних генотипів були, для інших – відсутні є неінформативними, оскільки за такими спектрами неможливо відрізнити гетерозигот, прослідкувати передачу компонента з позначкою «0» від резистентного батька. Використовуючи відібрані комбінації праймерів для роботи з групами рослин не зі всіма групами вдалося отримати продукти ампліфікації, переважно ампліфікація була відсутня з групою стійких рослин та з деякими генотипами при ампліфікації кожної ДНК окремо з групи. За такими комбінаціями рослинний матеріал не аналізували, оскільки з їх використанням не можна встановити зв'язку між змінами нуклеотидної послідовності та фенотипом рослини. Якщо виключити такі комбінації праймерів, то лишаються тільки одна з тринадцяти, спостерігали за основними компонентами спектру: Pm8-LRR-L + XLRRrev. Хоча всі 14 комбінацій були придатними для розрізнення стійких та чутливих батьківських генотипів, але виявилися непридатними для вивчення їх нащадків. Якщо спробувати пояснити таку ситуацію, то у складі резистентної групи для ДНК-полімерази може виникати конкуренція за зв'язування з цільовими послідовностями.

Щоб збільшити кількість комбінацій, створені праймери під час дослідження до певних послідовностей генів стійкості *Pm* поєднували у пари за методикою RGAP – у одній парі були праймери до різних ділянок. Найбільш поліморфними спектрами, отриманими за методикою RGAP, були спектри при

використанні в одній комбінації праймерів, створених до послідовностей, які кодують кіназний домен, та повтори, багаті на лейцин. При поєднанні у пари новостворених праймерів керувалися цими результатами. Такі очікування не справдилися, всього спробували 35 пар (табл. 3.14), з п'ятьма комбінаціями ампліфікація була відсутня. Деякі з праймерів спробували поєднувати з праймерами, які фланкують ділянки, пов'язані зі стійкістю до цист нематод (Cre3k3). Іншим принципом було поєднання у комбінацію праймерів, які створені до послідовностей гену, які розташовані поруч, в одну комбінацію могли потрапити одночасно два праймери одного напрямку (два прямі або два зворотні). Серед послідовностей генів, до яких створені праймери, тільки до *Pm2* та *Pm3* праймери фланкують різні кодуючі ділянки одного і того ж гена. Для праймерів, створених до гена *Pm3* таких комбінацій створили 15: лівий та правий праймери Pm3-5 почергово поєднували з праймерами від Pm3-1 до Pm3-4, Pm3-6. Температуру гібридизації для таких комбінацій визначали, як середнє арифметичне між температурами плавлення для двох праймерів, які входять у пару. Останній підхід з поєднанням у пари праймерів, які фланкують ділянки розташовані поруч, на нашу думку, є більш вдалим.

Таблиця 3.14

Комбінації праймерів, створені за методикою RGAP

№ з/п	Комбінації праймерів	$t_{гібр.}$	№ з/п	Комбінації праймерів	$t_{гібр.}$
1	Pm2-3-L + Pm2-1-L	59,4ºC	19	Pm4b-1-L + Cre3k3	57,3ºC
2	Pm2-3-L + Pm2-4-L		20	Pm4b-1-R + Cre3k3	
3	Pm2-1-L + Pm2-4-L		21	Pm3-5-L + Pm3-1-L	
4	Pm2-3-L + Pm2-1-R		22	Pm3-5-R + Pm3-1-L	
5	Pm3-3-L + Pm2-1-L	58,4ºC	23	Pm3-5-R + Pm3-1-R	
6	Pm3-3-L + Pm2-1-R		24	Pm3-5-L + Pm3-2-L	
7	Pm3-3-R + Pm2-1-L		25	Pm3-5-L + Pm3-2-R	
8	Pm3-3-R + Pm2-1-R		26	Pm3-5-R + Pm3-2-R	
9	Pm3-3-L + Pm3-4-R		27	Pm3-5-L + Pm3-3-L	
10	Pm3-3-R + Pm3-4-L		28	Pm3-5-L + Pm3-3-R	

Продовження табл.3.14

11	Pm3-3-L + Pm21-1-L	58,3ºС	29	Pm3-5-R + Pm3-3-R	
12	Pm3-3-L + Pm21-1-R		30	Pm3-5-L + Pm3-4-L	
13	Pm3-3-R + Pm21-1-L		31	Pm3-5-L + Pm3-4-R	
14	Pm3-3-R + Pm21-1-R		32	Pm3-5-R + Pm3-4-R	
15	Pm2-1-R + Pm21-1-L		33	Pm3-5-L + Pm3-6-L	
16	Pm2-1-R + Pm21-1-R		34	Pm3-5-L + Pm3-6-R	
17	Pm4b-1-L + Pm4b-2-R	57,3ºС	35	Pm3-5-R + Pm3-6-R	
18	Pm4b-2-L + Pm4b-1-R		-	-	-

Примітка. $t_{гібр.}$ – температура гібридизації праймерів з матрицею.

З перелічених комбінацій тільки дві використовували для роботи з групами ДНК через наявність успішної ампліфікації та наявність компонента спектру одночасно наявного з ДНК чутливого та стійкого генотипу. Тестували успішність ампліфікації з двома генотипами – амфідиплоїда Авротіка та сорту пшениці м'якої Аврора. Ці два генотипи є контрастними за дослідною ознакою та від Авротіки гібриди потенційно можуть мати генетичний матеріал і вона є джерелом стійкості. Зачасту з ДНК Авротіки ампліфікація була відсутня. Серед 35 комбінацій обрали лише дві для їх використання з ДНК від популяцій, які розщеплюються: Pm2-3-L + Pm2-4-L та Pm3-5-L + Pm3-3-L. Ці пари праймерів використовували для популяцій, створених з усіма чотирма амфідиплоїдами. Для роботи з групами нумерували компоненти спектру, якщо вони були не поодинокі, та далі слідкували за рухливістю компоненту-інтересу. Щоб переконатися, що відкинули багато пар праймерів не випадково, спробували використати пару (Pm2-1-L + Pm2-4-L), яка відрізняє контрастні генотипи (Авротіку та Аврору) за присутністю / відсутністю компонента, з груповою ДНК для двох інтрогресивних ліній Авротіки (tica1007 та tica1049). Вибір пояснюється тим, що з цією комбінацію та ДНК Авротіки був отриманий продукт. Хоч спектр є багатокомпонентний, однак, група стійких та уражених так само, як і батьківські генотипи характеризувався за варіюванням ампліконів 0 / 1 (табл. 3.15), тому полишили спроби використовувати такі пари.

При цьому спектри груп ДНК є більш різноманітними за представленістю компонентів, порівняно з інтрогресивними лініями, залученими у їх створенні.

Таблиця 3.15

Нумерація компонентів електрофоретичних спектрів за їхньою рухливістю, отриманих за методикою RGAP з комбінацією Pm2-1-L + Pm2-4-L

Генотип	Номери компонентів								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Авротіка	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Аврора	1	0	1	0	0	1	1	1	1
Вдала	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Панна	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Лелека	0	0	0	0	0	1	1	0	1
Одеська 267	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Селянка	0	0	1	0	0	1	0	0	1
Тіра	0	0	1	1	1	1	1	0	1
Ніконія	0	0	1	1	1	1	1	0	1
tica1007	0	0	0	0	0	1	1	0	1
група стійких рослин для tica1007	0	0	1	1	1	1	1	0	1
група уражених рослин для tica1007	0	0	1	1	1	1	1	0	1
tica1049	0	0	0	0	0	1	0	0	0
група стійких рослин для 1049/2	0	0	0	0	0	1	1	0	1
група уражених рослин для 1049/2	0	0	0	0	0	1	1	0	1

Для комбінації праймерів Pm2-3-L + Pm2-4-L та ДНК Аврори спостерігали подвійні компоненти під номерами 1, 2, для зручності до цифри додавали літеру a чи b, компонент 3 був потрійним (a,b,c). Амфідиплоїди Авродес, Аврозис та Авролата відрізняються за компонентом 1 від ампліконів Аврори. Аврора у спектрі має 1a та 1b, Авролата та Аврозис мають один компонент, який має проміжку рухливість у електричному полі між 1a та 1b, з ДНК Авродеса ампліфікація відсутня. Результати ампліфікації наведені у додатку Е (таблиця 1) у двійковій системі та на рис.3.14. З ДНК Аврозису, на відміну від інших генотипів (амфідиплоїдів та сортів), є три компоненти 3a, 3b, 3c.

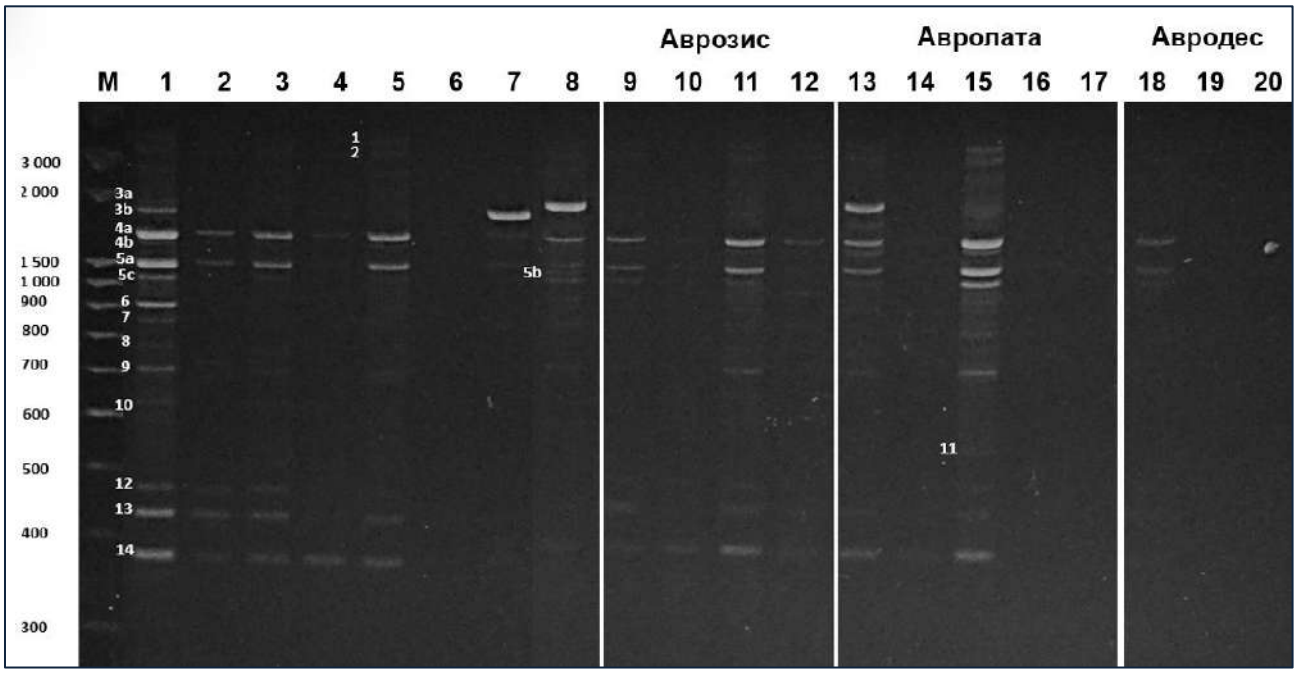


Рис. 3.14. Розділення продуктів ампліфікації з Pm2-3-L + Pm2-4-L та ДНК: 1 – Аврори, 2 – Вдалої, 3 –Панни, 4 – Лелеки, 5 – Одеської 267, 6 – Селянки, 7 – Тіри, 8 – Ніконії, 9 –Аврозису, 10 – лінії-похідної Аврозису res 141, 11 – групи стійких рослин для res 141, 12 – групи уражених рослин для res 141, 13 – Авролати, 14 та 15 – різні зразки лінії-похідної Авролати res 193, 16 – групи стійких рослин для res 193, 17 – групи уражених рослин для res 193, 18 – Авродесу, 19 – групи стійких рослин для Авродесу, 20 – групи уражених рослин для Авродесу. M – маркер молекулярних мас 100bp DNA Ladder (Solis Biodyne).

Спектри з комбінацією Pm3-5-R + Pm3-3-R є менш різноманітними (рис. 3.15). У випадках, де ампліфікація відбувається, стійку групу рослин та уражену, об’єднану для амфідиплоїда Аврозис, відрізнити неможливо. Амфідиплоїд та його лінія res141 мають компонент під номером 4, який відсутній у груп ДНК. Генотипи з хроматином від Авролати відмінні між собою тільки за компонентом 3, який має стійка група, компонент 4 є у всіх, решта – відсутня.

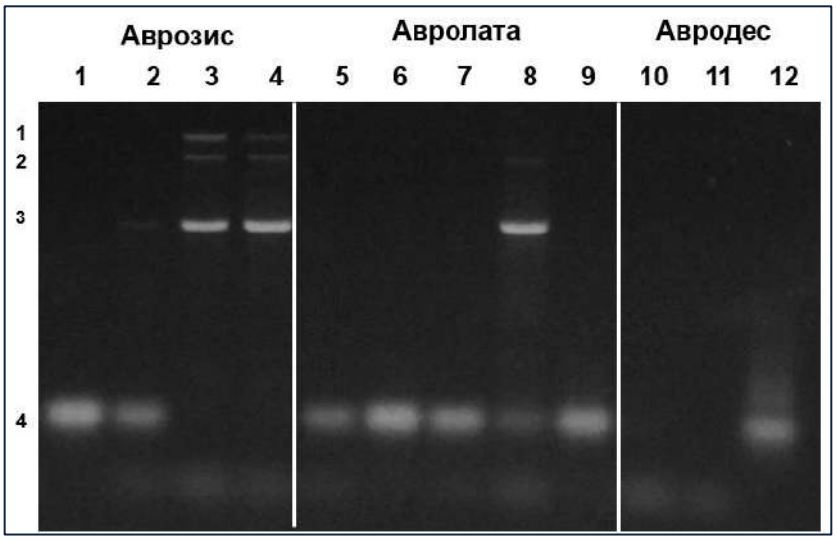


Рис. 3.15. Розділення продуктів ампліфікації з Pm3-5-R + Pm3-3-R та ДНК: 1 – Аврозису, 2 – інтрогресивної лінії-похідної Аврозису res141, 3 – групи стійких рослин для res 141, 4 – групи уражених рослин для res 141, 5 – Авролати, 6-7 – різні зразки лінії-похідної Авролати res 193, 8 – групи стійких рослин для res 193, 9 – групи уражених рослин для res 193, 10 – Авродесу, 11 – групи стійких рослин для Авродесу, 12 – групи уражених рослин для Авродесу.

У випадку Авродесу тільки з ДНК від ураженої групи є компонент 4, який, ймовірно, подвійний. Компонент номер 3 є у обох груп ДНК для Аврозису та резистентної групи Авролати. Гібриди з інтрогресивними лініями Аврозису та Авролати отримували з різними сортами, Вдалою та Панною, Одеською 267 та Авророю, відповідно. Амфідиплоїди відрізняються походженням третього субгеному, Аврозису має геном S^{sh} від *Ae. sharonensis*, Авролата – U від *Ae. umbellulata*. Спільним для цих двох амфідиплоїдів є тетракомпонент пшениці м'якої Аврора, послідовності якого, можливо, і ампліфікувалися.

Придатною комбінацією для диференціювання груп рослин на стійких та уражених за допомогою поєднання методик RGAP та BSA є тільки комбінація Pm2-3-L + Pm2-4-L серед тих, що спробували. Для інтрогресивних ліній Авротіки, відмінності є саме у різній рухливості основного компонента спектру. З цією комбінацією, яка поєднує два праймери до різних частин гена *Pm2*, отримали 4 компоненти у спектрі. Третій компонент, який

ампліфікований з ДНК з групи зі стійкими та ураженими генотипами, є і у рослин з проміжною стійкістю, ДНК з яких ампліфікували окремо. Цей компонент має різну рухливість для стійких та уражених груп у випадку ліній tica1130, tica1187, tica1063 та tica1061, tica1103. Інтерес викликали амплікони, які не тільки відмінні між двома констрастними фенотипами, але одночасно група резистентних була відмінною від ампліконів, отриманих з ДНК рослин з проміжною стійкістю. Молекулярний фенотип стійкої групи для лінії tica1187 є відмінним у випадку порівняння з ураженою, але таким же, як і для рослини першого покоління з оцінкою 7 за дев'ятибальною шкалою (13/9, оцінка 7). Така рослина у польових умовах мала поодинокі пустули на листках нижнього ярусу (рис. 3.16).

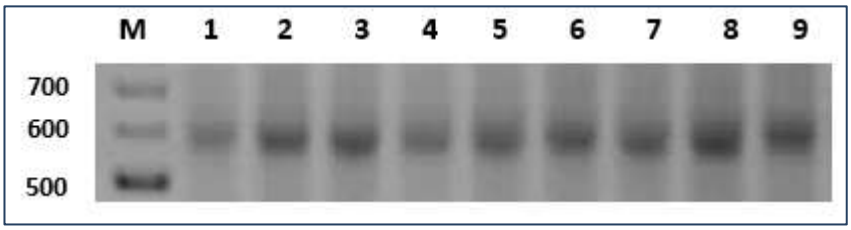


Рис. 3.16. Розділення продуктів ампліфікації з Pm2-3-L + Pm2-4-L та ДНК: 1 – групи стійких рослин для tica1187; 2 – групи уражених рослин для tica1187; гібридів F_1: 3 – 10/1 pm7; 4 – 10/11 pm4; 5 – 10/16 pm7; 6 – 10/17 pm7; 7 – 13/1 pm4; 8 – 13/8 pm7; 9 – 13/9 pm7. M – маркер молекулярних мас Thermo Scientific™ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder.

У випадку лінії tica1049 під час ампліфікації з ДНК з ураженої групи утворюється мало продукту, що не дозволяє точно визначити чи відмінний цей амплікон від амплікону з іншої групи (рис.3.17). Такий результат є повторюваним. Амплікон з резистентної групи не відрізняє її від двох генотипів з проміжною стійкістю з першого (16/58 pm7) та другого покоління (1034/1). З іншими генотипами (16/57 pm7, 1036/2 та 1037/4), які мали певні ураження, ампліфікація не відбувалася.

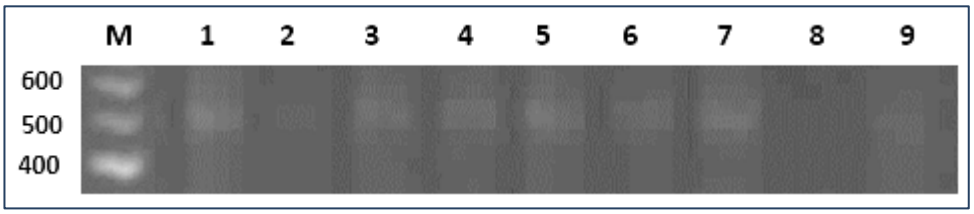


Рис. 3.17. Розділення продуктів ампліфікації з Pm2-3-L + Pm2-4-L та ДНК: 1 – групи стійких рослин для tica1049; 2 – групи уражених рослин для tica1049; гібридів F_1: 3 – 16/20 pm5; 4 – 16/25 pm5; 5 – 16/31 pm5; 6 – 16/32 pm5; 7 – 16/33 pm5; 8 –16/37 pm4; 9 – 16/47 pm5. M – маркер молекулярних мас Thermo Scientific™ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder.

Для груп, об'єднаних для лінії tica1075, ситуація протилежна – ампліфікація не відбувається зі стійкою групою. Якщо ампліфікувати окремо ДНК від кожної стійкої рослини з групи, то ампліфікація є тільки з частиною генотипів. Між групою уражених рослин та гібридом другого покоління 687/9 відсутня різниця у рухливості компоненту, проте їхні амплікони мають більшу рухливість, порівняно з ампліконом від 713/4 (рис. 3.18). Цей гібрид у наступному поколінні мав незначні ураження, у другому поколінні (попередньому) рослини не мали ознак ураження, тому таку ДНК ампліфікували окремо. Для рослинного матеріалу для лінії tica1084 основний амплікон не дозволяє вирізнити жоден з генотипів за вийнятком 965/9, з яким ампліфікація не відбулася.

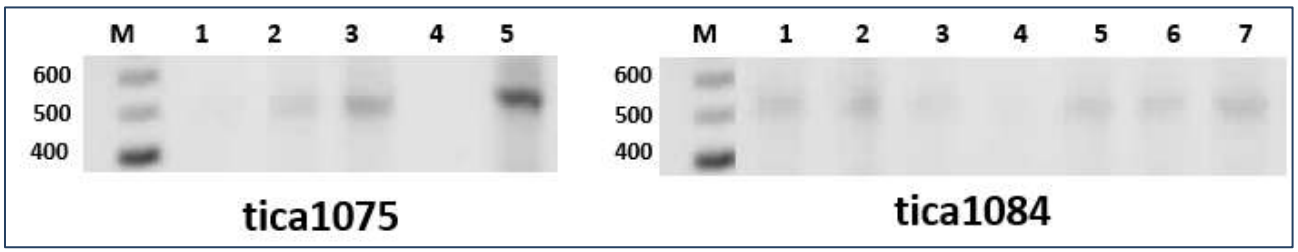


Рис.3.18. Розділення продуктів ампліфікації з Pm2-3-L + Pm2-4-L з ДНК рослин, об'єднаними лініями tica1075 (1 – група стійких рослин для tica1075; 2 – група уражених рослин для tica1075; гібриди F_2: 3 – 687/9, 4 – 711/2, 5 – 713/4) та tica1084 (1 – група стійких рослин для tica1084; 2 – група уражених

рослин для tica1084; гібриди F_2: 1 – 961/1, 2 – 965/9, 3 – 975/10 та гібриди F_1: 4 – 7/7 pm3, 5 – 7/8 pm4). М – маркер молекулярних мас Thermo Scientific™ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder.

Інформативними є амплікони, отримані з групами для ліній tica1063 та tica1061, tica1130, tica1103. Амплікон для резистентної групи відрізняє її від чутливої та не схожий на генотипи, які мали незначні ураження (рис. 3.19). В такому випадку ДНК з набору рослин резистентної групи ампліфікували окремо, щоб визначити котрий з генотипів забезпечує цю різницю.

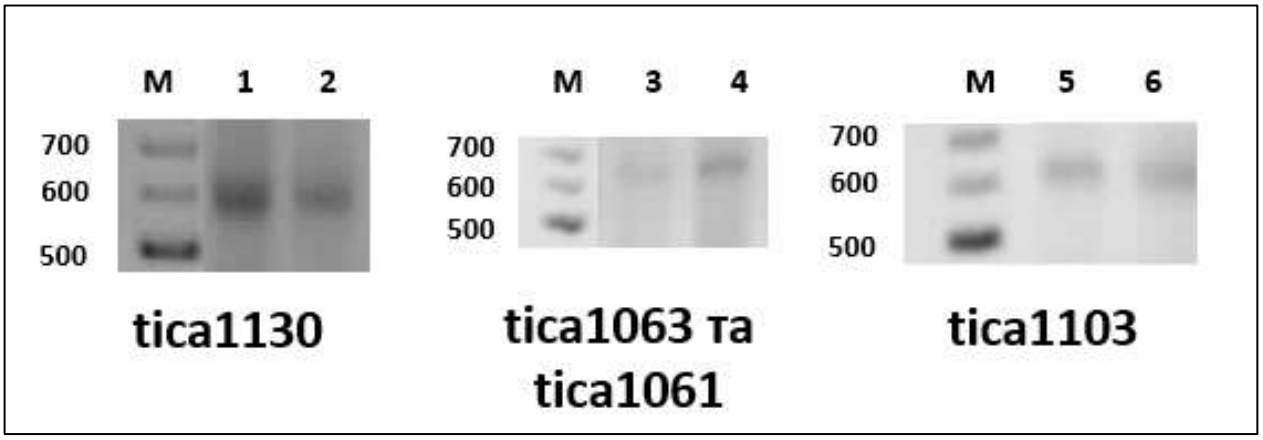


Рис.3.19. Розділення продуктів ампліфікації з Pm2-3-L + Pm2-4-L та ДНК: 1 – групи стійких рослин для tica1130; 2 – групи уражених рослин для tica1130; 3 – групи стійких рослин для tica1063 та tica1061; 4 – групи уражених рослин для tica1063 та tica1061; 5 – групи стійких рослин для tica1103; 6 – групи уражених рослин для tica1103. М – маркер молекулярних мас Thermo Scientific™ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder.

Для відібраних інтрогресивних ліній ампліфікували окремо ДНК не тільки з резистентної групи, а і з чутливої. Це обумовлено бажанням знайти ті генотипи, які забезпечують різницю між групами, та щоб при порівнянні сиквенсів цих ампліконів прослідкувати які зміни структури нуклеотидних послідовностей забезчечують різницю між гібридами не лише за електрофоретичними спектрами, а і за реакцією на патоген. В усіх випадках

відібрані для подальшої роботи гібриди другого покоління. Наприклад, для лінії tica1130 – це рослини 802/2, 805/6, 811/2 (рис. 3.20). У випадку ліній tica1063 та tica1061 відібрано 3 рослини, з tica1103 – 5 рослин. З рештою стійких генотипів амплікони були схожими на амплікон отриманий з ДНК від уражених генотипів, тому на такі рослини незважали.

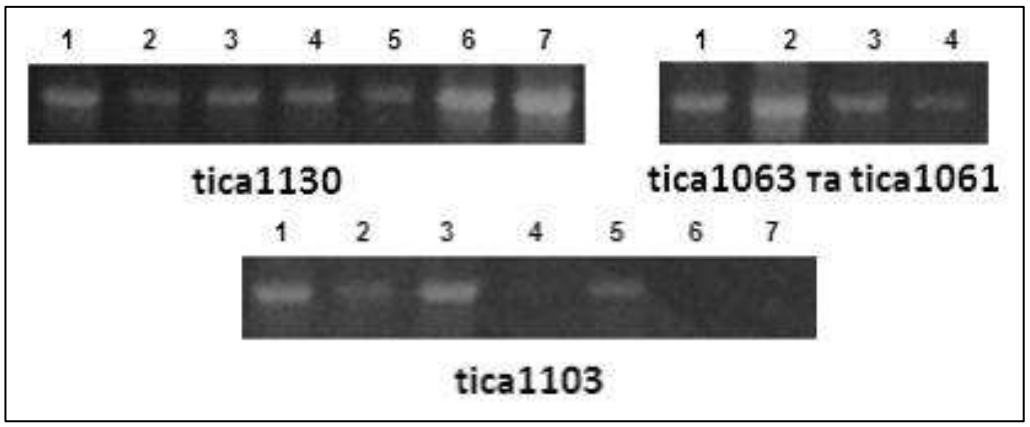


Рис. 3.20. Електрофоретичні спектри отримані за ампліфікації з комбінацією Pm2-3-L + Pm2-4-L та ДНК окремих рослин, для створення яких залучали інтрогресивні лінії tica1130 (1 – група стійких рослин, 2 – група чутливих рослин; гібриди F_2: 3 – 802/2, 4 – 805/6, 5 – 811/2, 6 – 825/11, 7 – 825/13), tica1063 та tica1061 (1 – група стійких рослин, 2 – група чутливих рослин; гібриди F_2: 3 – 1002/2, 4 – 1002/3), tica1103/1 (1 – група стійких рослин, 2 – група чутливих рослин; гібриди F_2: 3 – 766/8, 4 – 769/1, 5 – 770/1, 6 – 901/1, 7 – 901/3).

Рухливість компонентів спектру для ліній tica1063 та tica1061, tica1103 знаходиться в межах між 600 та 700 парами основ. Продукт утворений з групами для лінії tica1130 є меншим, орієнтовно між 600 та 500 п.о. Серед гібридів, об’єднаних лінією tica1130, немає ампліконів, які б значно відрізнялися молекулярною масою від ампліконів двох груп та були б наближеними до молекулярної маси у 600-700 п.о. Для решти груп ліній tica1049, tica1187, tica1075 амплікони знаходяться в межах між 500 та 700 п.о. з певними варіюваннями. В одну комбінацію поєднані праймери, створені до

послідовностей *Pm2*, які кодують NB-ARC домен та домен, подібний до протеїнкінази. Ген належить до родини генів NLR, яку вважають найбільш еволюційно динамічною групою. Для локусів NLR у злаків та їхніх дикорослих предків характерне широке варіювання за кількістю копій та нуклеотидного вмісту їхніх сиквенсів. Відмінності між компонентами, отриманими з групами ДНК для згаданих ліній могли виникнути через вставку / делецію нуклеотидів. Щоб визначити які саме зміни відбулися потрібно порівнювати сиквенси отриманих компонентів спектру, отриманих з ДНК окремих гібридів. Крім того, між передбачуваними місцями гібридизації праймерів знаходиться і некодувальна частина гена, що теж могло вплинути на результат. Це припущення робиться на основі біоінформатичного аналізу сиквенсів гена та зазначеної комбінації праймерів. Некодувальні ділянки є більш мінливими за нуклеотидним складом. Щоб визначити котрі зміни, ймовірно, можуть бути пов'язані з втратою стійкості варто також співставляти послідовності, отримані від уражених рослин, які відрізнялися від стійких за рухливістю амплікону. Стійкі та уражені гібриди при цьому мають мати спільне походження, тобто мати серед батьків певну інтрогресивну лінію Авротіки. Можна і провести порівняння послідовностей, отриманих від гібридів різного походження, щоб визначити котрі послідовності є для них спільними та між якими групами, та ідентифікувати послідовність, яка можливо пов'язана зі стійкістю.

В межах популяцій, які потенційно мають генетичний матеріал від ліній tica1049, tica1075, tica1084 та tica1187, відсутня різниця між групами ДНК (стійкою, ураженою) чи між стійкою групою та ампліконами від рослин, які незначною мірою є ураженими. Тому є припущення, що відмінності між рослинами на рівні організму обумовлені не тільки наявністю / відсутністю послідовності ДНК, а і епігенетичними модифікаціями таких послідовностей чи подіями на рівні РНК, білків або для таких генотипів ідентифікована послідовність не є критичною для розвитку стійкості.

З відібраними чотирнадцятьма комбінаціями праймерів, створеними за методикою RGAP, аналізували рослиннний матеріал, створений за участі

інтнтрогресивних ліній амфідиплоїдів Аврозису, Авродесу та Авролати. Так само, як і з рослинним матеріалом, створеним за участі Авротіки, ампліфікували групи ДНК від рослин з контрастними фенотипами та ДНК від окремих рослин. Частина таких рослин у другому чи третьому поколінні розщепилися чи змінили оцінку в поколіннях (табл. 3.16). Тому кількість гібридів, залучених у створення груп ДНК ще зменшилась.

Таблиця 3.16

Характеристика рослин за ознакою стійкості, ДНК від яких не включали у групи

Гібрид	Оцінка у другому → третьому поколіннях
Гібриди F_2, створені за участі Аврозису	
303/11	чутливий → pm10
306/14	чутливий → pm20
309/15	чутливий → pm20
309/6	стійкий → pm20
310/10	стійкий → pm20
310/8	стійкий → pm40
Гібриди F_2, створені за участі Авродесу	
781/1	стійкий → розщепилися
783/13	чутливий → розщепилися

Продовження табл. 3.16

784/14	стійкий → розщепилися
785/5	стійкий → розщепилися
789/9	стійкий → розщепилися
Гібриди F_2, створені за участі Авролати	
792/13	чутливий → розщепилися
793/15	чутливий → розщепилися
799/8	стійкий → розщепилися

Можна запропонувати декілька причин зміни оцінки з покоління в покоління:

- стійкість гібриду попереднього покоління була забезпечена домінантним геном / генами, який міг бути втрачений або його послідовність зазнала змін;
- рослини взаємодіяли з іншими расами патогенів за інших умов довкілля;

- стійка / чутлива рослина у попередньому поколінні була гетерозиготою, що призвело до розщеплення в наступному поколінні.

З чотирнадцяти використаних комбінацій праймерів тільки з однією вдалося отримати компоненти спектру, які б дозволили розмежувати стійку групу рослин та уражених за різною рухливістю одного і того ж компонента. Придатною виявилась і одна комбінація, створена з праймерів до *Pm2*. З Pm2-3-L + Pm2-4-L з гібридами-похідними Авродеса та Pm8-LRR-L + XLRRrev у випадку рослинного матеріалу, пов'язаного з Аврозисом. Перша комбінація праймерів має фланкувати частини гена *Pm2*, заховплюючи некодувальну частину. У другу комбінацію поєднані праймери, які створені до послідовностей, які кодують LRR, гену *Pm8* пшениці м'якої та *Xa21* рису. Інші пари праймерів є неінформативними, оскільки різниця між групами рослин була у наявності чи відсутності компонента спектру.

Для Pm2-3-L + Pm2-4-L розмір мажорного продукту знаходиться в межах між 500 та 600 пар нуклеотидів (рис.3.21). В межах груп Аврозису та Авролати, які є контрастними за фенотипом різниці за основним компонентом спектру немає, за мінорними компонентами генотипи відрізняються наявністю / відсутністю певного компоненту. Ампліфікація не відбулася з частиною ДНК гібридів другого покоління з проміжною стійкістю: 303/11, 309/15, 310/8 (для Аврозису) та 792/13, 793/15 (для Авролати). У випадку Авродесу амплікон групи стійких (близько 500п.о.) відрізняється за електрофоретичним спектром від амплікону групи уражених рослин (близько 600п.о.). Є відмінність основного компоненту з ДНК стійких рослин та рослин з проміжною стійкістю. З ДНК 785/5 (F_2) ампліфікація не відбулась. Основний компонент у спектрі для 784/14, 784/4, 785/5 відсутній, для 783/13 він є подвійним та менш рухливим, порівнянно з компонентами для групової ДНК. Різниця між групою ДНК від уражених рослин та 781/1 відсутня, рослина 789/9 відмінна від обох груп та її компонент спектру є більш рухливим, знаходиться між 400-500п.о. Гібриди F_2 783/13 та 781/1, хоч в них і змінився прояв ознаки у різних поколіннях, проте

амплікони, отримані з їхньою ДНК, відібрали для подальшої роботи за наявною різницею у рухливості ампліконів під номером десять.

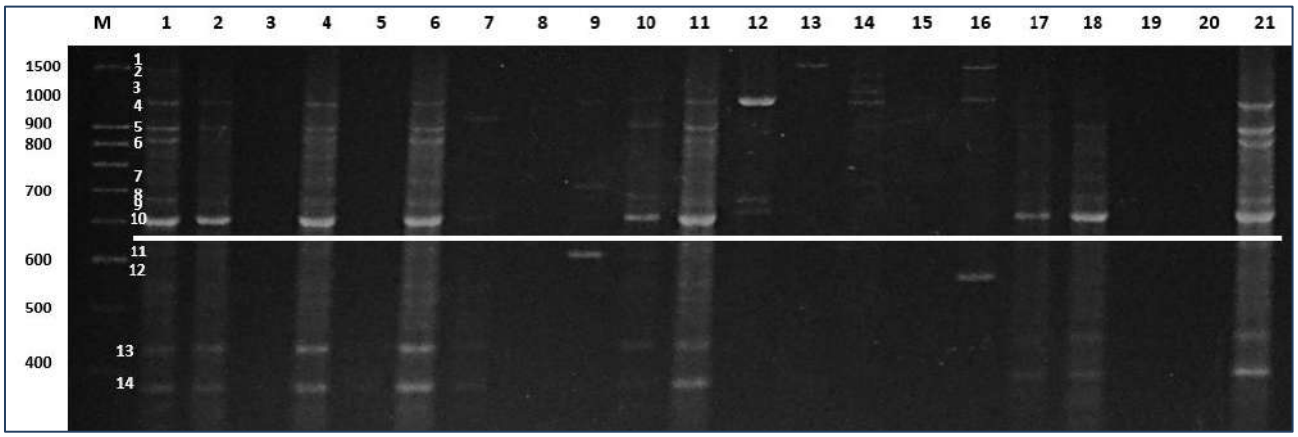


Рис. 3.21. Розділення продуктів ампліфікації з комбінацією праймерів Pm2-3-L + Pm2-4-L та ДНК рослин, створених за участі амфідиплоїдів: 1 – група резистентних гібридів для Аврозису; 2 – група чутливих гібридів для Аврозису; 3 – 303/11; 4 – 306/14; 5 – 309/15; 6 – 309/6; 7 – 310/10; 8 – 310/8; 9 – група резистентних гібридів для Авродесу; 10 – група чутливих гібридів для Авродесу; 11 – 781/1; 12 – 783/13; 13 – 784/14; 14 – 784/4; 15 – 785/5; 16 – 789/9; 17 – група резистентних гібридів для Аврола ти; 18 – група чутливих гібридів для Аврола ти; 19 – 792/13; 20 – 793/15; 21 – 798/8. М – маркер мас 100bp DNA Ladder Solis Biodyne.

З комбінацією праймерів Cre3LrF + XLRRrev є два основні компоненти в спектрі: перший має рухливість між 600 та 700п.о., другий – між 500 та 600п.о. (рис.3.22). Ці компонентами з ДНК груп та окремих рослин, з якими відбулася ампліфікація, є мономорфними. Гібрид 303/11 та 310/10 не мають першого основного компонента, що їх відрізняє, як від групи стійких, так і уражених рослин. З ДНК 310/8 ампліфікація відсутня, як і з ДНК резистентної групи для Авродесу. З ДНК згаданого амфідиплоїду ампліфікація є успішною з чутливою групою та гібридом F_2 781/1, за отриманими компонентами вони не відрізняються між собою. Різниця між групами між собою та гібридом 799/8 для Аврола ти також відсутня. З гібридами 792/13 та 793/15 ампліфікація

відсутня. Між першим та другим компонентами спектру є більша кількість ампліконів, які мало відрізняються за рухливістю і вони не пронумеровані. Такі компоненти отримані з ДНК груп та окремих генотипів: ДНК резистентної групи для Аврозису, чутливої групи для Аврозису, 306/14, 309/15, 309/6, чутливої групи для Авродесу, 781/1, резистентної групи для Авролати.

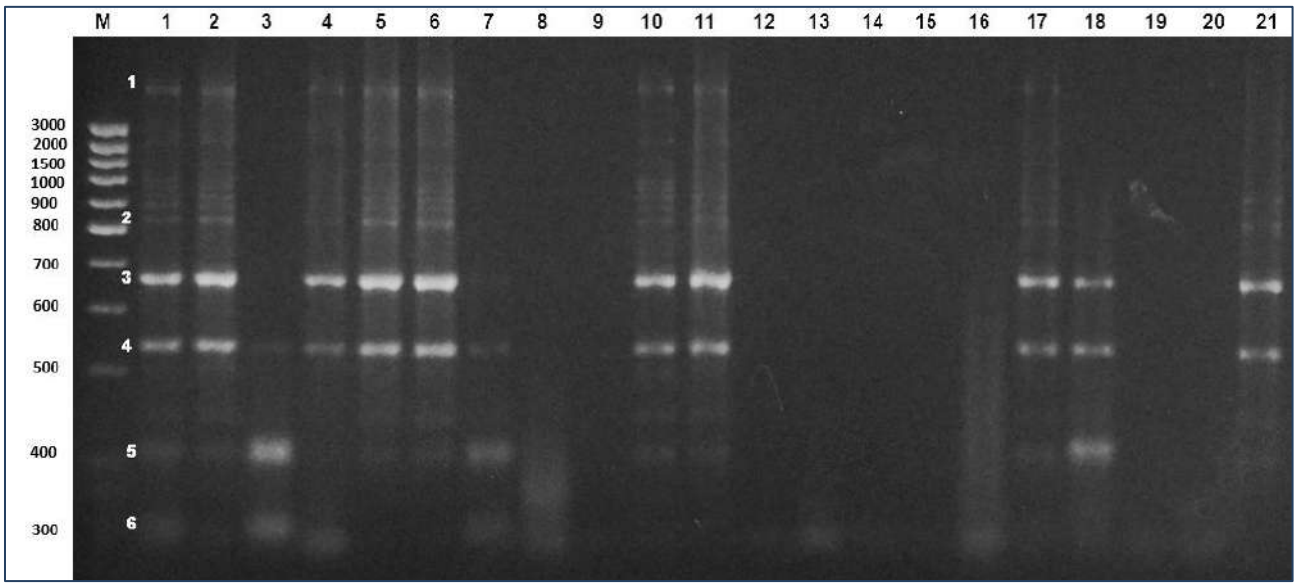


Рис. 3.22. Розділення продуктів ампліфікації з комбінацією праймерів Cre3LrF + XLRRrev та ДНК рослин, створених за участі амфідиплоїдів: 1 – група резистентних гібридів для Аврозису; 2 – група чутливих гібридів для Аврозису; 3 – 303/11; 4 – 306/14; 5 – 309/15; 6 – 309/6; 7 – 310/10; 8 – 310/8; 9 – група резистентних гібридів для Авродесу; 10 – група чутливих гібридів для Авродесу; 11 – 781/1; 12 – 783/13; 13 – 784/14; 14 – 784/4; 15 – 785/5; 16 – 789/9; 17 – група резистентних гібридів для Авролати; 18 – група чутливих гібридів для Авролати; 19 – 792/13; 20 – 793/15; 21 – 798/8. М – маркер мас 100bp DNA Ladder Solis Biodyne. M – маркер мас 100bp DNA Ladder Solis Biodyne.

Частина ампліконів, отриманих з RLRRrev + XLRRrev, розташовувалася блоками, це компоненти 1-3 та 4-7 (табл. 3.17). З частиною генотипів ампліфікація відсутня. Обидва праймери, які входять у комбінацію створені до послідовностей, які фланкують повтори, багаті на лейцин. Ділянки ДНК, які їх кодують переважно розташовуються одна за одною і таких ділянок може бути

декілька, вони можуть бути розмежовані або некодуючими ділянками, або іншими кодуючими.

Таблиця 3.17

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманих з RLRRrev + XLRRrev

	Генотип	Нумерація компонентів										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	стійка група для Аврозису	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	чутлива група для Аврозису	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
3	303/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	306/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
5	309/15	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1
6	309/6	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
7	310/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	310/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	стійка група для Авродесу	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	чутлива група для Авродесу	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1
11	781/1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
12	783/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	784/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	784/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	785/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	789/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	стійка група для Авролати	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
18	чутлива група для Авролати	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
19	792/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	793/15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	798/8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Подібне розташування компонентів блоками отримали і з комбінацією Pm8-LRR-L + XLRRrev, де 1-3 та 5 з 6 компоненти розташовані поруч (рис.3.23) та Cre3k3 + XLRRrev (1-3 та 6-7) (табл. 3.18). З частиною ДНК від рослин з проміжною стійкістю та групових ДНК ампліфікація не відбувалася. Перший, сьомий та восьмий компоненти спектру для першої

комбінації, отримані з груповими ДНК для Авродесу, мають різну рухливість між групою чутливих та стійких. Такі компоненти викликають інтерес, бо за їхньою допомогою з подальшим отриманням сиквенсу можна спробувати прослідкувати яких змін зазнала ця ділянка геному, яку обмежували використані праймери, та спробувати з'ясувати чому вона відрізняє рослини, контрастні за фенотипом.

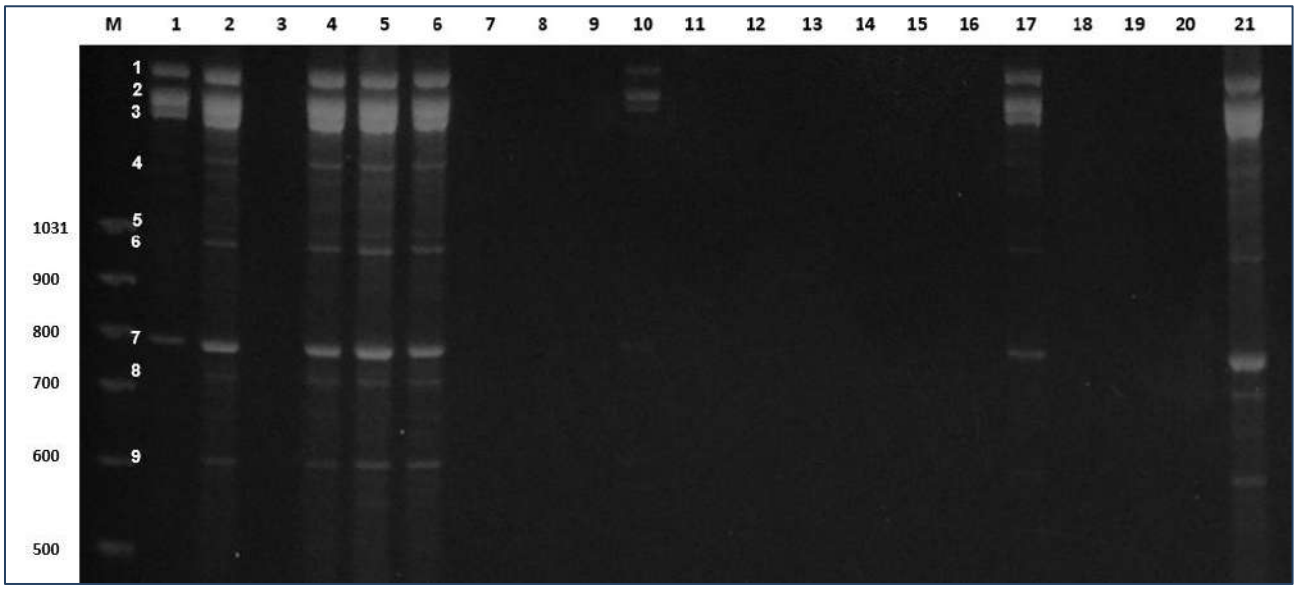


Рис. 3.23. Розділення продуктів ампліфікації з комбінацією праймерів Pm8-LRR-L + XLRRrev та ДНК рослин, створених за участі амфідиплоїдів: 1 – група резистентних гібридів для Аврозису; 2 – група чутливих гібридів для Аврозису; 3 – 303/11; 4 – 306/14; 5 – 309/15; 6 – 309/6; 7 – 310/10; 8 – 310/8; 9 – група резистентних гібридів для Авродесу; 10 – група чутливих гібридів для Авродесу; 11 – 781/1; 12 – 783/13; 13 – 784/14; 14 – 784/4; 15 – 785/5; 16 – 789/9; 17 – група резистентних гібридів для Аврола ти; 18 – група чутливих гібридів для Аврола ти; 19 – 792/13; 20 – 793/15; 21 – 798/8. М – маркер мас MassRuler™ Low Range DNA Ladder, Thermo Scientific™.

Таблиця 3.18

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманих з Cre3k3 + XLRRrev

	Генотип	Нумерація компонентів													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	стійка група для Аврозису	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
2	чутлива група для Аврозису	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1
3	303/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	306/14	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1
5	309/15	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
6	309/6	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1
7	310/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	310/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	стійка група для Авродесу	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	чутлива група для Авродесу	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
11	781/1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1
12	783/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
13	784/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	784/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	785/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	789/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	група res для Аврolати	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
18	група sus для Аврolати	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
19	792/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	793/15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	798/8	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1

Щоб визначити котра з рослин групи стійких та резистентних забезпечила різницю між ампліконами групових ДНК та комбінацією праймерів Pm8-LRR-L + XLRRrev ампліфікували окремо кожну ДНК, яка входила до складу груп. За результатами розділення ампліконів можна відібрати генотипи за рухливістю компонентів один, чотири та сім. У випадку груп за цими ж компонентами була знайдена різниця. Для подальшої роботи викликають інтерес амплікони під

згаданими номерами, отримані з ДНК гібридів другого покоління: 306/14, 309/15, 309/6 (рис. 3.24).

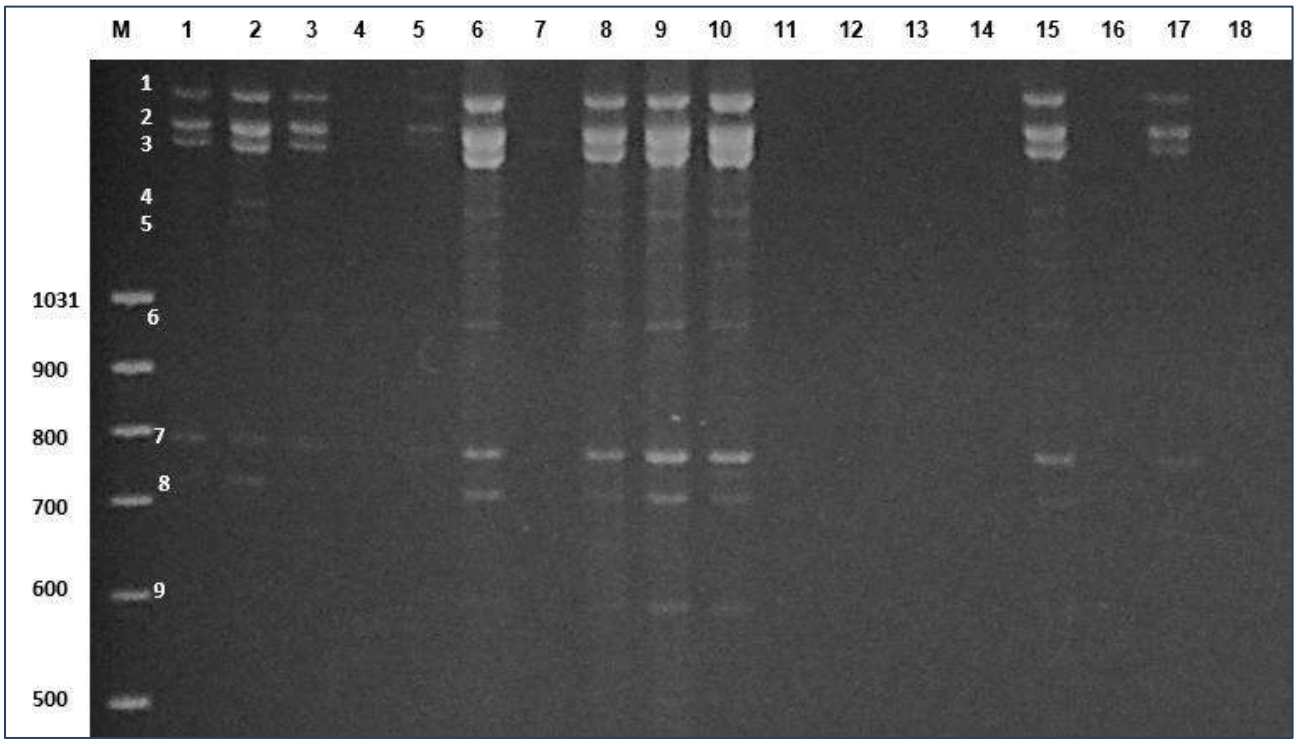


Рис.3.24. Розділення продуктів ампліфікації з комбінацією праймерів Pm8-LRR-L + XLRRrev та ДНК генотипів: 1 – Аврозису, 2 – інтрогресивної лінії-похідної Аврозису res141, 3 – Вдалої, 4 – Панни, 5 – група резистентних гібридів для Аврозису, 6 – група чутливих гібридів для Аврозису, 7 – 303/11, 8 – 306/14, 9 – 309/15, 10 – 309/6, 11 – 310/10, 12 – 310/8, 13 – 305/2, 14 – 306/5, 15 – 307/4, 16 – 309/9, 17 – 304/12 (7-17 – гібриди F_2), 18 – Аврора. М – маркер мас MassRuler™ Low Range DNA Ladder, Thermo Scientific™.

Для вивчення гібридів, які можуть мати генетичний матеріал від одного з амфідиплоїдів, які вважаємо джерелом бажаних послідовностей, отримано інформативні спектри з двома комбінаціями праймерів. З Pm2-3-L + Pm2-4-L та трьома лініями-похідними Авротіки: tica1130 (з ДНК п’яти рослин), tica1063 та tica1061 (2 рослини), tica1103 (5 рослин). З тією ж комбінацією та ДНК від рослин, які можуть мати генетичний матеріал від Авродесу (2 рослини). Другою парою праймерів, яка дозволила знайти бажану різницю, є Pm8-LRR-L

+ XLRRrev. З цими праймерами та групами, створеними для Авродесу, отримано різницю рухливості одразу за трьома компонентами спектру, для подальшої роботи відібрано три рослини. Неінформативними комбінаціями для диференціації груп ДНК, отриманих від контрастних генотипів, які довзоляли знайти різницю між батьківськими генотипами є: Cre3LrF + XLRRrev, RLRRrev + XLRRrev, Cre3LrF + Cre3_P-loop, Pm8-LRR-L + Cre3k3, RLLRrev + Cre3_P-loop, Pm8-LRR-L + Cre3k3, Cre3k3 + Cre3_P-loop, Pm8-LRR-R + Pm8-MHD-L та Cre3k3 + XLRRrev. Електрофоретичні спектри, переведені у двійкову систему та занесені у таблиці, для комбінацій описаних у цьому підрозділі наведені у додатку Е. Можливо, потрібно переглянути ефективність методу BSA для роботи з популяціями, які розщеплюються через часту відсутність ампліфікації з групами ДНК, ймовірно через велику кількість ДНК-матриць. Попри те, що цей метод зменшує обсяги роботи з великою кількістю рослинного матеріалу, але бажаним є все-таки отримати придатний для роботи результат, а не його відсутність. Або ж шукати шляхи вирішення відсутності ампліфікації з підбиранням концентрацій ДНК за яких ампліфікація відбувалася б.

3.6. Перебіг мейозу у материнських клітинах пилку у батьківських генотипів

Починали вивчення рослинного матеріалу за цитологічною стабільністю з аналізу особливостей мейозу у вихідних компонентів схрещувань – сортів пшениці м’якої та амфідиплоїда Авротіка. Напряму Авротіка не була залучена у схрещування, але вона дала початок інтрогресивним лініям, створеним за її участі та сорту Аврора. Інтрогресивні лінії залучали у схрещування з сортами для створення гібридів. Намагаємося саме від Авротіки, як від резистентного генотипу, переносити бажані послідовності, тому вивчали і її цитологічну стабільність.

Стабільність рослин під час мейотичного поділу визначається складом хромосом, які мають клітини гібридів, чи матимуть такі хромосоми партнера

для кон'югації. Є декілька типів кон'югації: еусиндез (нормальна), часткова, надкон'югація. Можлива і відсутність кон'югації. Еусиндез характеризується утворенням синапсів, починаючи з теломерних ділянок хромосом, між хромосомами однієї гомологічної групи. За часткової кон'югації відсутній генетичний контроль кон'югації між гомологами. Наслідком цього є утворення мультивалентів та унівалентів, які відставатимуть під час руху до полюсів та можуть конденсуватися та візуалізуються, як мікроядра в тетрадах. Мультиваленти можуть утворювати хромосомні мости. Кон'югація відсутня між хромосомами, які не мають гомологічних ділянок [146]. Цитологічно стабільними організмами є ті, що попри поєднання хроматину від двох батьків (один з них може мати хроматин чужинного походження) мають поділ без порушень. Термін використовують для опису відхилень від нормального поділу [147].

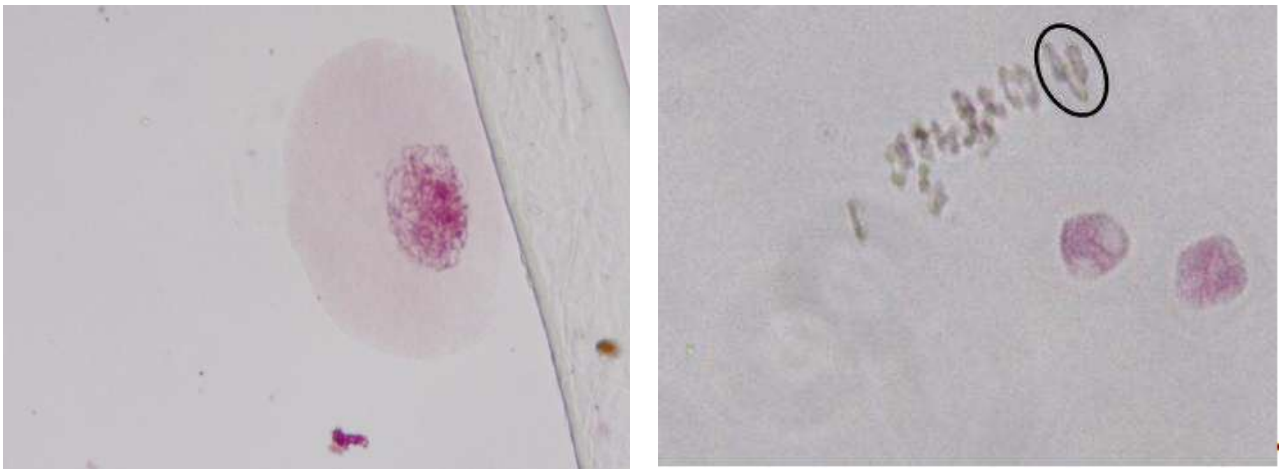
Для оцінювання цитологічної стабільності враховували:

- типи хромосомних асоціацій (відкриті та закриті біваленти, унівалентн, мультиваленти) під час М1 та їхні кількості. З перерахованих тільки закриті біваленти свідчитимуть про повну кон'югацію між хромосомами;
- здатність хромосом відставати під час руху до полюсів;
- наявність тріад та клітин з асинхронним поділом.

Порівнювали перебіг мейозу сортів та Авротіки, яка має з сортами два спільні субгеноми (А та В) та один геном, чужинний для пшениці. В межах кожного з геномів має відбуватися гомологічна кон'югація. Проте робили порівняння, щоб прослідкувати, чи впливає наявність геному Т на регулярність поділу.

3.6.1. Мейотичний поділ сортів пшениці м'якої. Реєстрували різні стадії, починаючи з інтерфази та профази, під час яких не спостерігали порушень поділу. Як приклад на рисунку 3.25 наведена клітина на стадії лептотени, під час якої хроматин сконденсований і хромосоми організовані у клубок. Профаза підрозділяється на підстадії залежно від молекулярних особливостей, які впливатимуть на організацію хроматину: лептотена, зиготена, пахітена,

диплотена. На цих етапах відбувається синапс між хромосомами та рекомбінація, такі події визначатимуть які хромосомні асоціації спостерігатимемо під час метафазної пластинки.

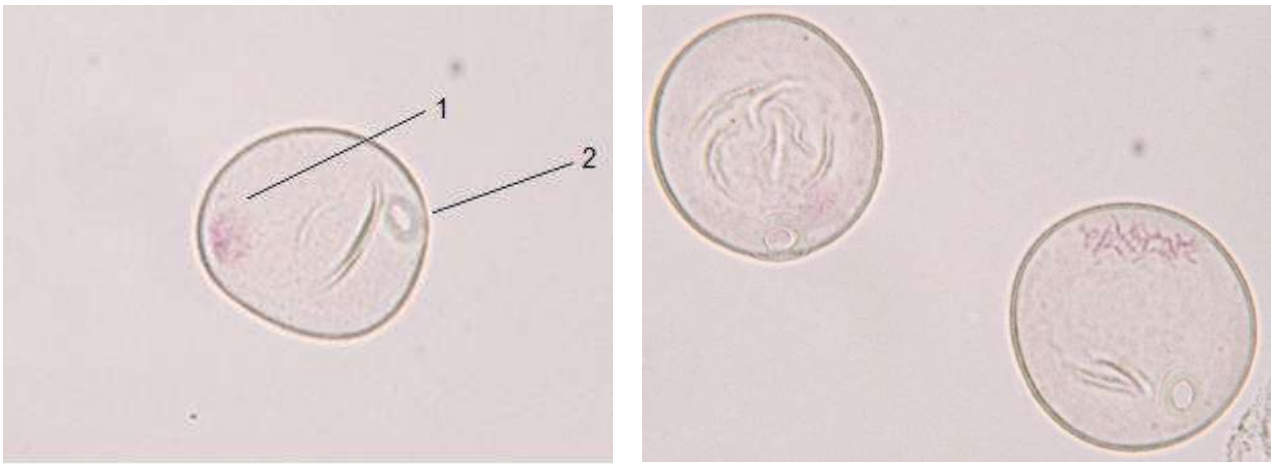


А Б

Рис. 3.25. Мікроспорогенез сортів пшениці м’якої Аврори (А) та Лелеки (Б) під час лептотени профази І та метафази І, відповідно.

Сорти характеризувалися, як цитологічно стабільні – у них утворювався 21 закритий біваленти. Це очікувано, оскільки в сортів відбувається кон’югація між гомологічними хромосомами в межах кожного із субгеномів. Кон’югація між гомеологами блокується активністю локусу *Ph1*, який вперше описали у 1958 році Рілей та Чапман (Riley та Chapman), спостерігаючи за поведінкою хромосом під час аналізу мейозу гексаплоїдних гібридів пшениці, які позбавлені хромосоми 5В, в складі якої і знаходиться згаданий локус [148]. У МКП сорту Аврора через житню транслокацію (1BL·1RS) можуть бути 1-2 відкриті біваленти. Ще одним прикладом відмінності кількості закритих біваленів від 21, є МКП Лелеки, яка має хромосомну асоціацію, схожу на мультивалент (див. рис.3.25 Б), для якої видно два біваленти, які з’єднані між собою. Однозначно сказати, що це мультивалент не можна, оскільки так могли розташуватися три закриті біваленти у полі зору. Інших випадків, відмінних від закритих біваленів, у складі МКП не спостерігали під час М1. Такий поділ сприяв рівномірному розподілу хромосом до полюсів, без утворення мікроядер

у складі клітин тетради. Кожна з клітин тетради, які є продуктами поділу материнської клітини пилку, є мікроспорами з гаплоїдним набором хромосом, які через мітотичні поділи розвинуться до пилкових зерен в подальшому до пилку (чоловічого гаметофіту). Пилкові зерна спостерігали у Ніконії (рис. 3.26), в її клітинах теж не було порушень.



А Б

Рис. 3.26. Мікрогаметогенез сорту пшениці м’якої Ніконія: А – пилкове зерно під час першого поділу мітозу, стадія профази (1 – ядро; 2 – пора); Б – метафаза першого поділу мітозу.

Отже, сорти пшениці м’якої характеризувалися, як цитологічно стабільні.

3.6.2. Мейотичний поділ МКП Авротіки. У Авротіки спостерігали відхилення від нормального поділу, який характерний для сортів, на різних стадіях за винятком інтерфази та профази, які проходили без відхилень. Під час метафази спостерігали уніваленти, закриті та відкриті біваленти, мультиваленти. Причиною цього може бути асинапсис або десинапсис. Під час асинапсису відсутня кон’югація хромосом у пахітені, як результат – утворюються уніваленти. Десинапсис характеризується передчасним розходженням хромосом у зиготені або ранньому діакінезі після кон’югації. Ці процеси можуть відбуватися у гібридних геномах. На процес кон’югації впливає і наявність гомологічних ділянок. Коли спостерігаються уніваленти з мультивалентами, то це може свідчити про наявність таких ділянок різного

походження у клітинах, які проходять поділ, або відбувається кон'югація між частково гомологічними ділянками або гомеологічними. Крім того, що активність *Ph1* блокує кон'югацію між гомеологами, є протидія йому – дія супресорів, зміна активності самого локусу. Гени-супресори були ідентифіковані у *Ae. speltoides*, *Am. muticum*. Супресорами у *Ae. speltoides* є *Su1*-Ph1 та *Su2-Ph1*, знаходяться в складі хромосом 3SL та 7SL, відповідно [149]. Для двох згаданих видів дія генів-супресорів сприятиме рекомбінації між хромосомами диплоїдного виду та гомеологічними хромосомами пшениці [149,150]. Хроматин різного походження в складі одного геному може впливати і на функціонування генів, які контролюють перехід клітини між стадіями поділу. Серед мультивалентів були триваленти та квадриваленти (табл. 3.19). Результати цього дослідження були опубліковані в [151].

Таблиця 3.19

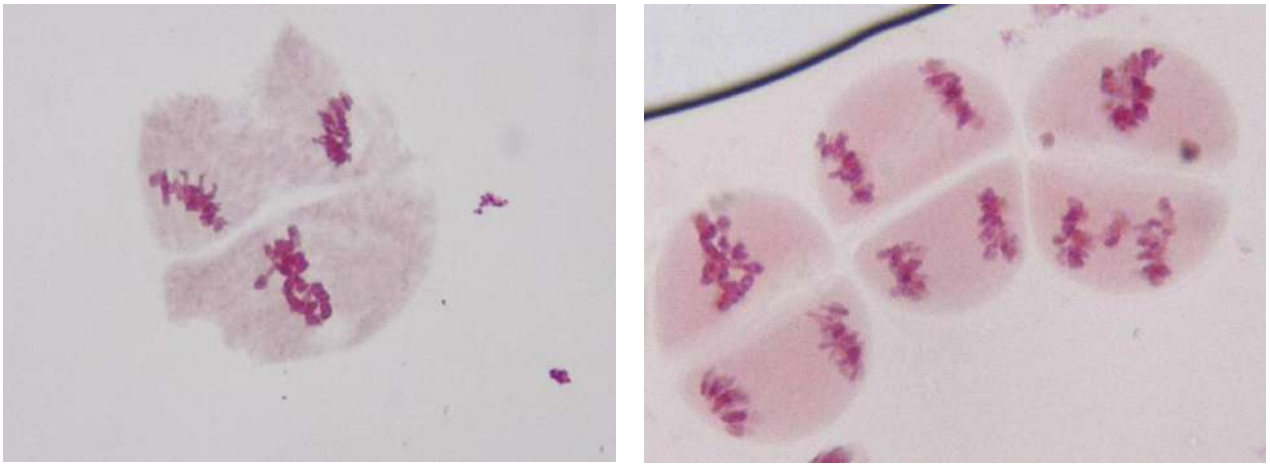
Хромосомні асоціації МКП Авротіки

Спостережувані хромосомні асоціації	Кількості МКП	Спостережувані хромосомні асоціації	Кількості МКП
$14^{\text{Пз}}+4^{\text{Пв}}+2^{\text{Ш}}$	1	$12^{\text{Пз}}+2^{\text{Пв}}+2^{\text{І}}+4^{\text{Ш}}$	9
$16^{\text{Пз}}+2^{\text{Пв}}+4^{\text{І}}$	2	$10^{\text{Пз}}+5^{\text{Пв}}+4^{\text{Ш}}$	14
$17^{\text{Пз}}+2^{\text{І}}+2^{\text{Ш}}$	3	$16^{\text{Пз}}+2^{\text{Пв}}+2^{\text{Ш}}$	15
$11^{\text{Пз}}+2^{\text{І}}+4^{\text{IV}}$	4	$13^{\text{Пз}}+6^{\text{Пв}}+4^{\text{І}}$	15
$16^{\text{Пз}}+3^{\text{Пв}}+4^{\text{І}}$	5	$15^{\text{Пз}}+5^{\text{Пв}}+2^{\text{І}}$	17
$10^{\text{Пз}}+8^{\text{Пв}}+6^{\text{І}}$	6	$12^{\text{Пз}}+6^{\text{Пв}}+2^{\text{Ш}}$	18
$15^{\text{Пз}}+4^{\text{Ш}}$	7	$15^{\text{Пз}}+4^{\text{Пв}}+4^{\text{І}}$	19
$14^{\text{Пз}}+5^{\text{Пв}}+4^{\text{І}}$	8	$16^{\text{Пз}}+4^{\text{Пв}}+2^{\text{І}}$	21
$14^{\text{Пз}}+4^{\text{Пв}}+3^{\text{І}}+1^{\text{Ш}}$	9	-	-

Серед спостережуваних, у складі клітин завжди були присутні закриті біваленти кількістю від 10 до 17. Унівалєнти могли бути у складі метафазної пластинки разом з мультивалентами, так і без них. Очікуваним є випадок, коли

у складі однієї пластинки є тривалент та унівалент одночасно. В такому випадку одна з хромосом не кон’югує з гомологом.

Хромосомі асоціації, які не є закритими бівалентами, лежать на віддалі від метафазної пластинки (переважно уніваленти) та відстають від руху решти хромосом на стадії анафази. Це може відбуватися через чужинний хроматин у складі таких хромосом, що може впливати на здатність мікротрубочок кріпитися до них та «тягнути» до полюсів. Якщо процес міграції порушений, то будуть утворюватися хромосомні мости. Їх розрив призводить до розходження до полюсів ацентричних хромосом. Причиною утворення мосту є і інверсія ділянки хромосоми (її оберт на 180°), в результаті чого утворюється петля на стадії профази (пахітена), яка буде впливати на кон’югацію хромосом [152,153]. Подальша їхня доля – бути конденсованими до стану мікроядер. В результаті першого поділу до полюсів клітини має відійти по гаплоїдному набору хромосом, а в результаті цитокінезу вони опиняться в двох різних клітинах. Далі слідує другий мейотичний поділ під час якого вже хроматиди у анафазі II рухалися до протилежних полюсів в межах однієї з двох клітин.



А Б

Рис. 3.27. Тріада клітин (А) та клітини, які перебувають на різни стадіях поділу (Б).

Починаючи з телофази II, між дочірніми клітинами формується перетинка, цей процес має бути синхронізований між клітинами діади. Приклади

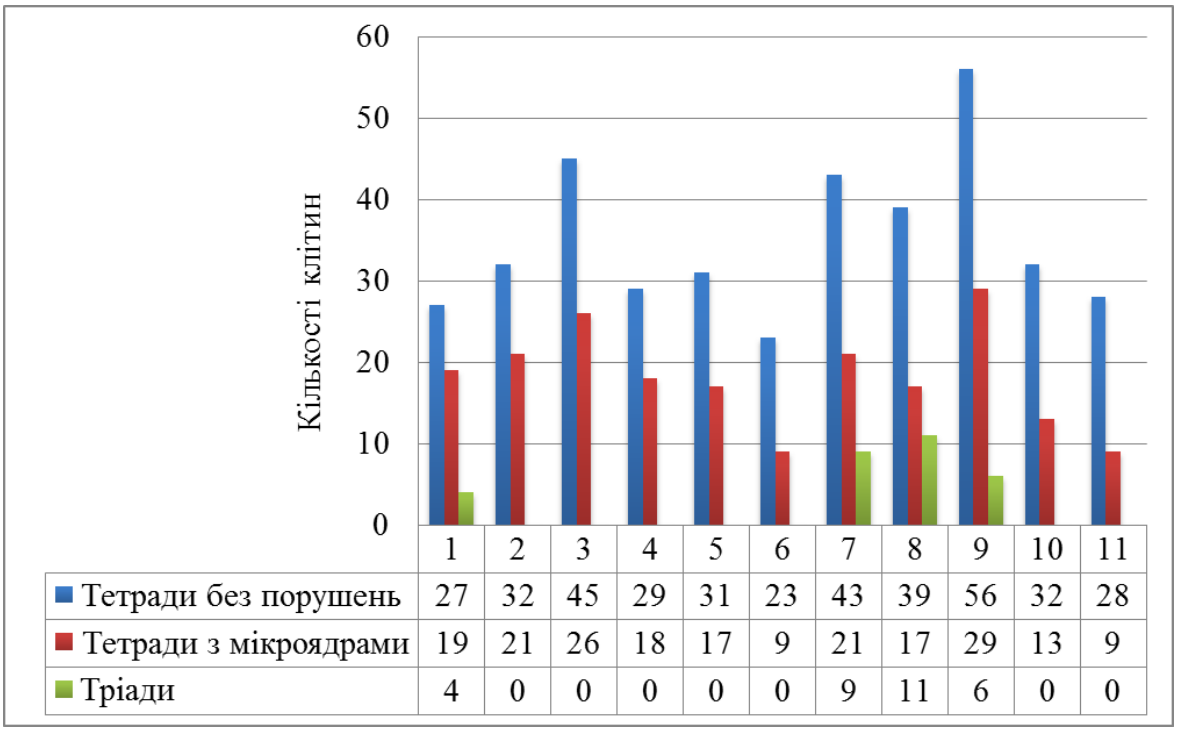
мікрофотографій таких клітин будуть наведені у підрозділах з описом гібридів, для яких були зареєстровані порушення. В результаті поділу утворюється тетрада мікроспор, кожна з яких дасть початок пилковому зерну з подальшим його розвитком до пилку (чоловічого гаметофіту). Крім тетрад, були і тріади (рис. 3.27 А), діади з клітинами на різних стадіях поділу (рис. 3.27 Б). Для гібридів між *Hordeum vulgare* та *Hordeum bulbosum* причиною асинхронності клітинного циклу є втрата центромерного гістону H_3. В цих гібридів відбувається також елімінація хромосоми одного з батьків [154].

На стадії тетрад підраховували кількості тетрад, які були без порушень, кількості тетрад з мікроядрами, тріад. За отриманими результатами, сорти є цитологічно стабільними, проте у Авротіки спостерігаються відхилення. Щоб визначити, чи дійсно амфідиплоїд є цитологічно нестабільним вираховували мейотичний індекс (МІ) за формулою:

$$\text{Мейотичний індекс} = \frac{T_н}{(T_н + T_{мя} + T_р + T_п)} \text{ x } 100\%, \qquad (3.1)$$

де $T_н$ – кількість тетрад без порушень, $T_{мя}$ – кількості тетрад з мікроядрами, $T_р$ – тріади, $T_п$ – поліади [153].

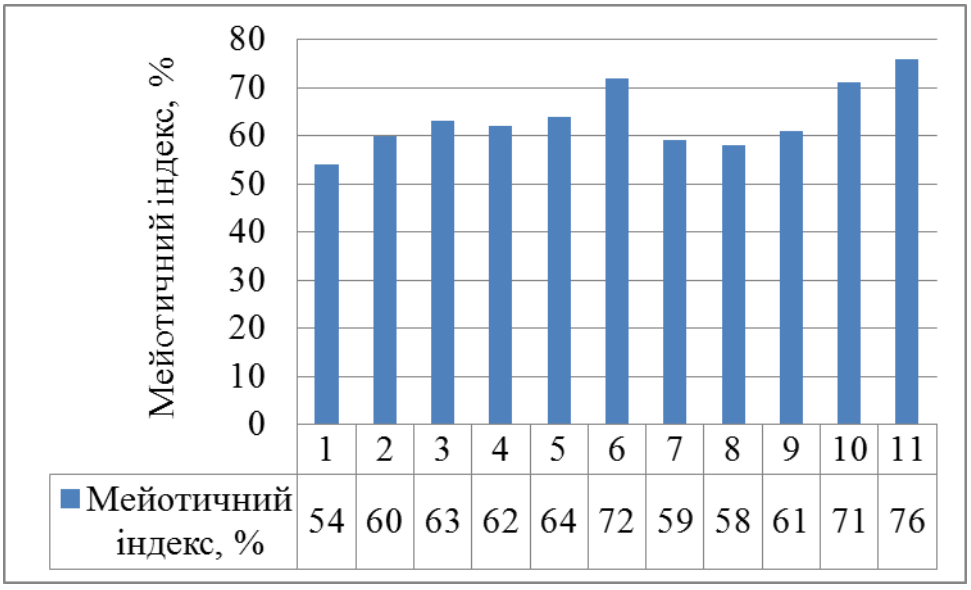
За даними розробників формули [155], цитологічно стабільними є рослини зі значенням МІ більше 90% через переважання тетрад без мікроядер. Були отримані результати для одинадцяти колосів, для яких і проводили розрахунки (рис. 3.28).



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Тетради без порушень	27	32	45	29	31	23	43	39	56	32	28
Тетради з мікроядрами	19	21	26	18	17	9	21	17	29	13	9
Тріади	4	0	0	0	0	0	9	11	6	0	0

Рис. 3.28. Кількості тетрад та тріад Авротіки.

В жодному з досліджених випадків МІ не перевищував 90%. Авротіка має нестабільний поділ, проте вона зберігає дослідну ознаку у поколіннях та нестабільність не завадила передати послідовності, які можна пов'язати зі стійкістю, інтрогресивним лініям, створеним за її участю. Отримані значення мейотичного індексу наведені на рис. 3.29.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Мейотичний індекс, %	54	60	63	62	64	72	59	58	61	71	76

Рис. 3.29. Мейотичний індекс Авротіки.

Чотири клітини тетради утримуються разом за рахунок калози. Після руйнування калозної оболонки (кінець другого поділу), мікроспороцити формують власну оболонку, завдяки мітотичному поділу вони розвиваються до пилкових зерен. На проходження мітозу впливає велика вакуоля, яка зміщує веретено поділу, що сприяє утворенню одного великого вегетативного ядра (менш компактне) та меншого генеративного (рис. 3.30). З одного генеративного ядра утвориться два спермії, які будуть залучені у подвійне запліднення. У злаків вони утворюються поки пилкове зерно перебуває ще в пиляку [156].

Рис. 3.30. Пилкове зерно Авротіки.

У Авротіки спостерігалися відмінності від поділу у сортів: утворення відкритих бівалентів, унівалентів, мультивалентів. Були замість тетрад і тріади, тетради могли містити мікроядра. Результати, наведені у цьому підрозділі, опубліковані у [151].

3.7. Аналіз мейозу гібридів, отриманих через схрещування інтрогресивних ліній-похідних Авротіки та сортів пшениці м’якої

На цьому етапі аналізували рослинний матеріал, який отриманий від схрещування набору інтрогресивних ліній-похідних Авротіки з сортами пшениці м’якої. Лінії могли бути, як материнською рослиною, так і донором

пилку для запилення сорту, тобто проводили реципрокні схрещування. Робили це, щоб прослідкувати поведінку ознаки та стабільність отриманих гібридів. Під час вивчення поділу Авротіки з'ясували, що вона є цитологічно нестабільною, проте стійкою. За її участі (материнський компонент схрещувань) та сорту Аврора (батьківський) отримано інтрогресивні лінії. Весь вміст цитоплазми (різні хромосомні асоціації) Авротіки потенційно міг потрапити до ліній. В складі не біваленті ймовірно і перебуває ділянка геному, яка контролює ознаку. Щоб перевірити, чи впливає напрямок схрещування і отримували реципроків. Отримані гібриди F_1 залишали для самозапилення у наступному році. F_2 також оцінювали за стабільністю у мейозі, щоб перевірити, чи зберігається у поколіннях стійкість до гриба та, чи мали МКП одного і того ж схрещування у різних поколіннях однаковий поділ чи все-таки вони різняться. Отже, спочатку наведемо характеристику гібридів F_1, як вихідного матеріалу, з порівнянням проходження мейозу за реципрокних схрещувань. Далі мова піде про поведінку хромосом у рослин F_2 та долю дослідної ознаки у нащадків F_1.

Отримані результати на стадіях, починаючи з профази I. Далі буде характеристика результатів, отриманих переважно на стадіях метафази I та тетрад. Метафаза є інформативною через можливість оцінити поведінку гомологічних ділянок хромосом, які утворюють біваленті, за відсутності гомологічних ділянок закритий біваленті не буде утворюватися. Геноми інтрогресивних ліній розглядаємо як такі, що мають чужинні ділянки, похідні геному Т. Тому аналізуючи результати кон'югації, яка відбувається під час пахітени I, через підрахунок хромосомних асоціацій на стадії метафази можна оцінити навантаження чужинним хроматином лінії-учасниці схрещувань.

Для підрахунку кількості хромосом та їхніх асоціацій використовували тільки клітини, де однозначно їх можна було визначити. Для вивчення гібридів F_1 використовували 31 гібрид, серед яких для 18 вдалося отримати результати на стадії MI (табл. 3.20) [157].

Таблиця 3.20

Модальні класи асоціацій хромосом під час метафази I гібридів F_1

№ з/п	Гібриди	Кількість МКП	Хромосомні асоціації	Кількість хромосом
1	f18 804/1 х Лелека	13	$14^{II3}+4^{IIB}+5^{I}$ $15^{II3}+4^{IIB}+4^{I}$	41 42
2	f18 804/4 х Панна	19	$17^{II3}+7^{I}$	41
3	f18 806/4 х Лелека	43	$14^{II3}+5^{IIB}+4^{I}$	42
4	f18 806/1 х Панна	64	$13^{II3}+6^{I}$ $8^{II3}+5^{IIB}+9^{I}$ $4^{II3}+9^{IIB}+10^{I}$ $9^{II3}+5^{IIB}+10^{I}$ $6^{II3}+7^{IIB}+13^{I}$ $10^{II3}+7^{IIB}+7^{I}$ $9^{II3}+6^{IIB}+12^{I}$	32 35 36 38 39 41 42
5	f18 810/1 х Тіра	25	$11^{II3}+6^{IIB}+5^{I}$ $7^{II3}+8^{IIB}+10^{I}+1^{IV}$ $12^{II3}+6^{IIB}+5^{I}$ $11^{II3}+7^{IIB}+6^{I}$	39 40 41 42
6	f18 831/2 х Лелека	12	$13^{II3}+4^{IIB}+8^{I}$	42
7	Лелека х f18 806	19	$11^{II3}+7^{IIB}+5^{I}$	41
8	Лелека х f18 914	25	$12^{II3}+5^{IIB}+3^{I}$	37
9	Лелека х f18 1111	6	$12^{II3}+1^{IIB}+1^{I}+2^{IV}$ $15^{II3}+2^{IIB}+4^{I}+1^{IV}$	31 42
10	Ніконія х f18 747	12	$17^{II3}+1^{IIB}+3^{I}$ $10^{II3}+5^{IIB}+7^{I}+1^{IV}$ $15^{II3}+4^{IIB}+3^{I}$ $14^{II3}+3^{IIB}+8^{I}$	39 41 41 42
11	Селянка х f18 804	46	$10^{II3}+4^{IIB}+9^{I}$ $14^{II3}+3^{IIB}+5^{I}$ $16^{II3}+2^{IIB}+5^{I}$ $16^{II3}+2^{IIB}+6^{I}$	37 39 41 42
12	Селянка х f18 806	32	$12^{II3}+4^{IIB}+6^{I}$ $12^{II3}+3^{IIB}+12^{I}$	42 42
13	Вдала х f18 1078	4	$16^{II3}+4^{IIB}+2^{I}$	42

Продовження табл. 3.20

14	Вдала х f18 1066	4	$15^{II3}+2^{IIB}+8^{I}$	42
			$16^{II3}+3^{IIB}+4^{I}$	42
15	Панна х f18 747	8	$8^{II3}+5^{IIB}+4^{I}+2^{IV}$	38
16	Панна х f18 804	19	$17^{II3}+5^{I}$	39
			$15^{II3}+4^{IIB}+4^{I}$	42
17	Панна х f18 999	23	$7^{II3}+9^{IIB}+5^{I}$	37
			$8^{II3}+9^{IIB}+4^{I}$	38
			$12^{II3}+6^{IIB}+5^{I}$	41
			$11^{II3}+3^{IIB}+5^{I}+2^{IV}$	41
			$12^{II3}+6^{IIB}+2^{I}+1^{IV}$	42
18	Одеська 267 х f18 856	26	$10^{II3}+9^{IIB}+3^{I}$	41
			$17^{II3}+1^{IIB}+2^{I}+1^{IV}$	42
			$14^{II3}+6^{IIB}+2^{I}$	42

Примітки:

1) ^{Пз} – закритий бівалент.
2) ^{Пв} – відкритий бівалент.
3) ^{I} – унівалент.
4) ^{IV} – квадривалент.

Серед наведених у таблиці, для шести гібридів інтрогресивну лінію запилювали пилком сорту (пряма комбінація), для решти гібридів лінії були батьківськими рослинами.

Оцінювали здатність хромосом кон'югувати за методом Сфікаса [158], за якого визначається ймовірність *i*-тої хромосоми одного виду кон'югувати з гомеологом іншого виду, залученого у схрещування при створенні гібридів (p_i). Припускається, що певна хромосома може кон'югувати тільки з одним партнером. Ймовірність відсутності кон'югація позначають, як q_i. Загалом відкритих та закритих бівалентів спостерігали від 9 до 21 серед обстежених клітин. Ймовірність кон'югації між батьківськими хромосомами у гібридів невисока ($\sum p_i<\sum q_i$). Коли б суми ймовірностей були однаковими, то кожна з хромосом одного батька могла кон'югувати зі своїм гомеологом від іншого.

Визначали ймовірність p̂, успіху знайти хромосому, яка кон'югує з гомеологічною для кількості випробувань $\hat{n}$, за формулами:

$$\hat{p} = \frac{m-v}{m}, \quad (3.2) \qquad \hat{n} = \frac{m^2}{m-v}, \quad (3.3)$$

де: m – середнє значення кількості біваленів, v – варіанса.

Частоту кон'югації хромосом p у гібридів, визначали як середню кількість біваленів m, поділену на кількість можливих біваленів n, які потенційно утворюються серед можливих 42 хромосом для пшениці м'якої:

$$p = \frac{m}{n} \quad (3.4)$$

Для досліджених гібридів (рис.3.31) ймовірність спостерігати i - хромосому, яка здатна кон'югувати з гомеологічною, дорівнює 0,22 для 75,22 проведених випробувань. Середнє значення кількості біваленів – 16,94, варіанса – 13,12.

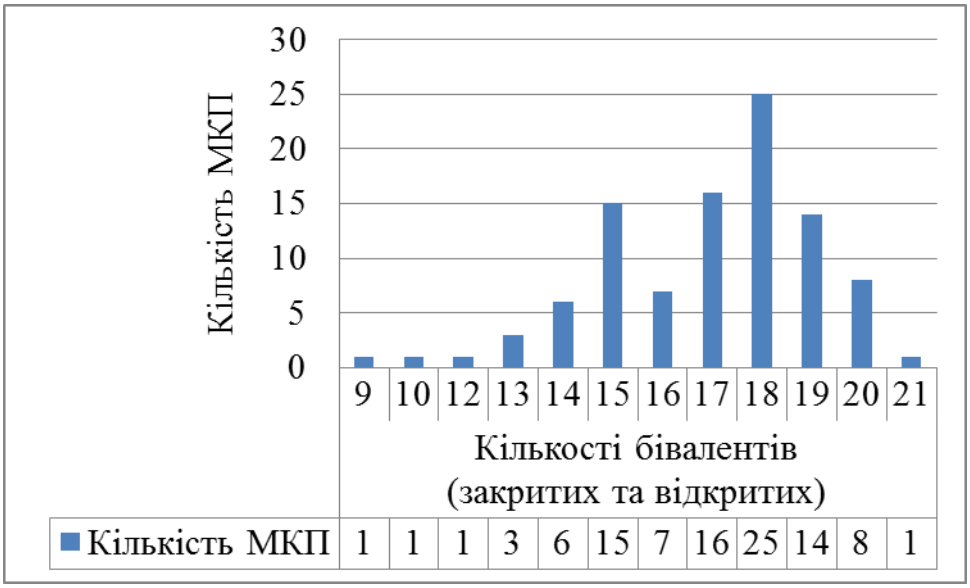


Рис. 3.31. Розподіл біваленів у материнських клітин пилку гібридів F_1.

Регулярність мейотичного поділу буде впливати на фертильність гібридів, а відповідно і на придатність таких рослин для подальшої роботи. На придатність впливає і те, чи будуть мати гібриди у своїх геномах чужинні фрагменти та, чи можуть гібриди передати бажану ознаку нащадкам. Визначали і те, чи може напрямок схрещування впливати на асоціації хромосом. Припускаємо, що чужинний хроматин від інтрогресивних ліній буде рушієм

порушень у мейозі гібридів. Співставляли результати, отримані з гібридами різних напрямків (типів) схрещувань на стадії метафази І та стадії тетрад. У першому випадку порівнювали кількості біваленів обох типів загалом, окремо закриті та відкриті біваленти, унівалентів (табл. 3.21). Порівняння проводили з використанням критерію рангів *R* Уілкоксона-Уайта. Для всіх порівнюваних випадків табличне значення критерію – 42,4 (p = 0,05). У розрахунки залучали результати для 6 рослин, результатів прямого схрещування, та 16 – зворотного. Критерій рангів є непараметричним, для якого розбіжність між порівнюваними показниками буде достовірною, коли емпіричне значення не перевищує табличне.

Таблиця 3.21

Співставлення показників асоціації хромосом МКП гібридів, отриманих від прямого та зворотного схрещувань

	Всі біваленти	Закриті біваленти	Відкриті біваленти	Унівалентів
$R_{емп.}$	58	59,5	77	83
Висновок	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

За отриманими результатами різниця відсутня для всіх порівнянь, тобто напрямок схрещування не впливає на можливість утворення біваленів. Можна зробити попередній висновок, що те ким буде інтрогресивна лінія (батьком чи матір'ю) не буде впливати на стабільність гібридів. Проте потрібно враховувати і подальшу поведінку хромосомних асоціацій, відмінних від біваленів. Вивчення поведінки хромосом під час мейозу необхідне для прогнозування передачі ознаки через інтрогресивну гібридизацію [159]. Свідченням наявності інтрогресій у геномі є утворення унівалентів, які можуть неправильно сегрегувати до полюсів клітини, утворюватимуться фрагменти хромосом. Найбільш ефективним шляхом передачі чужинного плеча хромосоми є неправильний поділ унівалента у АІ та утворення робертсонівських транслокацій. Унівалент може або відійти до одного з

полюсів разом з бівалентами та потрапити у клітину, або відставати від руху хромосом та дати початок мікроядру. Відповідно до цього, відсутність різниці у асоціації хромосом на стадії МІ між гібридами різних типів може і не означати, що цієї різниці не буде і на стадії тетрад. Вирішили це перевірити. Аналізували результати, отримані з 13 гібридами, отриманими від прямого схрещування та з 25 гібридами – від зворотного. Спостерігали тетради без мікроядер, в решти – кількості мікроядер варіювали від 1 до 5 на клітину. Порівнювали частки клітин, які мали від 0 до 5 мікроядер за допомогою z-критерію. Результати співставлень наведені у таблиці 3.22 та опубліковані [157].

Таблиця 3.22

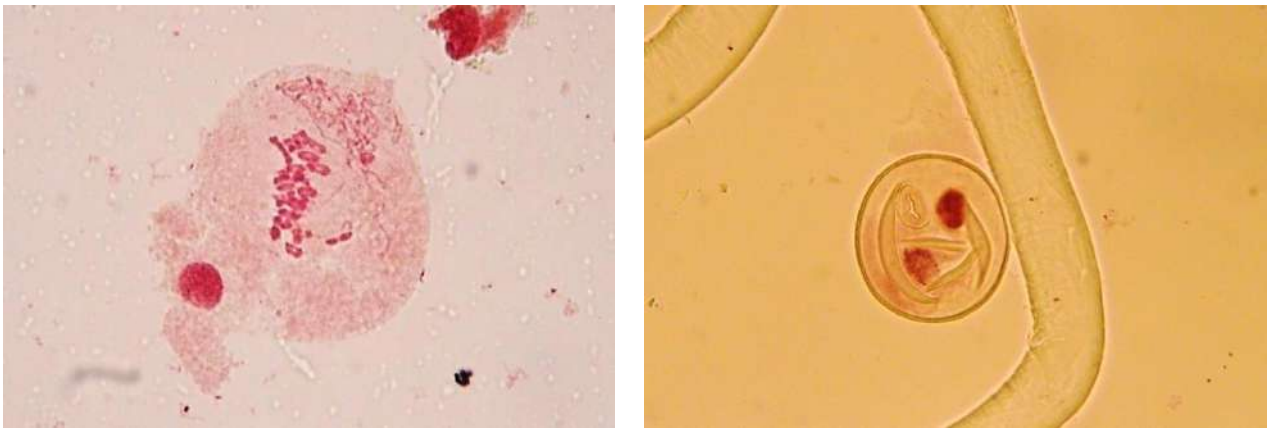
Співставлення кількостей мікроядер з різними кількостями мікроядер у гібридів, отриманих через два типи схрещувань

Тип схрещування	Показники	Кількість мікроядер						N, МКП
		0	1	2	3	4	5	
Прямий	*n*	224	250	145	64	20	15	703
	p	0,32	0,35	0,21	0,09	0,03	0,02	–
	s_p	0,019	0,019	0,017	0,012	0,007	0,011	–
Зворотній	*n*	950	730	404	136	40	16	2261
	p	0,42	0,32	0,18	0,06	0,02	0,01	–
	s_p	0,010	0,010	0,008	0,005	0,003	0,002	–
z		-3,15	3,23	2,67	3,13	1,84	6,7	–

Для всіх проведених порівнянь доведена статистично значуща різниця на рівні значущості 0,01, крім клітин, які мали чотири мікроядра. У гібридів зворотного типу схрещування переважають клітини без мікроядер. Кількості клітин з мікроядрами, крім одного випадку, більша у гібридів прямого типу схрещування. Незважаючи на те, що на стадії МІ була відсутня різниця у асоціації хромосом, вона з’являється на стадії тетрад. Інтрогресивні лінії є донорами цитоплазми при створенні гібридів, отже, вони дають нащадкам усі хромосомні асоціації, які тільки мають. Використання ліній, як материнських рослин, призводить до утворення більшої кількості мікроядер у тетрадах,

порівняно з гібридами, для яких, як материнську рослину використовували сорт.

У досліджених гібридів реєстрували і інші порушення спорогенезу – деконденсований хроматин на периферії ядра поруч з метафазною пластинкою (рис. 3.29 А). На стадії метафази хроматин має бути конденсований, що важливо для правильної поведінки хромосом під час поділу. Затримку конденсації контролює локус *Ph1* [160]. Були порушення і під час гаметогенезу. Утворювалися 3-7 генеративних ядер, пилок мав два ядра однакових розмірів (рис. 3.29 Б). Нормою є два ядра, але різних розмірів – одне вегетативне (велике) та одне генеративне (мале). Вони можуть утворюватися через асиметричне веретено поділу або формування вигнутого фрагмобласту [161,162].



А Б

Рис. 3.29. Мікроспорогенез гібриду F_1 між сортом Лелека та лінією з інтрогресіями f18 876 (А) та пилок гібриду Тіра х 762 (F_1).

Порушення у гібридів, отриманих через інтрогресивну гібридизацію є на стадіях спорогенезу та гаметогенезу. Гібриди, в яких інтрогресивна лінія є материнською рослиною, мають більшу кількість мікроядер у тетрадах.

3.8. Співставлення мейотичного поділу Авротіки та гібридів двох поколінь, отриманих за участі її ліній

Порівнювали перебіг мейозу Авротіки та рослин, які потенційно можуть мати генетичний матеріал від неї. Співставляли кількості хромосом за допомогою критерію Колмогорова-Смірнова. Спочатку працювали в межах груп гібридів, щоб перевірити, чи можна працювати з об'єднаною групою. Під час порівняння кількостей хромосом Авротіки та рослин F_1 (об'єднана група), у амфідиплоїда більша кількість хромосом ($\lambda_{емп.}$=1,84). Для гібридів F_2 працювали окремо з кожною рослиною, результат порівнянь аналогічний, як і для першого покоління. Кількості закритих бівалентів серед порівнюваних рослин були різною: Авротіка мала від 10 до 17, у F_1 – не більше 18, F_2 – 20. Зазначені максимальні кількості бівалентів для гібридів були у поодиноких клітин. Порівнювали кількості закритих бівалентів за допомогою критерію рангів Уілкоксона-Уайта, щоб визначити котрі з перелічених рослин мають більшу гомологію між хромосомами. Для всіх порівнюваних пар доведено, що Авротіка має більшу кількість закритих бівалентів, порівняно з гібридами обох поколінь. Для решти хромосомних асоціацій (відкриті біваленти та унівалентн) гібриди переважають над Авротікою за їхніми кількостями. У випадку мультивалентів, у Авротіки було 1, 2, 4 триваленти, МКП F_1 мали 1 тривалент, рідше – 2, гібриди другого покоління мали лише один. У гібридів кількість квадривалентів була меншою, порівняно з Авротікою, яка якщо і мала квадриваленти, то їх було чотири.

У Авротіки замість тетрад спостерігали і тріади. У гібридів були тріади тільки у Панна х 747 (F_1) та 806/1 х Панна (F_2). Відмінність між спостережуваними тріадами була в утворенні мікроядер у тріадах гібридів. На стадії тетрад порівнювали цитологічну стабільність з використанням мейотичних індексів, розрахованих за формулою 3.1. Значення МІ для гібридів наведені у таблиці 3.23, для Авротіки – на рисунку 3.29. Зіставлення МІ проводили через розрахунок емпіричних значень критерію Кроскала-Уолліса.

Таблиця 3.23

Мейотичний індекс гібридів F_1 та F_2

Покоління	Номер рослини	МІ, %	Номер рослини	МІ, %	Номер рослини	МІ, %
F_1	864	62	1005	59	1111	42
	870	38	1006	10	1155	56
	872	73	1012	25	1174	25
	873	13	1015	50	1208	27
	874	67	1018	88	1210	15
	876	15	1019	94	1218	15
	877	35	1021	40	1239	21
	878	40	1028	100	1253	38
	882	50	1041	50	1283	81
	883	67	1043	7	1284	80
	884	26	1044	20	1289	31
	886	48	1045	21	1332	22
	887	78	1049	11	1388	75
	1001	19	1050	28	-	-
	1003	75	1053	15	-	-
	1004	38	1064	47	-	-
F_2	301	43	456	68	536	57
	301	59	465	66	541	70
	365	59	468	54	546	73
	365	75	481	52	551	60
	377	81	481	47	551	69
	377	99	485	50	581	57
	390	31	485	42	593	39
	395	50	490	81	597	30
	401	36	490	54	597	13
	404	35	499	77	630	70
	405	78	502	48	630	50
	421	45	523	94	635	81
	426	47	531	91	641	87
	441	81	531	75	881	91
	451	24	535	52	898	55
	456	92	535	88	898	20

Різницю між порівнюваними значеннями статистично не доведено ($u_{емп.} < u_{табл.}$) на рівні значущості 0,05. Хромосоми, які відстають, хромосомні мости у АІ, асинхронний поділ спостерігали у Авротіки та гібридів. У гібридів хромосомні мости були і на стадії анафази та телофази другого поділу. Ще однією відмінністю гібриду Лелека х 876 (F_1) була у наявності деконденсованого хроматину одночасно з метафазними хромосомами. У Авротіки не реєстрували порушень у пилку, пилкових зернах, гібриди ж їх мали (більше двох генеративних ядер у пилку).

Отже, Авротіка та гібриди двох поколінь не мають відмінностей за мейотичним індексом, проте різниця є за деякими особливостями на інших стадіях поділу.

3.9. Цитологічна стабільність у мейозі гібридів, отриманих через інтрогресивну гібридизацію

Описані в попередньому пункті стійкі гібриди F_2 тестували на здатність передати ознаку при схрещуваннях з сортами. Під час створення гібридів використовували стійкі рослини F_2, як материнський компонент схрещування, які запилювали одним із сортів селекції СГІ-НЦНС НААН (м. Одеса) (Лелека, Панна, Ніконія, Вдала, Тіра, Одеська 267, Селянка) або Краснодарського НДІСГ (Аврора). F_2 походять від схрещування стійких ліній Авротіки та різних сортів, тобто F_1 потенційно могли отримати генетичний матеріал від ліній. Частина гібридів F_1 могла отримати хроматин не лише від одного сорту чи лінії. Наприклад, на першому етапі схрещувань одну інтрогресивну лінію запилювали іншою. Інший випадок – сорт, залучений у створення гібридів F_1 міг відрізнятися від сорту, яким запилювали рослину F_2 при створенні рослинного матеріалу, на якому вивчали мейотичний поділ (гібриди F_1). Материнські рослини мають мати більшу гомологію до пшеничних геномів, що має збільшувати ймовірність передачі бажаної ознаки нащадкам. Для схрещувань використовували рослини F_2, які були стійкими до грибного

патогену, ймовірно, через наявність генетичного матеріалу від ліній Авротіки або через перебудови, викликані інтрогресивною гібридизацією. Такі перебудови могли відбутися з послідовностями, які походять і від уражених генотипів (сортів пшениці). Зміни можуть виникати, як на рівні нуклеотидних послідовностей, так і через епігенетичні зміни, наприклад знімання негативної регуляції.

Рослинний матеріал, який вивчали за цитологічною стабільністю, оцінювали і за ознакою стійкості, яка в нашому дослідженні є первинною ознакою інтересу. Це робили, щоб побачити як впливатиме поведінка хромосом у мейозі материнських клітин пилку на передачу та збереженість бажаної ознаки у нащадків. Спостерігали спорогенез та сперматогенез на різних етапах. Для нащадків одного схрещування могли брати декілька колосів для цитологічних досліджень. Це обумовлено бажанням отримати МКП на стадії метафази першого поділу (М1) або хоча би тетрад, оскільки рослини могли бути різного ступеня зрілості, та порівняти чи відрізняється проходження мейозу у різних рослин, отриманих від одного типу схрещування. Зазначені стадії мейозу є інформативними оскільки:

- під час М1 можна порахувати різні хромосомні асоціації – відкриті та закриті біваленти, унівалeнти, мультиваленти (три-, квадриваленти);
- на стадії тетрад унівалeнти, які відстають під час анафази 1, будуть конденсуватися і візуалізуватися, як мікроядра.

Під час анафази 1 можна підрахувати кількість хромосом, які мігрують до певного полюсу та спостерігати як відбувається міграція – наявність хромосом, що відстали від поділу, хромосомних мостів. Хромосомні асоціації, відмінні від закритих бівалентів, свідчитимуть про наявність різних хромосомних перебудов, які можуть виникати за наявності хроматину чужинного походження, наприклад коли є транслокації. Якщо є унівалентні хромосоми, то вони можуть бути чужинного походження, вони не утворюють пари з гомологічною хромосомою, такі хромосоми можуть бути і гомеологами. В нашому випадку, якщо спостерігаються унівалeнти, то можна сказати, що вони

є чужинними, але чи мають тільки послідовності чужинні для пшениці м'якої сказати точно не можна, бо залучені у схрещування F_2 можуть мати і пшеничні послідовності і від амфідиплоїда Авротіка.

Під час вивчення мейотичного поділу у рослинного матеріалу різного походження спробували відповісти на питання:

1. Як впливає генотип сорту пшениці м'якої, залучений у схрещування на останньому етапі створення гібридів (F_2 х сорт пшениці м'якої), на перебіг мейотичного поділу?

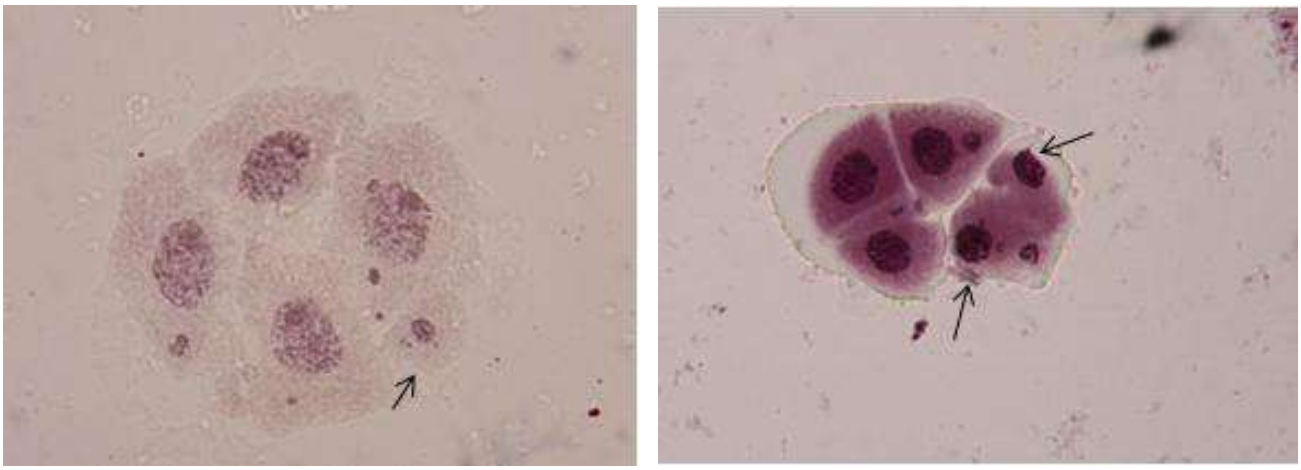
2. Чи буде впливати наявність генетичного матеріалу різних сортів пшениці м'якої у складі одного гібриду з однією з ліній на перебіг мейозу?

3. Чи є вплив генотипу інтрогресивної лінії на стабільність перебігу мейозу для гібридів?

4. Яке поєднання «сорт / сорти – інтрогресивна лінія» забезпечує стабільний поділ та стійкість до борошнистої роси?

Відповідаючи на питання звертали увагу і на оцінку на стійкість до борошнистої роси, щоб перевірити чи є зв'язок між стабільністю перебігу мейозу та опірністю до патогенові.

На стадії тетрад, крім мікроядер, які були в складі клітин (під спільною цитоплазмою з ядром мікроспороцита), спостерігали також мікроядра різних розмірів, які відокремлювалися з частиною цитоплазми і лежали поруч з клітинами тетради (рис. 3.32 А). Через відокремлення мікроядер відбувається втрата частини генетичного матеріалу. Були і мікроядра великих розмірів, коли хроматин в одній з клітин тетради був майже рівномірно поділений на декілька частин (рис. 3.32 Б). Такі випадки не залучали у розрахунки, оскільки однозначно не можна віднести ці тетради ні до тетрад без мікроядер (якщо вони відокремлюються), ні порахувати кількість мікроядер. Опис таких порушень буде наведений у наступному підрозділі.



А Б

Рис. 3.32. Мікроядра у тетрадах гібридів 526/1 (А) та 526/2 (Б).

Серед більшості гібридів спільною стадією для проведення порівнянь є стадія тетрад, тому частіше для відповідей на сформульовані питання користувалися результатами з цієї стадії. Коли для одного схрещування брали колоси з різних рослин, то перевіряли, чи не розрізняються вони на цій стадії за допомогою критерію Колмогорова-Смірнова. Використовували непараметричний критерій порівнянь, оскільки розподіл відмінний від нормального, є позитивна асиметрія. Перевірку на нормальність проводили критерієм Шапіро-Уілка. У крайніх класах (нема мікроядер або їх більше двох на клітину) великий обсяг варіантів або їх дуже мало, тому вибрали критерій Колмогорова-Смірнова, оскільки він не чутливий до обсягів крайніх класів на відміну, наприклад від критерію χ^2. Якщо статистично між такими рослинами не було різниці, то об'єднували результати в межах стадії мейотичного поділу для певної рослини. У додатку Є наведені кількості мікроядер, які спостерігали. Серед усіх досліджених рослин відсутні гібриди, які мали статистично різну кількість мікроядер в межах одного схрещування ($\lambda_{емп.} < \lambda_{0,05}$).

Для перевірки першого питання об'єднували гібриди у групи за сортом, який був батьком під час останнього схрещування (створення F_1). У отриманні гібридів донорами пилку були сорти: Панна, Вдала, Лелека, Одеська 267, Селянка, Тіра та Ніконія. Працювали з шістьма групами, з сортом Вдала результатів на стадії тетрад не отримали. Співставляли розподіли кількості

мікроядер між різними гібридами в межах утворених груп за допомогою попарних порівнянь з використанням критерію Колмогорова-Смірнова. Порівняння організовували у вигляді таблиць, де у шапках та боковинах зазначені порівнювані генотипи, у тілі – емпіричні значення критерію. Червоним кольором виділені комірки, для яких різниця є статистично достовірною ($\lambda_{емп.}>0,01$), помаранчевим – емпіричне значення критерію знаходиться в межах між двома критичними. Для значень критерію у незафарбованих комірках – різниця між порівнюваними генотипами за кількістю мікроядер відсутня ($\lambda_{емп.}<0,05$). Табличні значення критерію: $\lambda_{0,05} = 1,36$, $\lambda_{0,01} = 1,63$. Для деяких гібридів аналізували декілька рослин, коли тільки одна з них мала потрібну стадію, тому після номеру гібриду через скісну лінію написаний номер рослини.

В межах кожної з груп були пари, між якими була доведена статистична різниця. Найменша кількість порівнянь (шість) була для рослин, створених за участі Панни. Таких рослин було 4. Для пар порівнянь 402 – 403 та 403 – 404 отримали статистично значущу різницю ($\lambda_{емп.}>0,01$) (табл. 3.24). В обидвох випадках різниця є з гібридом 403, 402 та 404 між собою не розрізняються. Гібрид 403 має більшу кількість клітин, які мають одне мікроядро (100 клітин), порівняно з 402 (36 клітин) та 404 (7) та 2 мікроядра – проти 7 та 1 клітини, відповідно (Додаток Є). Також особливістю, що 401 (1 клітина), що 403 (дві) є наявність клітин з 3 мікроядрами.

Таблиця 3.24

Порівняння генотипів гібридів, похідних Панни, за кількістю мікроядер

Порівнювані генотипи	Порівнювані генотипи		
	402	403	404
401	0,63	0,41	1,14
402	-	1,84	0,85
403	-	-	2,49

Кожен з порівнюваних гібридів має генетичний матеріал не від одного сорту одночасно в одному геномі (табл. 3.25). Гібрид 403 вирізняється серед

інших участю сорту Панна при створенні F_2, якого запилювали тим же сортом, щоб отримати дослідні F_1. Утворення мікроядер свідчить про втрату хроматину – чужинного чи пшеничного походження, що на даному етапі дослідження встановити складно. У гібриду 403 більша кількість клітин з мікроядрами. Можна зробити припущення, що генетичний матеріал сорту з останнього етапу їх створення може вносити вклад в утворення мікроядер. Можливо, використання сорту Панна у двох послідовних схрещуваннях збільшує кількість ділянок геному, які є гомологічними і походять від пшениці (неважливо якого сорту), можуть кон'югувати в мейозі, чужинні при цьому лишаються без партнера. Проте не потрібно відкидати, як фактор, який вносить вклад в утворення мікроядер і стійкий гібрид, який брали у схрещування, поки його вплив не буде доведено. З сортом Панна аналізували 4 гібриди, кожен з яких був створений за участі різних інтрогресивних ліній (табл. 3.25). Визначати вплив інтрогресивної лінії на формування мікроядер будемо визначати на більшій кількості рослинного матеріалу.

Таблиця 3.25

Походження гібридів F_1, об'єднаних для порівняння за сортом Панна

Гібрид	Генотипи, від яких гібриди потенційно можуть мати генетичний матеріал	
	сорти пшениці м'якої	інтрогресивні лінії
401	Тіра, Панна	tica1015
402	Тіра, Ніконія	tica1130
403	Панна, Аврора	tica1049
404	Панна, Ніконія	tica1075

В наступну порівнювану групу входили рослини, в яких батьком був сорт Лелека, таких рослин п'ять. Під час схрещувань різні гібриди могли отримати генетичний матеріал не тільки від Лелеки, а і від сортів Вдала, Ніконія (табл. 3.26). Були залучені інтрогресивні лінії tica1075, tica1025, tica1063 x tica1061. Для останніх двох ліній наводимо такий запис, оскільки при створенні гібридів

F_1, з яких потім отримали F_2, запилювали інтрогресивну лінію tica1063 пилком лінії tica1061.

Таблиця 3.26

Походження гібридів F_1, об'єднаних для порівняння за сортом Лелека

Гібрид	Генотипи, від яких гібриди потенційно можуть мати генетичний матеріал	
	сорти пшениці м'якої	інтрогресивні лінії
405	Вдала, Панна	tica1025
406	Те ж	Те ж
407	Вдала, Ніконія	tica1075
408	Вдала, Лелека	tica1063 x tica1061
409	Вдала, Панна	tica1025

Провели 10 пар порівнянь, для одного з них (406-407) довели статистично різницю (табл. 3.27). Кожен з гібридів має клітини з мікроядрами від одного мікроядра на клітину до 3, найбільша кількість клітин без порушень. Гібрид 407 має одну клітину 4 мікроядрами. При порівнянні клітин з 2 мікроядрами – гібрид 407 має більшу їхню кількість.

Таблиця 3.27

Порівняння генотипів гібридів, похідних Лелеки, за кількістю мікроядер

Порівнювані генотипи	Порівнювані генотипи			
	406	407	408	409
405	0,63	0,54	0,59	0,4
406	-	1,87	0,21	0,12
407	-	-	1,09	1,04
408	-	-	-	0,11

З сортом Селянка отримали результати на стадії тетрад для десятьох рослин. Вісім рослин мали серед батьків Селянку, Панну, Аврору та Лелеку, інтрогресивну лінію tica1015, tica1012, tica1103 (табл. 3.28). У схрещуваннях для одного гібриду (454/1) замість Панни використовували Аврору та лінію tica1012, ще для одного – Лелеку та tica1103. Незважаючи на відносну

одноманітність серед залучених генотипів для восьми гібридів, були отримані розбіжності у кількості мікроядер для цих рослин.

Таблиця 3.28

Походження гібридів F_1, об'єднаних для порівняння за сортом Селянка

Гібрид	Генотипи, від яких гібриди потенційно можуть мати генетичний матеріал	
	сорти пшениці м'якої	інтрогресивні лінії
442/1	Селянка, Панна	tica1015
444/1	Те ж	Те ж
446/1	- « -	- « -
447/1	- « -	- « -
448/1	- « -	- « -
449/1	- « -	- « -
450/2	- « -	- « -
451/1	- « -	- « -
454/1	Селянка, Аврора	tica1012
456/1	Селянка, Лелека	tica1103

Один генотип (444/1) статистично не відрізняється від жодного іншого (табл. 3.29). Його МКП не містять мікроядер зовсім або тільки одне мікроядро. Всього дослідних клітин було дев'ять.

Таблиця 3.29

Порівняння генотипів гібридів, похідних Селянки, за кількістю мікроядер

Порівнювані генотипи	Порівнювані генотипи								
	444/1	446/1	447/1	448/1	449/1	450/2	451/1	454/1	456/1
442/1	0,19	4,52	3,85	3,68	0,36	3,50	4,15	1,67	0,28
444/1	-	1,33	0,96	1,26	0,34	1,12	1,27	0,55	0,26
446/1	-	-	1,60	0,40	1,86	1,11	0,31	3,07	3,45
447/1	-	-	-	1,15	1,17	0,70	1,31	1,99	2,58
448/1	-	-	-	-	1,68	1,00	0,21	2,44	2,93
449/1	-	-	-	-	-	1,44	1,73	0,36	0,20
450/2	-	-	-	-	-	-	0,87	2,13	2,68
451/1	-	-	-	-	-	-	-	2,75	3,19
454/1	-	-	-	-	-	-	-	-	1,02

Гібрид 442/1 не має клітин з кількістю мікроядер більшою за два на відміну від:

- 446/1, 447/1 – мають МКП з 3-5 мікроядрами одночасно в складі однієї клітини;
- 448/1 та 454/1 має по одній клітині з 3 мікроядрами;
- 451/1 – у складі МКП не більше, ніж 4 мікроядра.

Ще відмінностями 442/1 від інших генотипів є частки клітин без мікроядер та з одним мікроядром. Порівнювали частки клітин за допомогою критерію z на двох рівнях значущості 0,01 ($z_{табл.}$ = 2,58) та 0,05 ($z_{табл.}$ = 1,96). Для згаданого генотипу переважають МКП без порушень ($z_{емп.}$ = 25,8). Для 446/1, 448/1, 450/2, 451/1 різниця не доведена ($z_{емп.} < z_{0,05}$) (табл. 3.30). Всі зазначені гібриди мають серед батьків однакові генотипи (Селянка, Панна та 1015/1). Можливо, через те, що через клітинний поділ передається різна кількість генетичного матеріалу, можлива його втрата, то це буде впливати і на стабільність у мейозі для нащадків, здавалось би однакових генотипів.

Таблиця 3.30

Порівняння часток клітин за наявністю мікроядер у гібридів, похідних Селянки

Генотип	Розраховані показники					
	N	p_0	p_1	s_{p0}	s_{p1}	z
442/1	377	0,82	0,14	0,02	0,02	25,80
446/1	211	0,44	0,39	0,03	0,03	0,89
447/1	537	0,57	0,36	0,02	0,02	6,88
448/1	134	0,46	0,37	0,04	0,04	1,37
450/2	176	0,51	0,44	0,04	0,04	1,28
451/1	189	0,46	0,40	0,04	0,04	1,15
454/1	359	0,70	0,25	0,02	0,02	13,79

Примітки:

1) N – кількість обстежених клітин;

2) p_0 та p_1 – частки клітин;

4) s_{p0} та s_{p1} – біноміальні похибки відповідних часток;

5) z – значення критерію для порівняння часток.

Серед нащадків однакових генотипів (Селянка, Панна та tica1015) є також відмінності між 449/1 та 446/1, 448/1, 451/1. Рослина 449/1 має не більше ніж 2 мікроядра на клітину та клітини без мікроядер, що вирізняє її серед решти трьох генотипів, які мають клітини з 3 (448/1), 3-4 (451/1), 3-5 (446/1) мікроядрами. Тобто 449/1 має більш стабільний мейотичний поділ і менше втрачає генетичного матеріалу. Гібриди 454/1 та 456/1 мають інше походження і тут було очікувано спостерігати різні кількості мікроядер, порівняно з гібридами, які обговорювали раніше. 454/1 має у родоводі сорт Аврора, який використовували і при створенні інтрогресивних ліній. Гібриди 454/1 та 456/1 мають не більше трьох мікроядер на клітину, три мікроядра мають по клітині для кожного з двох генотипів. За кількістю мікроядер вони не відрізняється між собою.

Для решти трьох сформованих груп за сортами Одеська 267, Тіра та Ніконія, можна проаналізувати більшу кількість рослин, відповідно буде і більша кількість порівнянь. В межах об’єднаних груп для згаданих сортів гібриди можна розділити на групи за залученістю різних генотипів (сортів та інтрогресивних ліній) у схрещування. Можливий розподіл і на дві групи: ті, що не відрізняються за кількістю мікроядер від жодного іншого генотипу та ті, для яких різниця статистично доведена.

Для підгрупи об’єднаної за сортом Одеська 267, отримано нащадків чотирьох типів, за використаними генотипами у схрещуваннях, які можуть мати генетичний матеріал одночасно від:

А) Одеської 267, Ніконії та tica1084;

Б) Одеської 267, Ніконії та tica1130;

В) Одеської 267, Вдали та tica1096;

Д) Одеська 267, Ніконія та tica1084 (табл. 3.31).

Таблиця 3.31

Походження гібридів F_1, об'єднаних для порівняння за сортом Одеська 267

Гібрид	Генотипи, від яких гібриди потенційно можуть мати генетичний матеріал	
	сорти пшениці м'якої	інтрогресивні лінії
418/1	Одеська 267, Ніконія	tica1084
419/1	Те ж	Те ж
421/1	- « -	- « -
424/1	Одеська 267, Ніконія	tica1130
425/1	Одеська 267, Вдала	tica1096
426/1	Те ж	Те ж
427	- « -	- « -
428/1	- « -	- « -
429	Одеська 267, Ніконія	tica1084
430	Те ж	Те ж
431	- « -	- « -
432/1	- « -	- « -
435/1	Одеська 267	tica1063 x tica1061
436/1	Те ж	Те ж
437/1	- « -	- « -
438	- « -	- « -
439/2	- « -	- « -
441/1	- « -	- « -

Підгрупа А за кількістю мікроядер у тетрадах є гомогенною. Наступна підгрупа, яка складається з однієї рослини (424/1), за походженням відрізняється від попередньої тільки інтрогресивною лінією, залученою у схрещування. Гібрид 421/1 з підгрупи А має одну клітину з трьома мікроядрами, на відміну від 424/1, який не має таких зареєстрованих випадків. Серед усіх гібридів вирізняється 427, порівняно з іншими його МКП мають три (11 клітин) та чотири (одна клітина) мікроядра. Такі відмінності є статистично значимими для всіх проведених порівнянь з гібридами ($\lambda_{емп.}>\lambda_{0,01}$), за винятком 426/1 ($\lambda_{0,01}<\lambda_{емп.}<\lambda_{0,05}$) (табл. 3.32).

Таблиця 3.32

Порівняння генотипів гібридів, похідних Одеської 267, за кількістю мікроядер

Порівнювані генотипи	419/1	421/1	424/1	425/1	426/1	427	428/1	429	430	431	432/1	435/1	436/1	437/1	438	439/2	441/1
418/1	0,41	1,15	0,40	1,08	0,78	2,05	1,90	2,58	2,28	0,34	0,59	2,54	0,75	0,30	2,72	2,72	2,41
419/1	-	0,40	0,78	0,37	0,59	2,04	1,21	1,49	1,30	0,21	0,21	1,54	0,18	0,23	1,55	1,63	1,38
421/1	-	-	2,36	0,23	0,47	5,54	1,29	2,31	1,79	1,25	0,48	2,15	0,28	0,76	2,65	2,50	2,01
424/1	-	-	-	2,10	0,92	2,58	2,66	4,52	3,89	1,11	1,18	4,06	1,39	0,77	5,05	4,60	4,15
425/1	-	-	-	-	0,47	4,81	1,25	2,09	1,65	1,09	0,43	2,00	0,33	0,71	2,33	2,28	1,84
426/1	-	-	-	-	-	1,38	0,07	0,06	0,12	0,70	0,59	0,01	0,53	0,67	0,05	0,00	0,09
427	-	-	-	-	-	-	4,29	8,07	6,97	3,96	3,06	6,79	3,30	2,45	9,37	7,89	7,41
428/1	-	-	-	-	-	-	-	0,03	0,17	2,00	1,44	0,17	1,29	1,61	0,06	0,21	0,08
429	-	-	-	-	-	-	-	-	0,34	3,48	2,04	0,22	1,85	2,19	0,06	0,31	0,19
430	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,90	1,72	0,49	1,54	1,90	0,42	0,61	0,15
431	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,39	3,15	0,59	0,27	3,93	3,61	3,14
432/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,03	0,20	0,27	2,18	2,20	1,86
435/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,85	2,18	0,19	0,05	0,37
436/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,43	1,98	2,02	1,67
437/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,32	2,34	2,03
438	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,29	0,27
439/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,48

Серед усіх гібридів вирізняється 427, порівняно з іншими його МКП мають три (11 клітин) та чотири (одна клітина) мікроядра. Такі відмінності є статистично значимими для всіх проведених порівнянь з гібридами ($\lambda_{емп.}>\lambda_{0,01}$), за винятком 426/1 ($\lambda_{0,01}<\lambda_{емп.}<\lambda_{0,05}$). Шість гібридів (підгрупа Г) походять від схрещувань тільки з сортом Одеська 267. Серед цих рослин 436/1 та 437/1 мають два та три мікроядра на клітину, що їх відрізняє від решти рослин підгрупи, які мають тільки по одному мікроядру, гібрид 438 з двома мікроядрами на клітину. У рослин 435/1, 438, 439/2, 441/1 переважають тетради без мікроядер (табл. 3.33). Для 439/2 не зареєстровано клітин з мікроядрами.

Таблиця 3.33

Порівняння часток клітин за наявністю мікроядер у окремих гібридів, похідних Одеської 267 та 1063/1 х 1061

Генотип	Розраховані показники					
	N	p_0	p_1	s_{p0}	s_{p1}	z
435/1	200	1	0,01	0,06	0,05	14,00
438	637	1	0,02	0,01	0,01	24,25
441/1	309	1	0,04	0,01	0,01	16,21

Примітки такі ж, як і для таблиці 3.29 та наступних для розрахунку z-критерію.

З сортом Тіра стадію тетрад мали 18 гібридів, з якими в подальшому працювали. Об'єднаний в групу рослинний матеріал створено за участі трьох інтрогресивних ліній (tica1015 та tica1063 х tica1061). Лінії, як генотипи за допомогою яких відбувається передача бажаних послідовностей, тестували у поєднанні з сортами пшениці м'якої, крім Тіри, це Панна, Селянка, Одеська 267, Ніконія. Є декілька гібридів (469/1 – 472/2, 475/1, 476/1), які мають генетичний матеріал тільки від сорту Тіра, але від двох інтрогресивних ліній 1063/1 та 1061 (табл. 3.34).

Таблиця 3.34

Походження гібридів F_1, об'єднаних для порівняння за сортом Тіра

Гібрид	Генотипи, від яких гібриди потенційно можуть мати генетичний матеріал	
	сорти пшениці м'якої	інтрогресивні лінії
457/1	Тіра, Панна	tica1015
458/1	Те ж	Те ж
459/1	- « -	- « -
461/1	- « -	- « -
462/1	- « -	- « -
465/1	- « -	- « -
466/1	- « -	- « -
467/1	- « -	- « -
469/1	Тіра	tica1063 x tica1061
471/1	Те ж	Те ж
472/2	- « -	- « -
473	Тіра, Селянка	- « -
474/1	Те ж	- « -
475/1	Тіра	- « -
476/1	Те ж	- « -
479/1	Тіра, Одеська 267	- « -
481/1	Тіра, Панна	tica1025
482/1	Тіра, Ніконія	tica1049

Для всіх проведених пар порівнянь (табл. 3.35, де скорочення «П.г.» - це порівнювані генотипи) вирізняються 465/1 та 469/1, які не мають відмінностей від решти рослин у групі та між собою. Для 469/1 проаналізовано 8 клітин. Подібна ситуація і з 481/1, тільки в його випадку під час порівняння з 457/1 та 458/1 різницю не можна ні довести, ні спростувати (емпіричне значення критерію знаходиться між двома табличними для двох рівнів значущості. Відмінність 481/1 та 457/1 є у наявності трьох клітин з двома мікроядрами. У 458/1 є тільки клітини з одним мікроядром. 457/1 та 458/1 статистично не відрізняються.

Таблиця 3.35

Порівняння генотипів гібридів, похідних Тіри, за кількістю мікроядер

П.г.	458/1	459/1	461/1	462/1	465/1	466/1	467/1	469/1	471/1	472/2	473	474/1	475/1	476/1	479/1	481/1	482/1
457/1	0,15	0,62	0,18	0,18	1,05	2,70	2,08	0,56	1,78	0,42	0,39	0,51	2,59	0,63	2,33	1,38	0,06
458/1	-	0,84	0,12	0,30	1,24	3,16	2,21	0,61	2,14	0,67	0,65	0,73	3,04	0,90	2,76	1,55	0,20
459/1	-	-	0,43	0,28	0,63	2,43	1,81	0,39	1,33	0,34	0,40	0,13	2,30	0,06	1,98	1,02	0,53
461/1	-	-	-	0,26	0,69	1,20	1,46	0,58	0,85	0,33	0,32	0,38	1,16	0,41	1,05	0,91	0,20
462/1	-	-	-	-	0,72	1,79	1,76	0,48	1,11	0,10	0,07	0,20	1,71	0,26	1,50	1,04	0,13
465/1	-	-	-	-	-	1,03	1,27	0,17	0,39	0,91	0,95	0,72	0,94	0,72	0,70	0,41	0,98
466/1	-	-	-	-	-	-	0,76	0,16	1,22	3,42	3,64	2,60	0,44	2,99	0,84	0,38	2,52
467/1	-	-	-	-	-	-	-	0,49	1,25	2,02	2,05	1,88	0,81	1,90	0,97	0,88	2,02
469/1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,26	0,46	0,47	0,42	0,17	0,41	0,25	0,16	0,54
471/1	-		-	-	-	-	-	-	-	2,03	2,18	1,48	1,08	1,66	0,70	0,26	1,63
472/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,06	0,19	3,25	0,34	2,89	1,28	0,33
473	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,24	3,45	0,42	3,09	1,32	0,30
474/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,47	0,08	2,15	1,11	0,43
475/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,83	0,41	0,31	2,41
476/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,47	1,11	0,54
479/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,21	2,15
481/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,31

Серед усіх генотипів найбільша кількість відмінностей є при порівнянні 466/1, 467/1, 471/1, 472/2, 474/1, 475/1, 476/1, 479/1, 482/1. Рослини 466/1 та 467/1 мають клітини з більшою кількістю мікроядер (більше двох), порівняно з рослинами зі спільним походженням (457/1, 458/1, 459/1, 462/1). Такі ж відмінності є з іншими генотипами, для яких різниця є значимою. Усі гібриди, перераховані вище, крім 482/1 мають більші кількості клітин з більше, ніж двома мікроядрами. Тільки 7 клітин 482/1 мають по одному мікроядру. В цього гібриду мейотичний поділ відбувався доволі стабільно або втрата генетичного матеріалу відбулася на попередніх стадіях.

Серед дослідних рослин різниця у кількості мікроядер була знайдена при порівнянні з 466/1, 467/1, 471/1, 472/2, 473, 474/1, 475/1, 476/1, 479/1, 482/1. Серед перерахованих генотипів, є рослини, об'єднані спільним походженням і які розрізняються за утворенням мікроядер. Розрізняються і рослини різного походження. Гібриди одного типу схрещування поєднують хроматин одних і тих же ліній та гібридів, проте для отримання різних гібридів (різні номери) брали різні рослини. Такі рослини могли отримати від батьків різну кількість генетичного матеріалу або в гібридних геномах відбувалися по-різному перебудови, що від одного типу схрещування отримано гетерогенну популяцію, представники якої різняться за цитологічною стабільністю. Материнським компонентом схрещування був стійкий гібрид, від якого гібриди отримали цитоплазму з усіма хромосомними асоціаціями, часто відмінним від бівалентів [155]. Використані у цих схрещуваннях сорти характеризуються стабільним мейозом з утворенням 21 закритого бівалента. Тому, ймовірною причиною нестабільності дослідних гібридів може бути хроматин, отриманий від рослини-матері.

Найбільшу групу сформували гібриди, в яких батьком був сорт Ніконія під час останнього схрещування (43 гібриди) (табл. 3.36). Частина гібридів потенційно має генетичний матеріал тільки від сорту Ніконія на пару з інтрогресивною лінією tica1075. Решта гібридів, крім Ніконії у родоводі мають

сорти Аврора та Лелека, також використовувалися при їх створенні інтрогресивні лінії tica1011, tica1103, tica1049.

Таблиця 3.36

Походження гібридів F_1, об'єднаних для порівняння за сортом Ніконія

Гібрид	Генотипи, від яких гібриди потенційно можуть мати генетичний матеріал	
	сорти пшениці м'якої	інтрогресивні лінії
483/1	Ніконія, Аврора	tica1011
484	Те ж	Те ж
485	- « -	- « -
486	- « -	- « -
487	- « -	- « -
488	- « -	- « -
489/2	- « -	- « -
490/1	Ніконія	tica1075
491/1	Те ж	Те ж
492	- « -	- « -
493/1	- « -	- « -
494/1	- « -	- « -
496	- « -	- « -
497	- « -	- « -
498/1	- « -	- « -
499/1	- « -	- « -
501/1	- « -	- « -
502/1	- « -	- « -
503	- « -	- « -
505	- « -	- « -
506	- « -	- « -
507	- « -	- « -
508	Ніконія, Лелека	tica1103
509/1	Те ж	Те ж
513	- « -	- « -
514/1	Ніконія	tica1075
516/1	Те ж	Те ж
519	- « -	- « -

Продовження табл. 3.36

521/1	Ніконія	tica1075
523/1	Ніконія, Лелека	tica1103
524	Ніконія, Аврора	tica1049
525	Те ж	Те ж
526	- « -	- « -
528/1	- « -	- « -
529	- « -	- « -
530/1	- « -	- « -
531/1.3	- « -	- « -
532/1	- « -	- « -
534/1	- « -	- « -
535/1	- « -	- « -
536/1	- « -	- « -
537/1	- « -	- « -
538	- « -	- « -

Оскільки з Ніконією отримано найбільшу кількість порівнянь, то спробували розділити дослідні гібриди на дві групи: ті, що не мають відмінностей у кількості мікроядер та ті, що мають. Порівняння гібридів, проведені з використанням критерію Колмогорова-Смірнова, наведені у додатку Ж. У другу групу можна віднести 508, 509/1, 514/1, 516/1, 519, 507. У перших двох гібридів серед батьківських генотипів є Ніконія, Лелека та tica1103. У решти – Ніконія та інтрогресивна лінія tica1075. Такі гібриди вирізняються серед гібридів, з якими мають спільне походження та гібридів, при створенні яких залучені були ще і інші сорти, інтрогресивні лінії. У гібридів з якими порівнювали перераховані рослини переважають кількості клітин, які не мають мікроядер. У шести гібридів спостерігали більшу кількість клітин з кількістю мікроядер більше трьох (507-509), у 514-519 були клітини, які мали по чотири мікроядра. У 519 були наявні клітини з шістьма мікроядрами. Згадані гібриди розрізняються і між собою.

У випадку 507 різницю спостерігали з частиною гібридів, які походять від схрещувань з залученням Ніконії та лінії tica1075, Ніконії з Авророю та

tica1049. У всіх дослідних гібридів переважають клітини без мікроядер, крім гібриду 509/1. В нього спостерігали частіше клітини, які містили від одного до трьох мікроядер.

При послідовному порівнянні гібриду 485 з 525, 526, 528/1, 529, 530/1, 534/1, 535/1, 536/1, 538 були знайдені статистично значимі відмінності. Гібрид, з яким порівнювали мав більшу кількість клітин, які мали по два мікроядра на клітину, рослина 526 ще відмінна від нього та решти перерахованих рослин наявністю двох клітин з трьома мікроядрами у кожній. При створенні перерахованих рослин були залучені сорти Ніконія та Аврора. Відмінність між ними полягає у інтрогресивній ліній, генетичний матеріал від якої вони потенційно могли отримати. У випадку 485 – це tica1011, для решти гібридів – tica1049. Як і для решти створених груп, генотипи за кількістю мікроядер відрізнялися в межах одного схрещування, так і генотипи, отримані за різних схрещувань.

Проведені порівняння дозволять відповісти на друге питання про вплив генетичного матеріалу різних сортів пшениці м’якої у складі одного гібриду на проходження мейотичного поділу. В межах створених груп для сортів Панна, Лелека та Селянка для гібридів, відмінних від решти, не було рослин які б мали тільки один сорт в родоводі. Для групи сформованої в межах сорту Одеська 267 та Тіра такі гібриди були, при цьому на початку їх створення у схрещування залучались дві інтрогресивні лінії tica1063 та tica1061. Для групи Ніконії рослини, крім сорту можуть мати генетичний матеріал від лінії tica1075. Тому далі буде тільки опис результатів для яких була знайдена різниця у перебігу мейозу для рослин, які мали серед батьків на останньому етапі схрещування Одеську 267, Тіру та Ніконію. Порівнювали результати перебігу мейозу у рослин, які походять тільки від одного сорту, з гібридами, які мають серед батьків більше одного сорту. Якщо серед батьків поєднувалися різні сорти, наприклад Одеська 267 та Вдала, Одеська 267 та Ніконія, то з такими рослинами не працювали як з однією підгрупою. Додаткових розрахунків не проводили, використовували результати отримані з використанням критерію

Колмогорова-Смірнова, наведені вище. В таких гібридів мейоз відбувався або з невеликою кількістю мікроядер, або тетради гібридів мали певну кількість мікроядер. В межах підгрупи з одним сортом-учасником були рослини, які характеризуються тільки клітини без мікроядер, але були і з більше, ніж одним мікроядром на клітину. Стабільність поділу в таких організмів різна, хоча вони і походять від одного типу схрещування. Щоб виразити стабільність поділу у числовому еквіваленті розраховували мейотичний індекс (MI), який враховує кількості тетрад без порушень (мікроядра відсутні) та тетради, які містять різну кількість мікроядер, тріади та поліади. Розрахунки проводили за формулою 3.1, наведеною у підрозділі 3.6.2. Тріад та поліад не спостерігали на дослідному матеріалі, були тільки клітини з різною кількістю мікроядер. За літературними даними [153] значення мейотичного індексу більше 90% свідчить про високу мейотичну стабільність, тобто переважають клітини без мікроядер. Мейотичні індекси не переведені у відсотки порівнювали між собою, порівнювали частки, за допомогою критерію z. Мейотичні індекси, розраховані для всіх рослин наведені у додатку Є. При цьому тестували робоче припущення, що залучення одного генотипу сорту пшениці м'якої у схрещування на різних етапах створення дослідних гібридів сприятиме більшій цитологічній стабільності. Також зважали, чи залучався сорт Аврора у схрещування. Під час створення інтрогресивних ліній використовували сорт Аврора, послідовності якого можуть як сприяти більш регулярному поділу, так і навпаки – сприятимуть вилученню певних ділянок з геномів клітин, які проходять мейоз, через наявність гомології.

У випадку Одеської 267 працювали з трьома підгрупами для порівняння (табл. 3.37). Почергово порівнювали кількості мікроядер у тетрадах рослин з підгруп один та два з рослинами підгрупи 3. Частина рослин з цієї підгрупи має клітини без мікроядер (439/2), тільки з одним мікроядром (435, 441/1), 1-2 мікроядрами (438), 1-3 мікроядрами (436, 437). Є рослини, які мають як стабільний поділ (435, 438, 439/2, 441/1) так і ні (436/1, 437/1) (додаток Є).

Таблиця 3.37

Підгрупи гібридів, відмінні за перебігом мейозу від решти для групи, створеною за сортом Одеська 267

Підгрупи	Генотипи, залучені у схрещування	Гібриди	Кількість МКП	Мейотичний індекс, %	Оцінка стійкості до борошнистої роси
Підгрупа 1	Одеська 267 та Вдала, tica1096	427	554	43,50	9
		428	72	97,22	3-4
Підгрупа 2	Одеська 267 та Ніконія, tica1084	429	372	97,58	3-4
		430	275	94,91	3-4
Підгрупа 3	Одеська 267, tica1063 x tica1061	435	200	99,50	3-4
		436/1	112	77,68	3-4
		437/1	88	71,59	2-3
		438	637	97,96	3-4
		439/2	301	100,00	3-4
		441/1	309	96,12	5-6

Гібрид 427 відрізняється від всіх рослин третьої підгрупи через наявність клітин з кількістю мікроядер від двох до чотирьох залежно від пари порівняння. За мейотичним індексом згаданий генотип не відрізняється тільки від 436/1, в обох рослин мейотичний поділ є нестабільним з утворенням мікроядер. У таблиці 3.38 наведені порівняння, мейотичні індекси (у частках), похибки часток та кількості досліджених клітин наведені у додатку З, як і для решти подібних порівнянь. У тілі таблиці наведені емпіричні значення критерію. Серед усіх рослин, не тільки своєї підгрупи, рослина 427 стійка до *Bgt* за результатами оцінки у польових умовах (див. табл. 3.37). Решта гібридів уражуються з оцінкою від 1 до 5.

При проведенні порівнянь між підгрупами гібридів не можна виокремити підгрупу, утворену рослинами, які мають тільки Одеську 267, як рослин зі стабільним мейозом. Можливою причиною цього може бути участь двох

інтрогресивних ліній tica1063 та tica1061 під час створення гібридів. Обидві лінії є похідними амфідиплоїда Авротіка, але можуть мати різну кількість генетичного матеріалу чужинного походження, який міг потрапити до гібридів. Хоч гібриди отримані в результаті одного типу схрещування, проте для їх створення були використані різні рослини, що може вносити відмінності у перебіг мейотичного поділу через різну кількість переданого хроматину та його різноманітність.

Таблиця 3.38

Порівняння мейотичних індексів гібридів, отриманих за участі сорту Одеська 267

Порівнювані генотипи	435/1	436/1	437/1	438	439/2	441/1
427	-25,871	-0,723	-5,352	-24,986	-26,824	-22,146
428/1	-1,139	0,413	4,945	-0,366	-1,434	0,497
429	-2,042	0,421	5,333	-0,389	-3,037	1,079
430	-3,242	0,365	4,676	-2,120	-3,841	-0,701

В межах групи для сорту Тіра рослини, які вирізнялися серед інших перебігом мейозу, розподілені на шість підгруп. Останню підгрупу утворюють гібриди, які можуть мати хроматин тільки від сорту Тіра та ліній tica1063 та tica1061 (табл 3.39). В межах цієї підгрупи, як і для попереднього сорту, є тільки одна рослина зі стабільним поділом (472/2), в решти мейотичний індекс менший за 90 відсотків. Мейотичний поділ у 473, 474/1 та 482/1 так само стабільний, як і в 472/2 ($z_{емп.} < z_{0,05.}$) (табл. 3.40). У 472/2 хоч і зустрічаються клітини з 1-3 мікроядрами, проте переважають тетради без порушень поділу. Решта гібридів, які порівнювали з 472/2 мають менш стабільний поділ, в них з більшою частотою зустрічають тетради з різними кількостями мікроядер серед обстежених клітин.

Таблиця 3.39

Підгрупи гібридів, відмінні за перебігом мейозу від решти для групи, створеною за сортом Тіра

Підгрупи	Генотипи, залучені у схрещування	Гібриди	Кількість МКП	Мейотичний індекс, %	Оцінка стійкості до борошнистої роси
Підгрупа 1	Тіра та Панна, tica1015	466/1	392	69,39	9
		467/1	34	55,88	9
Підгрупа 2	Тіра та Панна, tica1025	481/1	63	74,60	5-6
Підгрупа 3	Тіра та Селянка, tica1063 x tica1061	473	796	91,83	6
		474/1	263	90,11	5-6
Підгрупа 4	Тіра та Одеська 267, tica1063 x tica1061	479/1	422	73,22	3-4
Підгрупа 5	Тіра та Ніконія, tica1049	482/1	132	94,70	6
Підгрупа 6	Тіра, tica1063 x tica1061	471/1	376	78,19	5-6
		472/2	613	91,52	6
		475/1	381	70,34	6
		476/1	513	89,47	5-6

Серед дослідних гібридів найменш стабільний поділ має 467/1, кількість клітин без порушень в межах обстежених співвідноситься з клітинами, які мають від 1 до 3 мікроядер, майже, як один до одного. Серед гібридів, які створювалися за участі двох сортів, 482/1 має найбільший мейотичний індекс (94,7%), порівняно з іншими гібридами різного походження, проте ця рослина уражується грибним патогеном.

Таблиця 3.40

Порівняння мейотичних індексів гібридів, отриманих за участі сорту Тіра

Порівнювані генотипи	471/1	472/2	475/1	476/1
466/1	-2,790	-8,559	-0,289	-7,457
467/1	-2,542	-4,149	-1,637	-3,896
481/1	-0,610	-3,021	0,715	-2,632
473	5,829	0,213	8,484	1,416
474/1	4,236	-0,650	6,642	0,280
479/1	-1,640	-7,524	0,906	-6,383
482/1	5,716	1,412	7,995	2,199

Для сорту Ніконія серед гібридів з доведеною різницею було створено три підгрупи, ґрунтуючись на їхньому походженні (табл. 3.41). Підгрупа 3 створена з організмів, які походять тільки від одного сорту (Ніконія) та інтрогресивної лінії tica1075.

Таблиця 3.41

Підгрупи гібридів, відмінні за перебігом мейозу від решти для групи, створеною за сортом Ніконія

Підгрупи	Генотипи, залучені у схрещування	Гібриди	Кількість МКП	Мейотичний індекс, %	Оцінка стійкості до борошнистої роси
Підгрупа 1	Ніконія та Аврора, tica1011	488	66	78,14	9
	Ніконія та Аврора, tica1049	524	532	84,71	5-6
		525	563	94,15	5-6
		526	684	93,96	5-6
		528/1	481	96,98	5-6
		529	248	96,88	5-6

Продовження табл.3.41

Підгрупа 1	Ніконія та Аврора, tica1049	530/1	122	100,00	5-6
		531/1	87	88,78	5-6
		532/1	31	91,18	3-4
		534/1	177	93,16	3-4
		535/1	101	100,00	3-4
		536/1	189	95,45	4-5
		537/1	315	85,60	5-6
		538	159	92,98	5-6
Підгрупа 2	Ніконія та Лелека, tica1103	508	277	59,06	5-6
		509/1	29	41,43	9
		513	267	92,71	3-4
		523/1	46	85,19	5-6
Підгрупа 3	Ніконія, tica1075	492	66	67,35	9
		494		74,36	7
		497		87,76	7
		498/1		93,94	7
		502/1		92,94	5-6
		503		78,82	5-6
		505		96,38	5-6
		506		96,41	5-6
		507		81,22	5-6
		514/1		49,27	5-6
		516/1		50,99	9
		519		71,12	5-6

Серед нащадків Ніконії та лінії tica1075 гібриди 498/1, 502/1, 505, 506 мають переважну більшість клітин без мікроядер, решта гібридів різною мірою характеризуються нестабільним мейотичним поділом. Що спостерігали і для підгруп створених за сортами Одеська 267 та Тіра. Цитологічною стабільністю характеризується і частина гібридів, які можуть мати хроматин від декількох сортів.

Цікавою є група гібридів, при створенні яких, крім Ніконії, використовували сорт Аврора та інтрогресивну лінію tica1049. Амфідиплоїд Авротіка містить в своєму геномі тетракомпонент (AABB) від пшениці м'якої

Аврора. Під час створення інтрогресивних ліній Авротіки для створення F_1 використовували амфідиплоїд, який запилювали пилком сорту Аврора [цитовано за 163]. Рослини, отримані таким шляхом, можуть мати більшу кількість гомологічних ділянок, між якими можлива кон'югація у мейозі. Ділянки можуть походити від Ніконії та / або Аврори. Інтрогресивну лінію використовували тільки на першому етапі створення гібридів при запиленні сортом Аврора. Серед тринадцяти рослин підгрупи 1 три (524, 531/1, 537/1) мають мейотичний індекс, менший за 90%, що вказує на невисоку цитологічну стабільність. Ймовірно, описане походження сприяло більшій регулярності поділу у гібридів. Для їх створення використовували різні рослини, які могли мати різну кількість генетичного матеріалу від батьків, передача якого має ймовірнісний характер. Тому могли з'явитись рослини серед наведених у таблиці 3.41, які мають невисоку цитологічну стабільність. Якщо дивитися зв'язок між мейотичним поділом та стійкістю до борошнистої роси, то у випадку цієї групи всі рослини уражуються грибом (оцінка від 3 до 6 балів). Можна припустити, що гібриди отримали більше хроматину від сортів Аврора та Ніконія, які уражуються грибом, а не від стійкої інтрогресивної лінії.

У останній підгрупі, рослини мають генетичний матеріал тільки від Ніконії та tica1075. Для одинадцяти рослин підгрупу з чотирьох гібридів (498/1, 502/1, 505, 506) переважають тетради без мікроядер, в решти – мейоз відбувається з порушеннями. Ці рослини статистично не відрізняються від решти рослин з інших підгруп зі стабільним поділом ($z_{емп.} < z_{0,05}$) (табл. 3.42). Ці рослини різною мірою уражуються борошнистою росою.

Таблиця 3.42

Порівняння мейотичних індексів гібридів, отриманих за участі сорту Ніконія

Порівнювані генотипи	492	494	497	498/1	502/1	503	505	506	507	514/1	516/1	519
488	2,184	1,329	-3,817	-5,689	-7,051	-0,363	-11,609	-10,689	-1,592	9,489	9,025	3,100
524	3,508	3,622	-1,198	-3,301	-3,876	3,105	-7,283	-6,732	1,780	11,591	11,153	5,951
525	5,545	7,462	2,775	0,080	0,660	9,763	-1,871	-1,650	7,850	15,663	15,257	11,404
526	5,522	7,465	2,728	0,007	0,568	9,930	-2,140	-1,861	7,944	15,733	15,326	11,511
528/1	6,174	8,736	4,133	1,206	2,320	12,426	0,567	0,456	10,209	16,996	16,603	13,358
529	6,075	8,337	3,865	1,115	2,069	10,936	0,380	0,319	9,079	16,357	15,963	12,366
530/1	6,893	10,372	5,847	2,527	4,522	17,046	5,093	3,672	14,035	18,792	18,419	16,258
531/1	3,753	3,573	0,267	-1,294	-1,172	2,910	-2,328	-2,289	2,185	9,456	9,098	4,837
532/1	3,510	3,082	0,646	-0,509	-0,345	2,462	-1,059	-1,055	1,973	7,533	7,248	3,873
534/1	5,082	6,110	1,942	-0,259	0,092	6,480	-1,641	-1,566	5,263	13,453	13,054	8,637
535/1	6,893	10,372	5,847	2,527	4,522	17,046	5,093	3,672	14,035	18,792	18,419	16,258
536/1	5,663	7,321	3,002	0,538	1,170	8,608	-0,565	-0,538	7,133	15,001	14,603	10,524
537/1	3,594	3,654	-0,776	-2,765	-3,050	3,065	-5,493	-5,210	1,931	11,138	10,716	5,676
538	5,003	5,911	1,825	-0,309	0,018	6,119	-1,636	-1,568	4,968	13,118	12,721	8,280
508	-1,577	-4,557	-9,289	-10,561	-12,291	-7,632	-15,687	-15,107	-8,408	2,776	2,307	-4,183
509/1	-3,430	-5,157	-7,413	-8,260	-8,456	-6,213	-9,266	-9,212	-6,591	-1,211	-1,480	-4,828
513	5,094	6,309	1,909	-0,433	-0,104	7,042	-2,175	-2,036	5,648	13,994	13,587	9,203
523/1	2,636	1,994	-0,488	-1,622	-1,526	1,276	-2,292	-2,276	0,790	6,486	6,197	2,731

У таких порівняннях хотіли визначити, чи є вплив сорту на стабільність мейозу. Отримані результати наштовхують на думку, що на перебіг мейозу впливають саме інтрогресивні лінії. Оскільки при проведенні порівнянь в межах групи, об'єднаної за сортом Ніконія, різницю у кількості мікроядер на тетраду було отримано, що з рослинами, які мали у родоводі одну Ніконію, що Ніконію у поєднанні з іншим сортом. Гібриди, в родоводі яких був сорт Аврора мають більшу кількість рослин серед досліджених, які є цитологічно стабільними за результатами розрахунку мейотичного індексу.

Між перебігом мейозу та стійкістю до *Bgt* є негативна залежність. Цитологічно стабільні гібриди у мейозі уражуються борошнистою росою (оцінка 5-6), стійкі до грибного патогену – мають нестабільний мейоз. Ймовірно, генетичний матеріал, який забезпечує резистентність не потрапляє до складу гібридних геномів. Такий хроматин може походити, як від інтрогресивної лінії, так і бути результатом перебудов гібридного геному. Сорти пшениці м'якої мають гени *Pm*, проте різною мірою вражаються борошнистою росою, тобто ці гени є неефективними проти циркулюючих рас патогенів. Рослини вирощуємо у польових умовах, де кліматичні умови змінні, що сприяє виникненню чи домінуванню різних рас патогенів щорічно. Послідовності, які пов'язані зі стійкістю, у сортів можуть бути під негативним контролем і не експресуватися, або не відбувається їх транскрипція. Проте замовчування може зніматися, коли ця послідовність потрапляє на нове генетичне тло, у гібридний геном. Тому можна припустити, що і гени стійкості або послідовності, які пов'язують зі стійкістю, можуть сприяти опірності патогену. Виникає питання, чи буде переданий генетичний матеріал, який забезпечував стійкість, у цитологічно нестабільних гібридів, нащадкам? Нестабільність у мейозі реєструється, як унівалєнти, хромосоми, які відстають, які на стадії тетрад бачимо, як мікроядра. Для підтримання стабільності геному мікроядра мають бути елімінованні. Спостерігали і мікроядра, які відокремлювалися разом з цитоплазмою. Якщо мікроядра містять послідовності стійкості, то за такою логікою вони теж мають бути елімінованні, якщо не були

включені до складу основних ядер мікроспороцитів. Під час попередніх досліджень мейотичного поділу у амфідиплоїда Авротіка [151], похідними якого є інтрогресивні лінії, спостерігали, хромосомні асоціації, відмінні від закритих бівалентів, мікроядра. Амфідиплоїд та його лінії є стійкими до збудника протягом років спостережень.

І потрібно враховувати, що при отриманні дослідженого матеріалу, який має однакове походження, брали участь різні рослини, нащадки від одного схрещування. Можливо, популяція отримана від одного схрещування була гетерогенною за кількістю отриманого генетичного матеріалу від обох батьків. Геноми D та T мають часткову гомологію [164], через що можлива кон'югація між їхніми ділянками з утворенням у MI хромосомних асоціацій, відмінних від закритих бівалентів, – мультивалентів, унівалентів паралельно з тривалентами. Унівалентами дадуть початок мікроядрам. Або ж втрата хроматину відбулася раніше стадії тетрад, що не спостерігали мікроядер. За літературними даними [165], можливе порушення кон'югації між гомологічними хромосомами за присутності хромосом іншого виду у міжвидових гібридів.

Отримані результатами розрахунку мейотичного індексу наштовхують на думку про вплив генотипу інтрогресивної лінії, як фактора нестабільності у мейозі. За результатами вивчення ліній, проведеними раніше у лабораторії [109], отримані гексаплоїдні інтрогресивні лінії мають різну кількість генетичного матеріалу, отриману від геному T, частина має рекомбінантні хромосоми 5D/5T. В межах кожної зі сформованих груп за сортами визначали котрі з ліній брали участь у схрещуваннях. Використано у схрещуваннях 11 інтрогресивних ліній, а саме: tica1011, tica1012, tica1015, tica1025, tica1049, tica1063, tica1061, tica1075, tica1084, tica1096, tica1103, tica1130, 23.1/12. В межах сформованих груп для сортів пшениці була знайдена різниця у перебігу мейозу для гібридів, отриманих за допомогою всіх перелічених ліній. Різниця проявлялася у більш стабільному або менш стабільному поділі при співставленні кількостей мікроядер. Далі працювали з такими рослинами.

Усі лінії, за впливом на цитологічну стабільність можна розділити на три групи:

1 – ті, з якими поділ є стабільним – клітин з різними кількостями мікроядер незначна кількість, порівняно з нормальними;

2 – лінії, з якими отримано гібриди як з стабільним поділом, так і навпаки;

3 – лінії, з якими отримано гібриди з МІ менше 90%.

До першої групи можна віднести інтрогресивні лінії з високим МІ – tica1049, tica1075 та tica1084. Для tica1049 – це гібриди підгрупи 1, створеної в межах рослин, отриманих за участі Ніконії, як батьківського компонента на останньому етапі схрещування. Мейотичні індекси у таких рослин 84,71% і більше, тобто переважають клітини без мікроядер. За участі tica1075 отриманий тільки один гібрид з МІ, який дорівнює 97,57% у гібриду 404. Для цієї лінії однозначно сказати, що мейоз відбувається без порушень не можна, оскільки обстежена тільки одна рослина. Гібриди, які можуть мати хроматин від tica1084 з МІ 97,58% (гібрид 429) та 94,91% (430).

Другу групу утворюють рослини, отримані за участі ліній tica1130, tica1025, tica1063, tica1061, tica1096. Серед рослинного матеріалу були гібриди цитологічно стабільні, та ні, але всі вони уражені патогеном. Ці рослини отримані з залученням різних сортів під час гібридизації. Перераховані лінії не викликають особливого інтересу, оскільки за їхньої участі отримані нащадки, які не будуть використані у подальших дослідженнях через те, що вони не мають опірності патогенові.

Нащадки від інтрогресивних ліній tica1015, tica1012 та tica1103 мали МІ менше 90%, що вказує на нерегулярний поділ з порушеннями. Рослини 466/1 та 467/1 для лінії tica1015 за результатами оцінки не мають жодних ознак ураження, проте їхні мейотичні індекси 69,39% та 55,88%. Хроматин чужинного походження, який можливо і забезпечував стійкість міг відійти, як мікроядра, доля яких бути елімінованими. Тому такі рослини, хоч і були стійкими у поточному поколінні, проте можуть не забезпечити передачу бажаної ознаки своїм нащадкам.

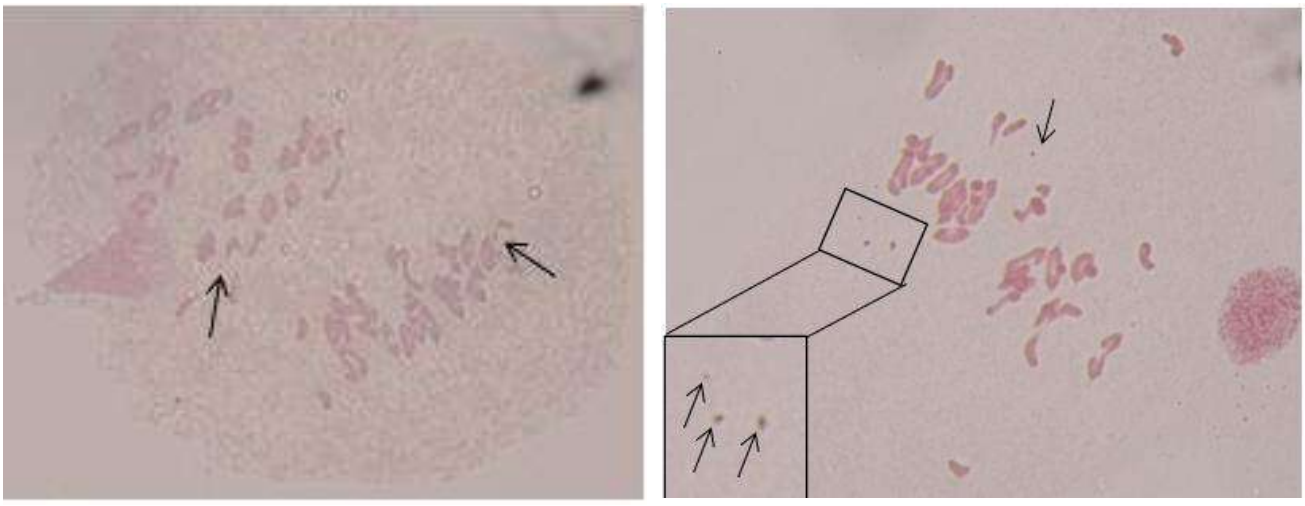
На цьому етапі опрацювання результатів цитологічних досліджень з використанням МІ можна спробувати знайти поєднання генотипів «сорт – інтрогресивна лінія», яке б забезпечувало одночасно цитологічну стабільність та стійкість до патогену. Всіх рослин групи гібридів зі стабільним поділом для ліній tica1049, tica1075 та tica1084 об'єднує те, що при їх створенні використовувався сорт Ніконія на різних етапах схрещування у поєднанні з сортами Тіра та Аврора, Панна, Одеська 267, відповідно. Тетради таких гібридів мають малу кількість клітин з мікроядрами, проте всі вони вражаються борошнистою росою з оцінкою 5-6 та менше. Від одного типу схрещування отримували декілька рослин, які мали однакову оцінку за стійкістю. Тільки для гібридів 525, спостерігали розщеплення, дві рослини з шести мали ураженою 20% рослини, решта – 60%. Оцінку цитологічної стабільності таких гібридів проводили за підрахунками кількостей мікроядер у тетрадах. Якщо на стадії тетрад, переважали клітини без порушень, то можна припустити, що або хроматин, який утворював би мікроядра, був втрачений раніше під час поділу, або він взагалі був відсутній. Дослідні гібриди F_1 отримані від стійких гібридів F_2, ймовірно відбувається втрата послідовностей, які могли б забезпечувати стійкість, під час гібридизації. Оскільки цитологічно стабільні гібриди різною мірою вражаються збудником борошнистої роси у польових умовах. З року в рік раси патогену, які циркулюють, змінюються, і рослини F_2 могли бути стійкими до інших рас. Однак мейоз у таких гібридів не характеризувався цитологічною стабільністю [157]. Це могло сприяти усуненню послідовностей-стійкості з статевих клітин рослин і відсутність їх передачі до дослідних гібридів.

Для всього отриманого рослинного матеріалу гібриди F_2 запилювали пилком різних сортів. Можна спробувати змінити напрямок схрещувань та перевірити як відбуватиметься мейотичний поділ. Проводили раніше перевірку впливу напрямку схрещування на перебіг мейозу [157]. Гібриди отримані через використання пилку від генотипу інтрогресивного походження (зворотній напрямок схрещування) сприяло переважанню клітин без мікроядер. При цьому

на стадії метафази I статистично доведеної різниці між хромосомними асоціаціями не було знайдено. В поточному дослідженні рослинний матеріал отриманий через пряме схрещування – генотип з інтрогресіями був матір'ю. Під час запилення від материнського компонента схрещування іде цитоплазма та весь її вміст, наприклад хроматин чужинного походження. Від батька ідуть тільки спермії з дібраним генетичним матеріалом в їхньому складі. Це може сприяти нестабільності поділу.

Серед дослідженого рослинного матеріалу не було виявлено такої комбінації генотипів «сорт / сорти – інтрогресивна лінія», яка б одночасно забезпечувала перебіг мейозу без утворення мікроядер та одночасно такий гібрид був стійкий до борошнистої роси. У рослин зі стабільним поділом спостерігали ураження борошнистою росою.

Під час підрахунку кількості хромосом та порівняння хромосомних асоціацій у М1 не враховували фрагментів хромосом, які були менших розмірів, порівняно з наявними у тій же метафазній пластинці унівалентами. Фрагменти хромосом були у М1 гібриду 446/1 (1 фрагмент), 506/1 (1 та 2 біваленти на різних пластинках), 534/1 (2 фрагменти) (рис. 3.33). Квадриваленти різної форми об'єднували в одну групу.



А Б

Рис.3.33. Фрагменти хромосом (показні стрілками) під час МІ у 506/1 (А), 534/1 (Б).

Як і у випадку мікроядер, результати, отримані з різних рослин одного типу схрещування, порівнювали між собою, у випадку відсутності різниці кількості об'єднували. Розподіл кількостей різних хромосомних асоціацій є нормальним, тому використовували параметричний t-критерій Стьюдента. Співставляли середні кількостей хромосомних асоціацій амфідиплоїда Авротіки з кожним з дослідних гібридів, для яких отримані результати під час М1 (табл. 3.43). У другому та третьому стовпцях таблиці наведені інтрогресивні лінї та сорт (-и), генетичний матеріал яких можуть мати гібриди. У тілі таблиці наведені середні значення та стандартні відхилення. Для деяких гібридів порахували кількості тільки в одній МКП, тому такі генотипи не порівнювали з Авротікою, у таблицю внесені дані про них, як абсолютні значення. Амфідиплоїд є першоджерелом послідовностей, які можуть забезпечувати стійкість, та його генетичний матеріал у різній кількості є у складі геномів інтрогресивних ліній, які і використовували для створення дослідних гібридів. Чужинний хроматин, може слугувати індуктором зміни нормального перебігу мейозу та формування нових комбінацій послідовностей у гібридів.

Авротіка є стійкою до борошнистої роси, хоч і має нестабільний мейотичний поділ з утворенням унівалентів, відкритих бівалентів, тривалентів та квадривалентів. Порівняння з сортами не проводили, оскільки вони характеризуються формуванням 21 переважно закритого бівалента. Відкриті біваленти утворювалися через транслокації, присутні у геномах сортів, наприклад через житню транслокацію 1BL·1RS у сорту Аврора [149]. Серед гібридів найменш часто зустрічаються триваленти, що статистично відрізняє їх від Авротіки (2,67±1,12), при цьому збільшується кількість однієї або одночасно декількох інших хромосомних асоціацій. У різних рослин від схрещування tica1075 х Ніконія по одному триваленту на клітину, та ще один – у 534/1, який може поєднувати генетичний матеріал tica1049, Ніконії та Аврори.

Таблиця 3.43

Співставлення хромосомних асоціацій Авротіки та дослідних гібридів F_1

Генотип	Інтрогресивні лінії	Сорти	Кількість МКП	Унівалєнти	Біваленти		Мультиваленти	
					закриті	відкриті	III	IV
Авротіка	-	-	118	3,03±1,21	13,87±2,04	4,45±1,47	2,67±1,12	4±0
402	tica1130	Тіра, Ніконія	7	2,5±0,71	15±02,38	4,57±1,51	0±0**	0±0
404	Те ж	Те ж	8	4±0**	14,75±02,38	4,37±2,13	0±0**	0±0
405	- « -	- « -	1	1	16	2	0	0
407	tica1075	Вдала, Ніконія	2	11±0**	13±0**	2±0**	0±0**	0±0
409	Те ж	Те ж	1	0	12	8	0	0
411	tica1012	Лелека, Аврора	2	0**	17,5±04,95	5±0**	0±0**	0±0
414	Те ж	Те ж	52	5,33±3,25**	13,54±2,97	4,36±2,41	0±0**	0±0
415	- « -	- « -	4	6±4,08	14,25±2,06	4±1,41	0±0**	0±0
416	tica1103	Лелека	1	4	14	5	0	0
423	tica1012	Одеська 267, Аврора	1	2	14	3	0	0
429	Те ж	Те ж	1	0	17	3	0	0
430	- « -	- « -	2	2±0**	18±1,41**	2,5±0,71**	0±0**	0±0
431	- « -	- « -	2	4±0**	10±0**	8±1,41**	0±0**	0±0
438	tica1063 x tica1061	Одеська 267	3	10±0**	16,67±5,86**	2±0**	0±0**	0±0

Продовження табл. 3.43

439	Те ж	Те ж	1	1	15	4	0	0
446	tica1015	Селянка, Панна	4	5,5±2,08*	12,75±3,69	6±5,23	0±0**	0±0
447	Те ж	Те ж	1	2	20	0	0	0
450	- « -	- « -	2	3±1,41	13±2,83	5,5±3,54	0±0**	0±0
451	- « -	- « -	5	2,5±1	16±0,71**	2,6±3,54**	0±0**	0±0
445	- « -	Тіра, Панна	20	2±1,1**	14,5±2,7	4,65±1,79	0±0**	0±0
465	Те ж	Те ж	14	2,5±0,58**	13,86±2,44	5,78±1,97*	0±0**	0±0
466	- « -	- « -	3	2±0**	13±3,46	6,67±4,16	0±0**	0±0
473	tica1063 x tica1061	Селянка	3	7,5±1,53**	17±6,36	6±0**	0±0**	0±0
484	Те ж	Те ж	8	2,57±1,4	15,37±3,66	6±2,58	0±0**	0±0
486	- « -	- « -	3	4±1	9,33±0,58**	7,667±2,08**	0±0**	0±0
487	- « -	- « -	3	2,67±1,15	11,33±1,15**	7±2,65	0±0**	0±0
488	- « -	- « -	4	3±1,41	10,5±2,65*	6±2,45	0±0**	1±0
489	- « -	- « -	4	5±1**	9±2,45**	6,25±2,36	0±0**	3±0
492	tica1075	Ніконія	1	10	6	7	0	0
494	Те ж	Те ж	2	3±1,41	14±5,66	2±0	0±0**	0±0
497	- « -	- « -	2	3,50	10,50	7	0±0**	1±0
499	- « -	- « -	1	0	14	2	0±0**	0±0
502	- « -	- « -	18	3,46±2,26	15,59±1,97**	3,4±2,06*	0±0**	1±0
503	- « -	- « -	28	3,83±1,97*	13,96±2,43	4,68±1,73	1±0**	1±0

Продовження табл. 3.43

505	- « -	- « -	16	2,6±1,95	15,06±3,28	4,8±2,78	0±0**	0±0
506	- « -	- « -	6	2,8±1,79	14,5±3,94	5,8±3,03	0±0**	0±0
507	- « -	- « -	16	3,63±1,63	15,12±2,39*	4,18±2,23	1±0**	0±0
513	- « -	- « -	1	4	11	8	0±0**	0
519	- « -	- « -	7	3±1,41	13,86±2,73	5,28±2,29	0±0**	0±0
524	tica1049	Ніконія, Аврора	3	3±0	15,33±2,52	4,67±2,89	0±0**	0±0
526	Те ж	Те ж	6	2,5±2,12	12,83±3,87	8,33±2,42*	0±0**	0±0
529	- « -	- « -	2	0±0**	15,5±3,54	3,5±0,71	0±0**	2±0
531	- « -	- « -	8	3,12±1,25	12,12±2,8	5,87±2,17	0±0**	0±0
532	- « -	- « -	6	5,67±2,42**	10,33±1,75**	6±2,19	0±0**	1±0
534	- « -	- « -	30	2,92±1,66	14,87±2,86	4,27±2,48	1±0**	1,33±0,58
535	- « -	- « -	10	5,2±2,3**	9,7±2,71**	7,1±2,18**	0±0**	1±0
536	- « -	- « -	2	2±0**	10,5±2,12*	7,5±0,71**	0±0**	1±0

Примітки:

1) III – триваленти;

2) IV – квадриваленти;

3) * – статистично доведена різниця між Авротікою та гібридами на рівні значущості 0,05 за допомогою t-критерію Стьюдента та ** – на рівні значущості 0,01.

Середні значення унівалентів, відкритих та закритих бівалентів, відносно амфідиплоїда, коливаються в менший та більший бік. У 430/1, 457/1, 465/1, 466/1, 536/1 кількість унівалентів є меншою, ніж 3,03±1,21, що спостерігали для Авротіки. Рослини 411/2, 529/1 взагалі не мають унівалентів.

Крім закритих та відкритих бівалентів під час М1 спостерігали уніваленти, яких була різна кількість та вони мали різні розміри. Уніваленти можуть утворюватися через асинапсис (відсутність кон'югації у профазі – prophase pairing) або десинапсис, тобто розходження хромосом, які просторово зблизилися у профазі, але без утворення хіазм. Ми спостерігаємо тільки результат одного з цих процесів або їхнє поєднання без встановлення причини. Уніваленти та біваленти можуть по-різному рухатися до полюсів після метафази. Закриті та відкриті біваленти під час М1 розташовані по центру клітини, уніваленти частіше на периферії ядра. Під час анафази 1 уніваленти зазнають екваційного поділу, тобто всі хромосоми потраплять у дочірні клітини, біваленти – редукційного, коли до кожного з полюсів відійде по одній хромосомі з бівалента. Ймовірність однієї хромосоми відійди до одного з полюсів – 0,5. Уніваленти, які пройшли екваційний поділ, є однією з причин розвитку порушень у другому поділі. Частина з них може не бути включеною в телофазні ядра, тому виникають мікроядра, фрагменти менших розмірів, які можуть бути конденсовані. Уніваленти будуть еліміновані, що зменшуватиме кількість хроматину, яка буде передана від батьківського організму.

Кількість унівалентів вказує на кількість чужинних хромосом, які отримали гібриди. Пшеничні хромосоми мають пару для кон'югації під час мейозу, тому мають потрапляти всі до нащадків, чужинні хромосоми спостерігаються, як уніваленти, які розподіляються випадковим чином до полюсів та можуть не потрапити у гамети та потенційно можуть мати хроматин, який може містити або ні послідовності, які пов'язані зі стійкістю. Х. Кіхара [166] показав, що ймовірність унівалента пшениці відійти під час поділу до одного з полюсів – це 0,25, бути втраченим – 0,75. Переважно, кінцева доля унівалентів перейти до стану гетерохроматину та зрештою вони будуть

втрачені та не потраплять до пилкових зерен. Оскільки ці гібриди отримані через низку схрещувань, починаючи від запилення між інтрогресивною лінією та сортом пшениці м'якої, тому унівалєнти можуть мати генетичний матеріал різного походження – бути повністю чужинним, стосовно сортів, або мати як пшеничні, так і чужинні послідовності.

У складі обстежених МКП унівалентів не було взагалі або спостерігали парну кількість – 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 унівалентів, або непарну переважно з кількістю хромосом, відмінною від 42. МКП гібридів з анеуплоїдною кількістю хромосом, тобто меншою 42, та еуплоїдною, можуть мати різну здатність до статевої репродукції [166], оскільки на клітини чоловічої статевої сфери діє сильний добір. Анеуплоїдні гамети та з незбалансованою кількістю хромосом не здатні конкурувати з еуплоїдними [167]. Тому для того, щоб МКП не була усунена від запліднена вона має бути зі збалансованою кількістю хромосом, на такі МКП з певними кількостями хромосомних асоціацій не зважали під час розрахунків. Найбільша кількість унівалентів, які спостерігали була у гібриду 414/1, отриманого за участі лінії tica1012 та сортів Лелека та Аврора, МКП гібриду 411/2 того ж походження не мав жодного унівалента. 17 унівалентів, ймовірно, містять чужинні послідовності, відносно пшеничного геному, така МКП всього мала 30 хромосом, решта з яких – ймовірно, є пшеничними та мають пару для кон'югації. В гібриду 507/2 5 унівалентів, але в одній пластинці з одним тривалентом, загалом – 42 хромосоми. У гібридів 430/1, 438/2, 451/1, 502/1 зі зменшенням кількості унівалентів зростає кількість закритих бівалентів. За винятком рослини 451/1, перелічені гібриди різною мірою вражаються борошнистою росою. У МКП гібридів 486/2, 487/2, 431/2, 532/1 та 535/1 реєстрували меншу кількість бівалентів, порівняно з амфідиплоїдом. Перші два гібриди були стійкими, решта – різною мірою уражувалася.

Серед перелічених рослин зі зменшенням зустрічності унівалентів кількість закритих бівалентів зростає у 430/1, 438/2, 451/1, 502/1. За винятком 451/1, перелічені гібриди є чутливими до борошнистої роси. Серед нащадків,

які потенційно можуть мати генетичний матеріал від Селянки, Панни, лінії tica1015 (451/1) спостерігали розщеплення за ознакою інтересу – на стійких та тих, що уражуються грибом. Коли ж кількість закритих бівалентів зменшувалася, порівняно з амфідиплоїдом, 486/2, 487/2 є стійкими, 431/2, 532/1 та 535/1 – чутливі. Рослини 407/1, 489/2 розщеплювали за ознакою стійкості.

Між цитологічною стабільністю та стійкістю до борошнистої роси існує негативний зв'язок – цитологічно стабільні гібриди уражуються збудником борошнистої роси. Для розширення розуміння природи спостережуваного можна спробувати змінити напрямок схрещування і використовувати пилок стійкого батька для запилення сортів. Паралельно з вивченням мейозу аналізувати рослинний матеріал за генами стійкості. Відслідковувати походження цих послідовностей – чи вони походять від геному Т, який має стійкий амфідиплоїд, чи все ж мають щось спільне з пшеничним хроматином. Та як ці послідовності змінюються з покоління в покоління, що стійкість втрачається, чи можна вважати зміну рас патогену єдиним фактором втрати стійкості. Варто перевіряти в складі яких хромосомних асоціацій будуть ідентифіковані послідовності, які можна пов'язати зі стійкістю, та чи будуть взагалі, як у стійких, так і у чутливих гібридів.

3.10. Нетипові порушення перебігу першого та другого поділу мейозу

Крім описаних в попередньому підрозділі, спостерігали і порушення, які трапляються не часто, інколи вони зареєстровані тільки в одній клітині. Порушення реєстрували на різних стадіях. Серед них були:

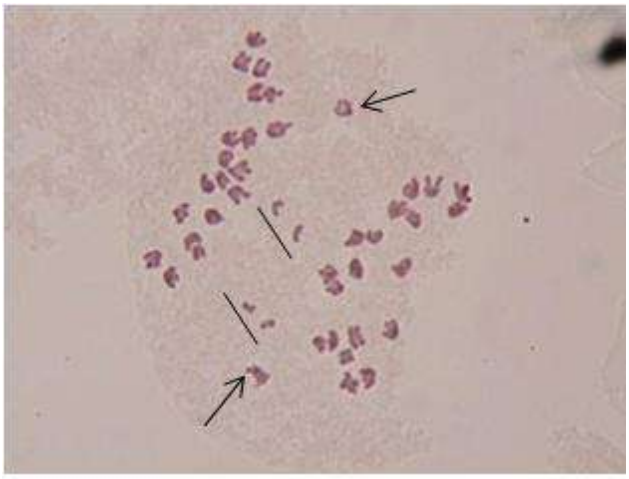
1) кільцеві фрагменти на різних стадіях поділу;
2) хромосомні мости під час анафази та телофази першого та другого поділів;
3) асинхронний поділ з поєднанням стадій першого та другого поділів мейозу;
4) хромосоми або їхні фрагменти, які відставали від загального поділу;
5) фрагментація хроматину / ядер;
6) хроматин виходить за межі оформленого ядра;

7) мікроядра різних розмірів, які відокремилися з цитоплазмою на стадії тетрад;
8) великих розмірів мікроядра у тетрадах;
9) мікроядра не на стадії тетрад та великі мікроядра.

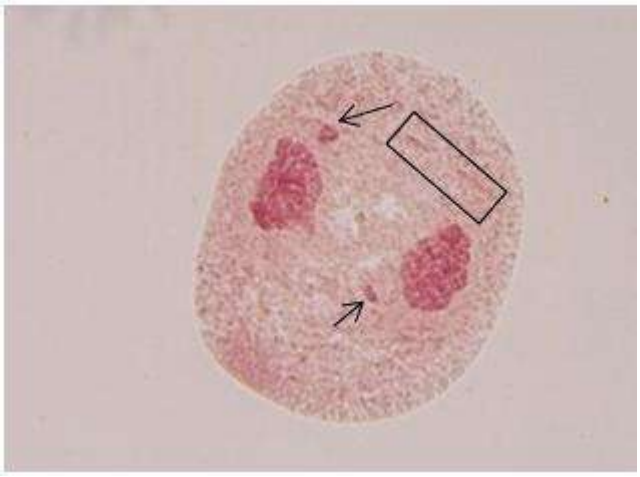
Перераховані порушення можна розділити на дві групи. В першу групу можна віднести відмінності у поділі, які виникають через відсутність синапсу між хромосомами, подальшої кон'югації. Це випадки під номерами 1 та 5, а також утворення унівалентів, відкритих бівалентів та мультивалентів. Другу групу утворюють решта перерахованих випадків, які є результатом відходження частини хроматину через відсутність пари для кон'югації.

Спостерігали кільцеві фрагменти або хромосоми (залежно від стадії) під час анафази I, телофази I та II, більшість паралельно зі звичними мікроядрами на стадії тетрад. Форму кільця можуть набувати і хромосоми, і хромосомні фрагменти, що визначити складно. Можна це тільки припускати, знаючи стадію поділу. Під час анафази I у 414/1 (2 клітини) (один з прикладів на рис. 3.34 А), 503/1 (1 клітина) спостерігали по одній хроматиді, яка утворювала кільце. На цій стадії неочікувано бачити хроматиди, оскільки мають розходитись до полюсів хромосоми, а вже під час анафази другого поділу хроматиди. Хроматиди на мікрофотографії підкреслені лініями. Для решти хромосом видно, що вони складають з хроматид, в деяких вирізняється центромера. На стадії телофази I тільки одна клітина 503/1 мала один кільцевий фрагмент біля одного ядра та ще один некільцевий біля іншого (рис. 3.34 Б).

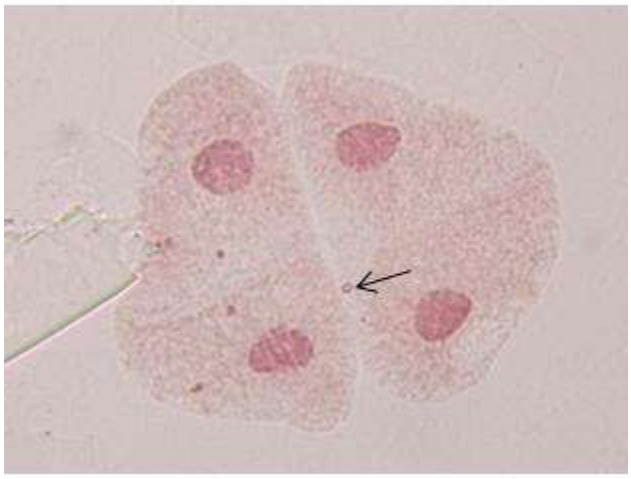
У 419/1 під час телофази II одна з діад мала кільцевий фрагмент, у інша діада – 3 мікроядра (рис. 3.34 В). На цій же стадії одна клітина 526/2 з пари мала тільки два ядра, між якими сформувалася перетинка, в іншій – два основних ядра, 1 мікроядро та 1 кільцевий фрагмент лежали у спільній цитоплазмі (рис. 3.34 Г). Ще одна діада 423/1 мала одну клітину з одним мікроядром та одну клітину з кільцевим фрагментом. У 424/1 одна діада мала мікроядро, інша – мікроядро та кільцевий фрагмент.



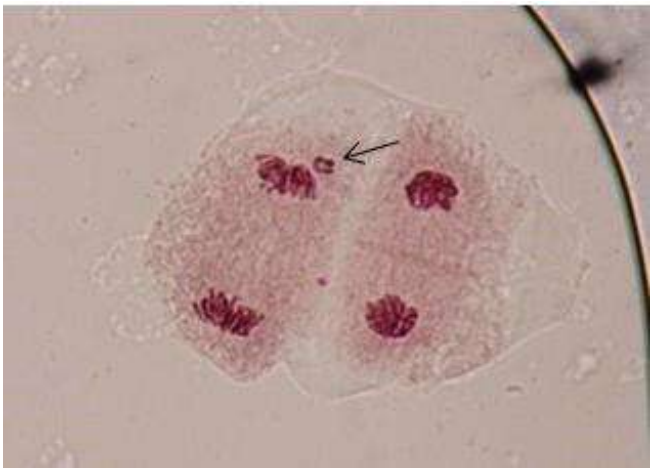
А



Б



В



Г

Рис. 3.34. Кільцеві фрагменти у клітинах під час мейозу (показані стрілками): А – анафаза I гібриду 414/1; Б – телофаза I гібриду 503/1; В – кільцевий фрагмент та мікроядра у 419/1 під час телофази II; Г – клітина під час анафази II у 526/2.

Кільцеві фрагменти чи хромосоми спостерігали і в складі клітин інших гібридів на стадії тетрад паралельно з мікроядрами (табл. 3.44). У тілі таблиці наведені кількості клітин, для яких спостерігали певну кількість мікроядер чи кільцевих фрагментів (зазначені у дужках). Були випадки одночасного зустрічання мікроядер та кільцевих фрагментів у одній і тій же клітині тетради. Серед досліджених клітин спостерігали тільки один кільцевий фрагмент на клітину. Інші клітини тетради могли бути або без порушень, або з різними кількостями мікроядер, також одночасно могли зустрічатися обидва випадки.

Таблиця 3.44

Кількості клітин з кільцевими фрагментами та мікроядрами на стадії тетрад

Гібрид	Кількість клітин тетради		
	без порушень	з мікроядрами	з кільцевими фрагментами
414/1	0	2 (1) **, 1 (3)	1 (1) **, 1 (1)
	1	1 (1), 1 (2)	1 (1)
414/2	2	0	2 (1)
424/1	1	1 (1), 1 (2)	1 (1)
427/1	2	1 (1) **, 1 (2) **	1 (1)
	0	2 (1), 1 (2)	1 (1)
427/2	0	3 (1), 1 (2) **	1 (1) **
431/1	1	1 (1)	2 (1)
	2	1 (1 та 1 мікроядро великого розміру), 1 (1) **	1 (1) **
454/1	2	1 (1)	1 (1)
	2	2 (1) **	1 (1) **
456/1	1	2 (1)	1 (1)
465/1	1	3 (1) **	1 (1) **
466/1	0	3 (1)	1 (1)
474/1	1	3 (1) **	1 (1) **
	1	3 (1) **	1 (1) **
484/1	2	1 (1)	1 (1)
	3	0	1 (1)
485/2	3	0	1 (1)
488/1	2	1 (1)	1 (1)
488/2	0	1 (1), 1 окремо	2 (1)
	3	0	1 (1)
493/1	2	0	2 (1)
496/2	3	1 (1) **	1 (1) **

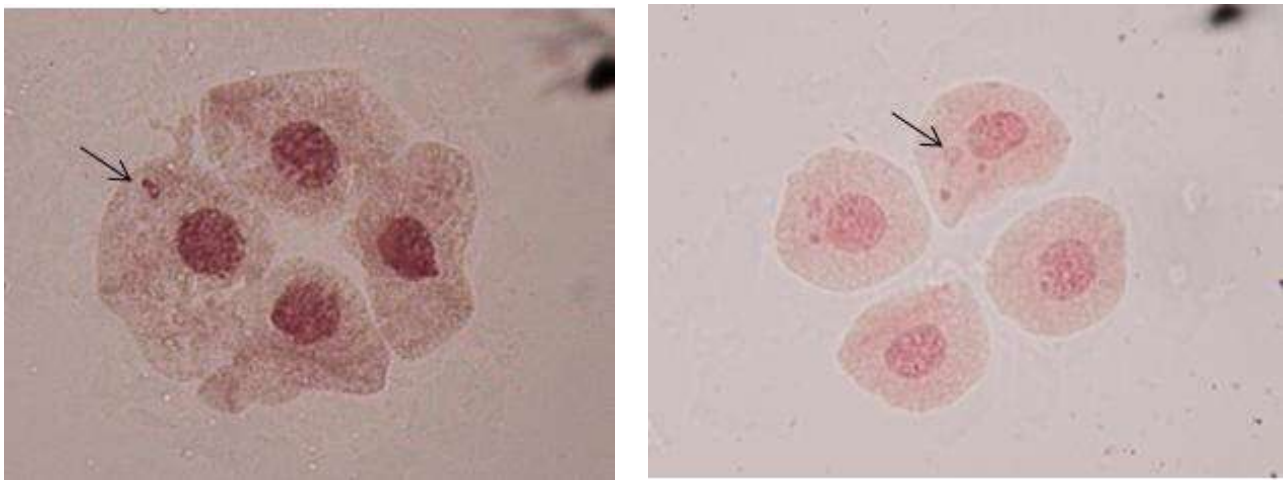
Продовження табл. 3.44

	3	1 (1)	1 (1)
503/2	1	2 (1) **	2 (1) **
	2	2 (1) **	1 (1)
507/1	3	1 (1) **	1 (1) **
	2	1 (2) **	2 (1)
507/2	1	2 (1)	1 (1)
508/1	3	0	1 (1)
508/2	1	2 (1)	1 (1)
509/1	0	3 (1) **, 1(3)	1 (1) **
513/1	2	1 (1)	1 (1)
514/1	2	1 (1)	1 (1)
	3	1 (1) **	1 (1) **
	2	1 (1) **	1 (1) **
	1	2 (1) **, 1 (3)	1 (1)
516/1	1	1 (1), 1 (2), 1 (3) **	1 (1) **
519/1	1	2 (1), 1 (1) **	1 (1) **
	0	3 (1) **	2 (1)
519/2	2	0	2 (1)
523/1	1	2 (1)	1 (2)
524/1	2	1 (1)	1 (1)
	2	1 (1)	1 (1)
	3	1 (1) **	1 (1) **
	2	1 (1) **	1 (1) **
	1	1 (1), 1 (2)	1 (1)
525/2	1	2 (1) **, 1 (2)	2 (1) **
526/1	2	0	2 (1)
526/2	2	1 (1)	1 (1)
536/1	2	1 (1)	1 (1)
538/1	3	0	1 (1)

Примітка. ** – у одній клітині були присутні одночасно кільцеві фрагменти та мікроядра.

В одній з тетрад 473/2 знаходився фрагмент у формі вісімки, частина якої (одне кільце) конденсоване, інша частина – лишилася у формі кільця (рис. 3.35 А). Одна клітина з цієї ж тетради мала одне мікроядро, ще дві – без порушень. Чотири клітини 427/1 ще лишалися лежати поруч, але спільна

калозна оболонка була втрачена. Дві клітини мали тільки по одному великому ядру. Ще одна, ймовірно, два мікроядра. Четверта клітина 2 мікроядра та один кільцевий фрагмент (рис. 3.35 Б).



А Б

Рис. 3.35. Кільцеві фрагменти у тетрадах гібриду 473/2 (А) та на стадії пилкових зерен 427/1 (Б).

Розміри таких фрагментів були різними, у 419/1 кільцевий фрагмент був малих розмірів, порівняно з великими фрагментами, наприклад у 474/1, 484/1, 526/1.

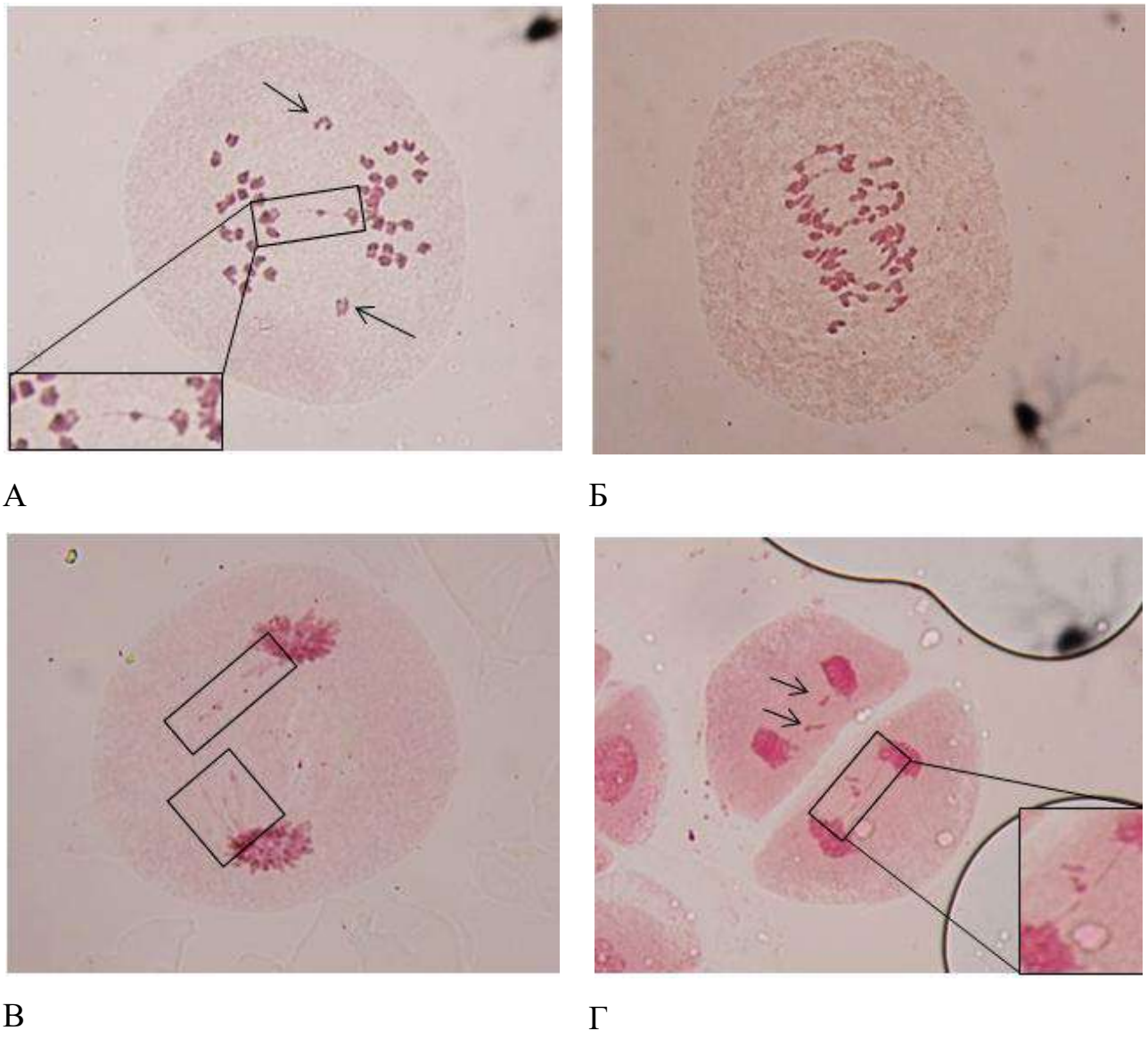
Хромосомний міст може фізично сполучати два ядра або хромосома, яка утворює міст лежить, як тяж між ядрами клітини, між хромосомами, які відійшли до кожного з полюсів. На клітину таких мостів може бути декілька. Більш звичним явищем є хромосомні мости на стадії анафази, коли клітини почали рухатися до полюсів або вже розподілилися по полюсах, наприклад як у гібриду 414/1 (рис. 3.36 А). Реєстрували різну кількість хромосомних мостів на клітину, від одного до трьох. В межах одного схрещування були випадки МКП з різною кількістю мостів на клітину (табл. 3.45). У тілі таблиці зазначені гібриди, які мали котрусь кількість мостів. У гібриду 531/1 інколи їх спостерігали, паралельно з хромосомами, які відставали.

Таблиця 3.45

Перелік гібридів з різними кількостями хромосомних мостів на клітину у анафазі першого поділу

Кількості хромосомних мостів на МКП		
один	два	три
414/1, 429/2, 431/2, 432/1, 436/1, 438/2, 441/1, 450/1, 454/1, 458/1, 466/1, 473/2, 483/1, 489/2, 497/1, 503/1, 503/2, 505/2, 506/1, 507/2, 513/2, 531/1, 536/1	438/2, 486/1, 497/2, 505/1, 505/2, 513/2, 519/2, 524/2	465/1, 484/1, 489/2, 534/1, 536/1

У 414/1 у А1 є і клітини з одним хромосомним мостом та двома хромосомами, які ще лишаються на екваторі клітини, коли інші вже розподілені по двох полюсах. На прикладі поділу у 505/2 можна спостерігати як хромосоми з різною швидкістю починають розходитись до полюсів – частина вже втратила зв'язок з гомологом (чи гомеологом), частина лишається з'єднаною (рис. 3.36 Б). У телофазі 1 одна клітина гібриду 432/1 (рис.3.36 В) мала нитки хроматину різних розмірів, які виходили з кожного ядра, подібно до того, як зображуються нитки веретена поділу, але вони не сполучають два ядра між собою. У 466/1 два ядра сполучені між собою тонким мостом, інших порушень клітина не має. Одна з діад цього ж гібриду має аналогічний міст, інша – без порушень, що спостерігали на чотирьох діадах. Подібний міст має клітина 488/2, поруч з яким лежать 2 хромосоми або їхні фрагменти, в клітині насупроти такі ж фрагменти (рис.3.36 Г). Також один міст мала клітина 503/2, 506/1.



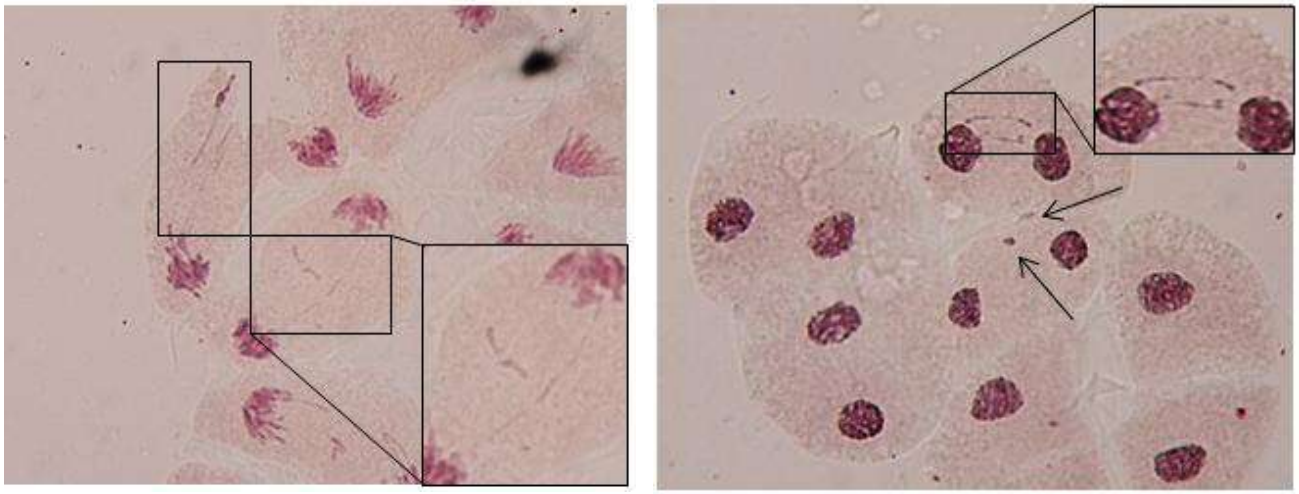
А Б

В Г

Рис.3.36. Хромосомні мости у гібридів: А – 414/1, Б – 505/2, В – 432/1, Г – 488/2.

Рослина 526/1 – клітини мають як тонкі хромосомні мости, так і тонкі фрагменти хромосом, розташовані у обох діадах (стадія ТІІ) (рис. 3.37 А). Ще одним порушенням поділу у 526/1 на стадії телофази другого поділу є два тонкі мости у одній клітині, в іншій – два мікроядра (рис. 3.37 Б).

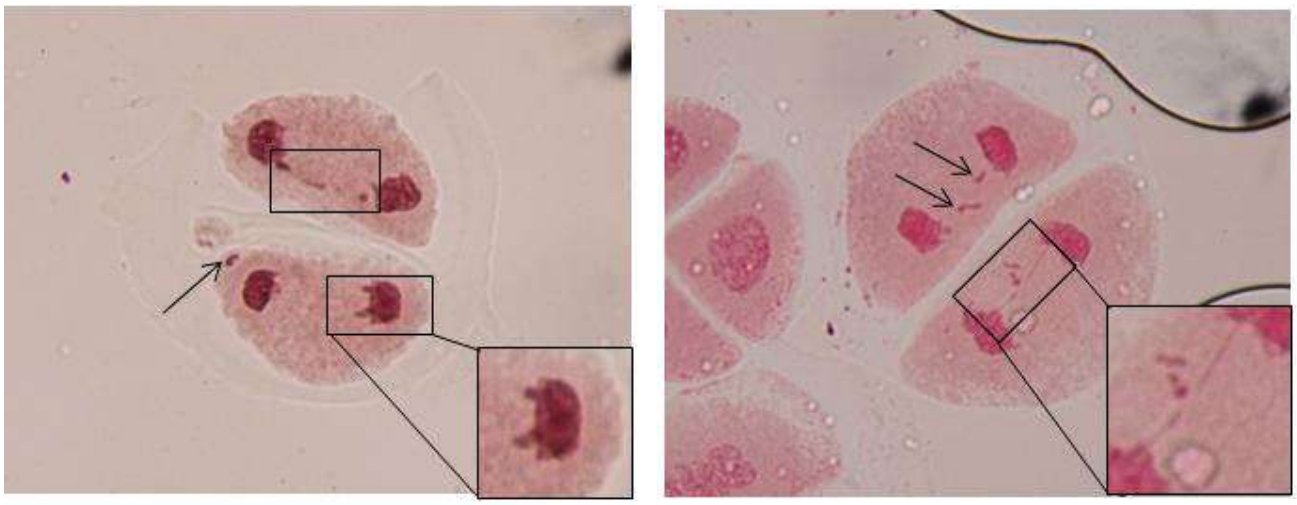
У 402/1 у телофазі 2 одна з клітин має міст та дві хромосоми, які відстали, інша – тільки дві хромосоми, які відстали. На клітину спостерігали більше одного хромосомного моста, наприклад у 411/2, 413/1 (два мости), у 405/1, 411/1 по три, Також 413/1 мав і по одному мосту на клітину, при цьому друга клітина з діади була без порушень.



А Б

Рис.3.37. Телофаза другого поділу гібриду 526/1 (А та Б).

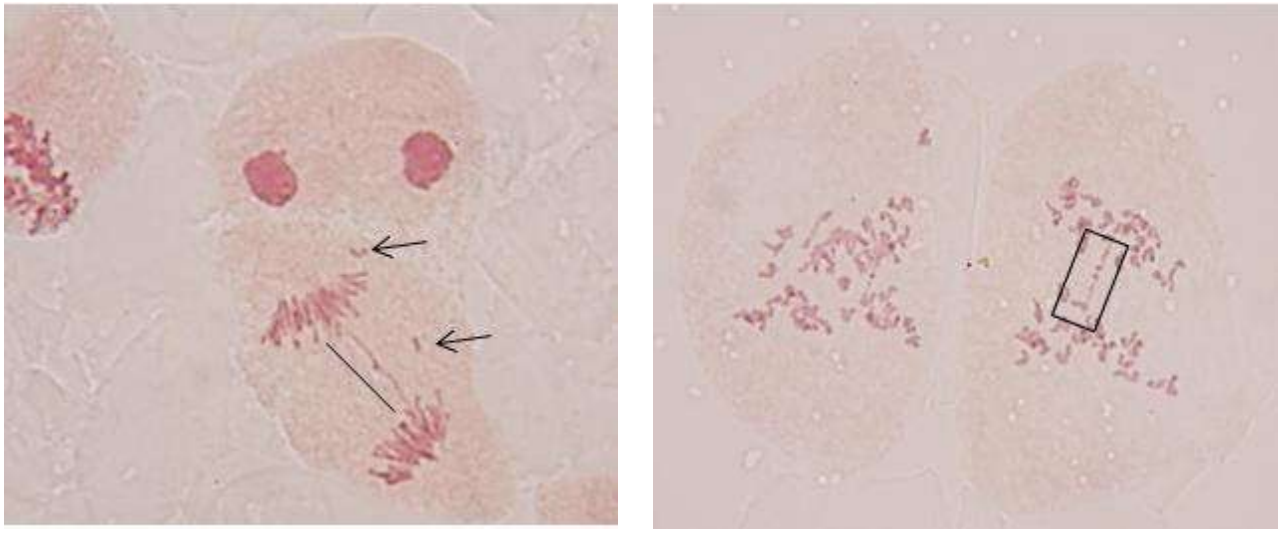
На стадії телофази другого поділу у 411/1 (рис. 3.38 А), 415/1 одна з клітин з одним хромосомним мостом, інша клітина має на периферії одну хромосому, яка відстала (біля одного ядра), та з іншого ядра випинають або лежать дуже поруч два унівалента. Подібна ситуація і з рослиною 488/2, в якої в кожній з діад по дві хромосоми, які відставали, і тільки в одній з клітин один міст (рис.3.38 Б).



А Б

Рис. 3.38. МКП на стадії телофази гібридів 411/1 (А) та 488/2 (Б) з мікроядрами (позначені стрілками) та хромосомними мостами (прямокутник).

У 466/1 крім одного хромосомного моста в одній з діад спостерігали ще і асинхронний поділ. Клітина з мостом була на стадії анафази, її пара – під час МІІ (рис. 3.39 А). У 473/1 тільки одна з діад мала два мости, 475/1 – одна з діад має один хромосомний міст, інша – три, у 492/2 – один міст та два. 494/1, 516/1 – тільки одна клітина з пари мала один міст. У клітині 496/1 хромосоми, напевно, почали тільки розходитись до полюсів, в одній з клітин цей процес відбувається швидше і уже можна спостерігати один міст, у іншій хромосоми знаходяться в центрі клітини. В обох випадках хроматин деконденсований. Хромосома, яка утворює міст, крім того, що натягнута, як струна, ще і має потовщення на собі (центромера) (рис. 3.39 Б).



А Б

Рис. 3.39. Асинхронний поділ гібриду 466/1 та початок розходження хромосом до полюсів у 496/1.

Описані хромосомні мости у стадіях, пізніших, ніж анафаза першого поділу є тонкими і швидше нагадують нитку. Або такі хромосоми надто витягуються між полюсами. На цих же стадіях, якщо є порушення у поділі, то їх більша кількість. Наприклад, клітини мали переважно один хромосомний міст на стадії анафази, на пізніших стадіях – мостів могло бути декілька, інколи в поєднанні з хромосомами, які відстали. Розміри хромосомних мостів є різними. Вони можуть бути тонкими, інші – лежатимуть, як масивний

тяж (рис.3.40 А), ще одні – фрагментовані на маленькі сегменти, які розташовані поруч один з одним (516/1) (рис. 3.40 Б).

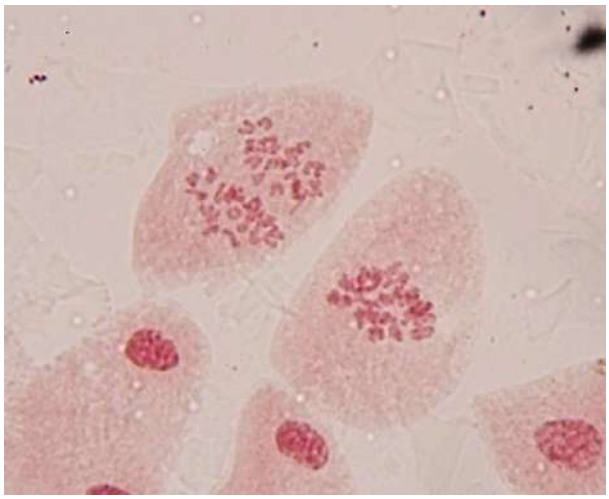
А Б

Рис. 3.40. Хромосомні мости під час першого поділу в клітинах рослини 536/1 (А) та 516/1 (Б).

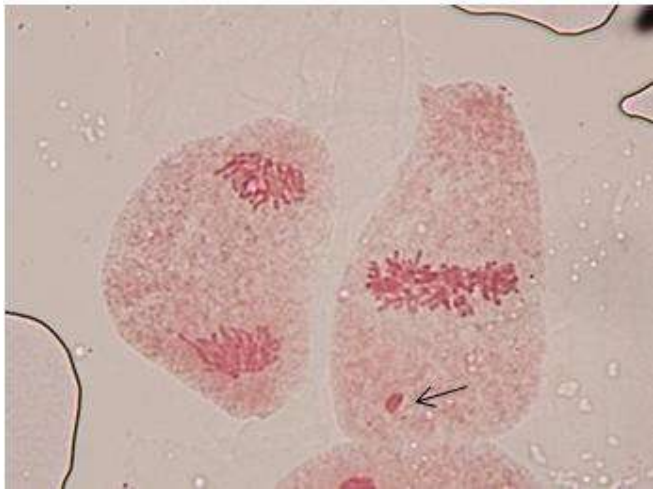
МКП частини гібридів ділилися асинхронно – одна клітина діади була на іншій стадії поділу (ранній або пізнішій), порівняно з іншою клітиною. Для діад спостерігали такі поєднання фаз поділу:

- MII + AII – 406/2, 411/1, 423/1, 426/1, 430/1, 447/1, 475/1, 482/1, 487/2, 490/1, 493/1, 494/1, 494/1, 503/1, 503/2, 506/1, 507/2, 526/1, 529/1, 530/1, 534/1 (рис. 3.41 А);
- MII + TII – 405/1, 413/1, 426/1, 436/1, 438/2, 458/1, 465/1 (рис. 3.41 Б та Д);
- AII + TII – 405/1, 406/2, 411/1, 426/1, 432/1, 465/1, 466/1, 469/1, 482/1, 487/2, 490/1, 491/1, 506/1, 506/2 (рис. 3.41 Г).

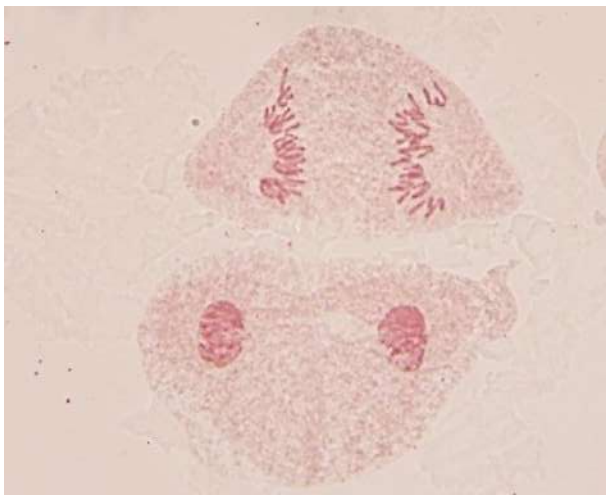
Переважно асинхронний поділ не супроводжувався іншими порушеннями. У клітині гібриду 413/1 на стадії телофази 2, інша перебувала під час MII, був один унівалент, ще частина хроматину випинала з одного з ядер (рис. 3.41 Д).



А



Б

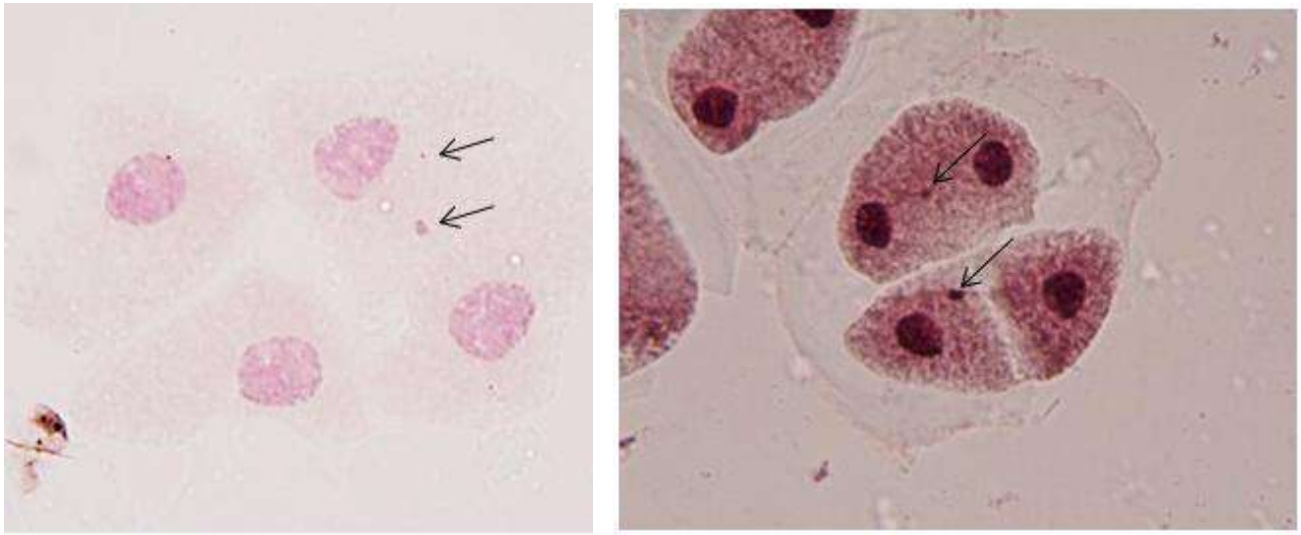


Г

Д

Рис.3.41. Асинхронний поділ з поєднанням метафази та анафази гібриду 430/1 (А), метафази та телофази у 426/1 (Б) та 413/1 (Д), анафази та телофази у 406/2 (Г) другого поділу мейозу.

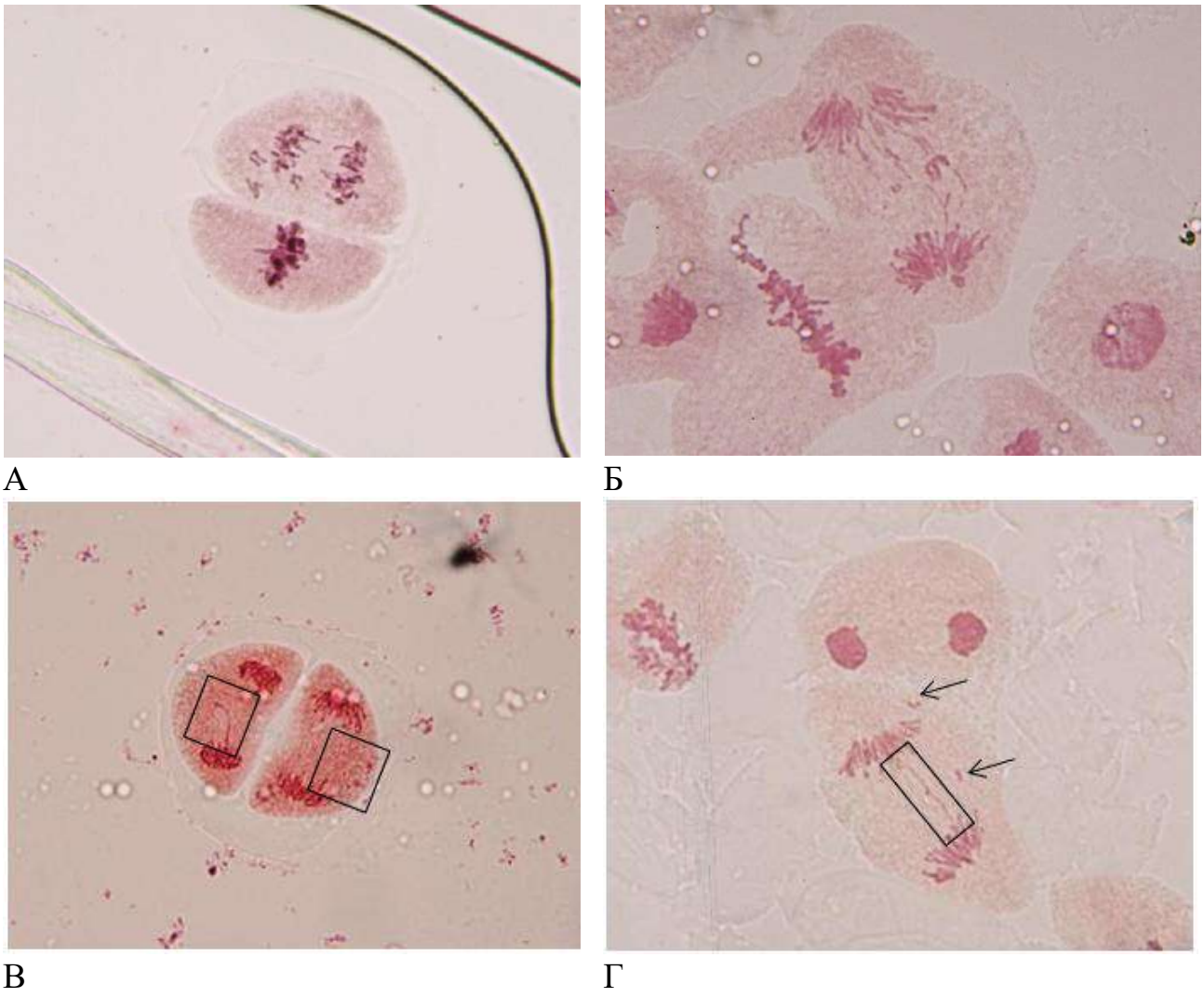
Після стадії тетрад калозна оболонка між клітинами руйнується і кожна клітина буде далі розвиватися у пилкове зерно. У гібриду 405/2, 430/2, 503/2, 506/2, 529/1, 531/1 два ядра вже мали оформлену цитоплазму навколо себе, два ядра лишалися під спільною. У 491/1, на відміну від двох попередніх рослин, у клітині з двома ядрами є ще одне мікроядро між ними (рис. 3.42 А). 503/1 мікроядро було і в одній з двох клітин, які мали по одному ядру (рис. 3.42 Б).



А Б

Рис. 3.42. Асинхронність поділу на стадії тетрад у рослин 491/1 (А) та 503/1 (Б).

У 423/1, 506/1 (рис. 3.43 А), 526/1, 534/1 (рис. 3.43 Б) одна клітина перебувала під час МІІ, інша під час анафази ІІ. Клітина на більш пізній стадії мала і хроматин, який лишився по середині клітини. У 426/1 у кожній з клітин (АІІ ТА ТІІ) були фрагменти, які відставали, розташовані по центру клітин (рис. 3.43 В). У цього ж гібриду у клітині на стадії телофази другого поділу частина хроматину відставала, інша клітина перебувала на МІІ. Також 426/1 одна з клітин діади на стадії телофази ІІ була без порушень, інша клітина на стадії метафази ІІ мала на периферії фрагмент хромосоми. Аналогічну ситуацію спостерігали і з клітиною гібриду 432/1 та 465/1. У 466/1 у діаді перебувала одна з клітин на стадії телофази ІІ, інша – на стадії анафази з двома хромосомами (на периферії та по центру) та одним мостом (рис. 3.43 Г). У 469/1 клітина на стадії телофази ІІ клітина замість двох мікроядер містить три, інша клітина перебувала на стадії АІІ. Обидві клітини діади 447/1 перебувають на стадії анафази ІІ, але в одній з них рух хроматид до полюсів тільки почався, в іншій – хроматиди розійшлися до полюсів. В обох клітинах є хроматиди, які або випереджують інші, або відстають від більшості.



А Б

В Г

Рис. 3.43. Поєднання асинхронного поділу та інших порушень у гібридів 506/1 (А), 534/1 (Б), 426/1 (В), 466/1 (Г).

На різних стадіях клітинного поділу були хромосоми, хромосомні фрагменти, які відставали від поділу. Хромосоми, які відстають, є більш звичними на стадії анафази першого та другого поділу. Далі такі хромосоми конденсуються і візуалізуються на більш пізніх стадіях, як мікроядра. На дослідному матеріалі спостерігали і відмінні від зазначених випадки. Хромосоми відставали під час телофази першого та другого поділу також (табл. 3.46). Розміри хромосомних фрагментів були різними. Фрагментами називаємо частини хромосом, які менші за саму хромосому, яку спостерігаємо поруч в тій же клітині. Відставало від одного до 9 фрагментів, які могли розташовуватися не тільки на периферії клітини, як це характерно для унівалентів, а і розташовуватись більш центрально.

Таблиця 3.46

Кількості клітин, які мали хромосоми або хромосомні фрагменти, які відставали під час поділу

Гібрид	Спостережувані порушення	Кількість МКП
Анафаза I		
414/1	4 хромосоми	2
	3 хромосоми	3
	1,4,5, 8 фрагментів	по одній МКП для кожного випадку
	6 фрагментів	2
414/2	4 хромосоми	1
	6 фрагментів	1
418/1	2 фрагменти	1
427/1	1 хромосома	1
429/1	3 фрагменти	1
430/2	2 та 3 хромосоми	по одній МКП для кожного випадку
431/2	2 хромосоми	1
432/1	2 малі фрагменти	1
	1 та 2 хромосоми	по одній МКП для кожного випадку
	1 хромосома та 2 малі фрагменти одночасно	1
437/1	1 хромосома	1
438/2	2 фрагменти	1
446/1	3 фрагменти	1
447/1	4 фрагменти	1
	3 фрагменти	2
450/1	1 фрагмент	1
	4 фрагменти	1
451/1	1 хромосома	1
	4 фрагменти	2
451/1	6, 7, 9 фрагментів	по одній МКП для кожного випадку
454/1	2 хромосоми	1
473/2	1 фрагмент	1

Продовження табл. 3.46

482/1	2 хромосоми	1
	3 фрагменти різних розмірів	1
483/1	1, 2 хромосома	по дві МКП для кожного випадку
483/2	1 хромосома	1
489/2	2 хромосоми	1
491/1	2 хромосоми	1
492/2	1 хромосома	1
497/1	1 хромосома	1
503/1	2 фрагменти	1
	4 хромосоми	1
503/2	2 хромосоми	1
	2 фрагменти	1
	2 хромосоми + 1 фрагмент	1
505/1	1, 2 хромосоми	по одній МКП для кожного випадку
	1, 2, 3 фрагменти	по одній МКП для кожного випадку
506/2	8 фрагментів	1
509/1	1 хромосома	1
516/1	2, 3, 4 хромосоми	по одній МКП для кожного випадку
524/1	2 фрагменти та 1 кільцева хромосома на одному з полюсів	1
524/2	1,2,4,5 фрагментів	по одній МКП для кожного випадку
	2 конденсовані фрагменти	1
	1 кільцева хромосома	1
531/1	1 хромосома	1
	2 хромосоми	6
	2 хромосоми та фрагмент	1
	3 хромосоми	1
	3,4 фрагменти	по три МКП для кожного
535/1	5 фрагментів	1
	2 фрагменти та 1 кільце хромосома одночасно	1

Продовження табл. 3.46

Телофаза 1		
414/2	2 фрагменти	1
421/1	2+2 фрагменти	1
427/2	4 фрагменти	1
432/1	2 фрагменти	1
436/1	1-3 хромосоми	по одній МКП для кожного випадку
	3 фрагменти	1
447/1	3 фрагменти	5
447/1	4, 5 фрагментів	по одній МКП для кожного випадку
448/1	3 фрагменти	2
450/1	1 фрагмент	1
450/2	2 фрагменти різних розмірів	1
	6 фрагментів	1
454/1	2, 3 фрагменти	по дві МКП для кожного випадку
458/1	2 мікроядра	1
465/1	5 фрагментів	1
466/1	4 фрагменти	1
473/1	2 фрагменти	1
473/2	4 фрагменти	1
482/1	1, 3 конденсовані фрагменти	по одній МКП для кожного випадку
483/1	2 фрагменти	1
484/1	2 фрагменти різних розмірів та 2 мікроядра	1
	1 фрагмент	1
485/1	4 мікроядра	1
486/1	1 мікроядро	1
488/2	1 мікроядро	1
492/2	2 фрагменти	1
502/1	2 фрагменти	1
503/1	2 фрагменти	1
503/2	3 фрагменти	1
	2 хромосоми	1
	3 мікроядра	2

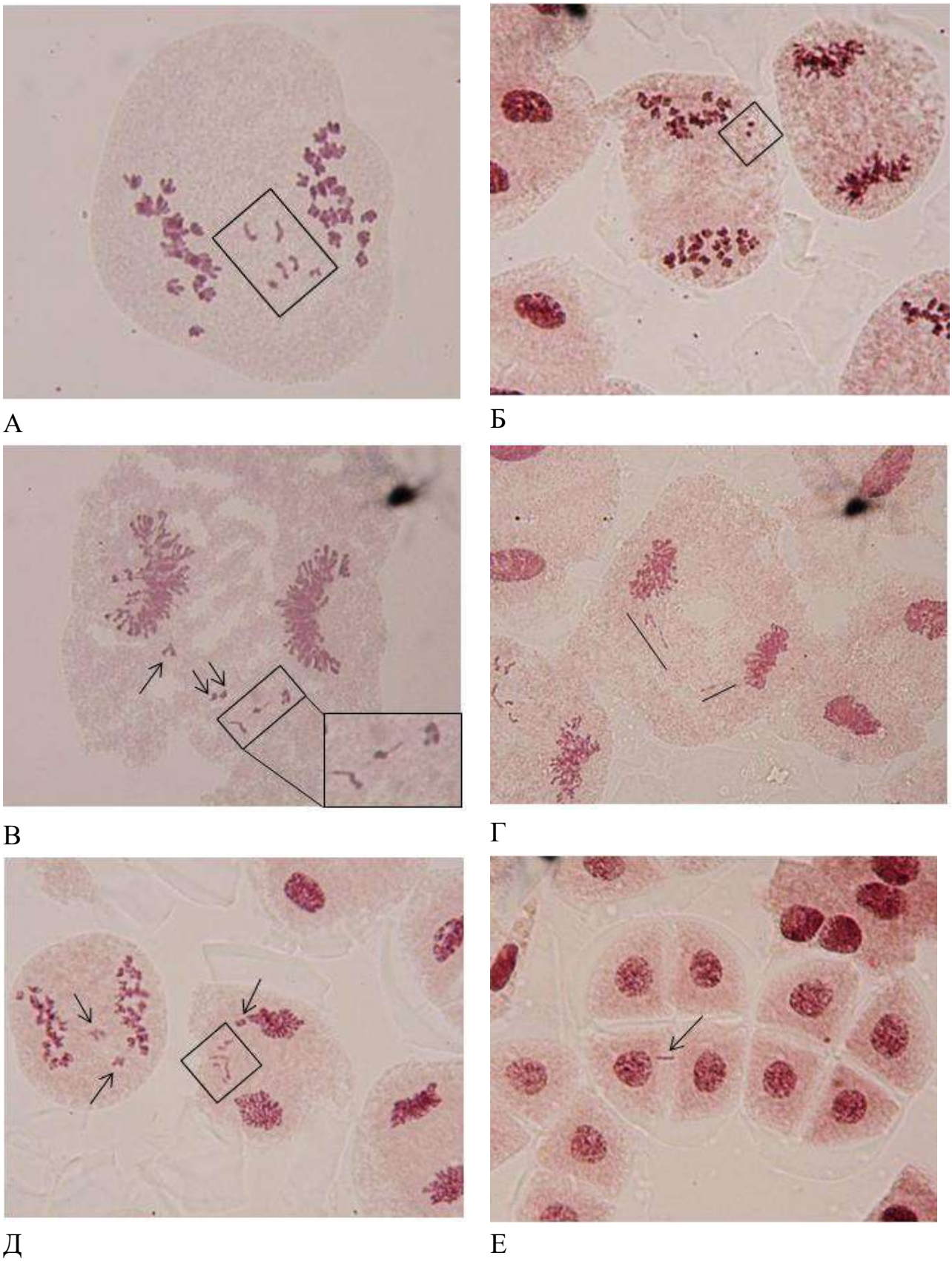
Продовження табл. 3.46

506/1	3, 8 фрагментів	1
506/2	3 фрагменти	1
507/1	5 фрагментів	2
	7 фрагментів	1
507/2	2 мікроядра	1
	1,7 фрагментів	по одній МКП для кожного випадку
513/2	4 фрагменти	1
516/1	2, 3, 4, 5 фрагменти	по дві МКП для кожного випадку
	6 фрагментів	1
519/2	4 фрагменти	1
529/1	1 фрагмент з 1 мікроядром	1
531/1	3, 5 фрагментів	по одній МКП для кожного випадку
532/1	одна хромосома у формі пательні	1
	1 хромосома	1
	3, 8 фрагментів	1
536/1	1 мікроядро	1
Анафаза 2		
411/1	2+3 фрагменти	1
423/1	4 фрагменти	1
Телофаза 2		
407/1	3+3 фрагменти	1
411/1	1+0 фрагменти	1
	1 мікроядро + 1 фрагмент	1
413/1	3+2 фрагменти	1
419/1	1+0 фрагменти	1
	3+3 фрагменти	1
423/1	1+1 фрагмент	1
	3+3 фрагменти	1
426/1	1 фрагмент+0	1
	2 фрагменти +0	1
432/1	1 фрагмент + 0	1
436/1	1+1 фрагменти	1
442/1	1+2 фрагменти	1
450/2	1 + 2 фрагменти	1

Продовження табл. 3. 46

466/1	2+3 фрагменти	1
487/2	0 + (1 хромосома + 1 мікроядро	1
	1 хромосома + 1 міст	1
	0+3 фрагменти	1
488/2	1 хромосома + 1 хромосома	1
	4+2 фрагменти	1
490/1	2+3 фрагменти	1
494/1	2+3 фрагменти	1
503/2	(4 хроматиди+1 мікроядро)+1 фрагмент	1
506/2	3+2 фрагменти	1
516/1	3фрагменти+0	1
	2 фрагменти +2 мікроядра	1
519/	2+2 фрагменти	1
528/1	2мікроядра+0	1
529/1	0+1 фрагмент	1
	1+1 фрагмент	1
531/1	2 мікроядра+4 фрагменти хромосом	1
537/1	1+1 фрагмент	1

У п’яти випадках у гібриду 414/1 три клітини мали по 6 фрагментів хромосом. Одна з клітин мала кільцевий фрагмент, який знаходився по центру клітини. Кільцевий фрагмент був і за наявності 4 фрагментів, які відстали. Приклад клітини згаданого гібриду на рис. 3.44 А. Були випадки і фрагментів хромосом, які були конденсованими, як мікроядра (рис. 3.44 Б, В, Д) або ж були у формі ниток (рис. 3.44 Г, Д,. Е). У клітині гібриду 451/1 (рис. 3.44 В) спостерігали хромосомну фігуру, схожу на міст, який розташовувався більш периферично відносно одного з ядер клітини. По середині моста є потовщення, ймовірно, це центромера. Така ситуація є незвичною, оскільки мости, які раніше спостерігали, утворювалися між двома новоутвореними ядрами в клітині.



А Б

В Г

Д Е

Рис. 3.44. Хромосоми, які відставали під час першого поділу у гібридів 414/1 (А), 524/2 (Б), 451/1 (В), 503/2 (Г), 483/1 (Д), 519/1 (Е).

У 519/1 (див.рис. 3.44 Е), 531/1 на стадії тетрад одна з клітин мала фрагмент хромосоми, решта без порушень. Хромосоми та їхні фрагменти, які не ввійшли до складу ядер клітини мають бути конденсовані, проте цього не сталося у зазначених гібридів. Очікувано було побачити у анафазі відставання парної кількості хромосом, хромосом, які або належать до різних гомеологічних груп, або є перебудованими, відносно батьківських. Фрагменти можуть утворюватися як з однієї хромосоми або ж бути частинами від різних.

На різних стадіях мейотичного поділу спостерігали кількість ядер, непритаманну для певної стадії за нормального поділу, або непритаманну організацію хроматину. Серед усіх випадків, які можна включити у цю групу порушень, кількість ядер, відмінна від нормальної для певної стадії мейозу, зустрічається найчастіше і саме під час другого етапу поділу. Під час попередніх досліджень мейозу рослин з інтрогресіями [157] профаза першого поділу проходила без порушень, які можна було б побачити у світловий мікроскоп, але не в цьому випадку. У гібриду 497/1, крім профазного ядра у цитоплазмі були додатково присутні ще 4 мікроядра (рис. 3.45 А). На стадії анафази 1 у 451/1 (рис. 3.45 Б) хромосоми розташовані на обох полюсах клітин, частина з них з'єднані між собою тонкими нитками хроматину, є ще хромосома або її фрагмент, розташований по центру. У 516/1 хромосоми за своєю формою нагадують хромосоми на стадії анафази (рис. 3.45 В), хромосоми іншої клітини з діади організовані так, як це притаманно телофазі. У цій клітині є хромосома, яка утворена фрагментами, які розташовані у цитоплазмі один за одним та утворюють ланцюжок (показані стрілкою). Є ще клітина у 454/1 на стадії метафази 1 з 41 хромосомою ($13^{Пз} + 6^{Пв} + 3^{І}$) та ще оформленим ядром (рис. 3.45 Г). Ще одним випадком порушення на стадії метафази 1 є випадок схожий на деконденсацію хроматину у 458/1 (рис.3.45 Д). Частина хромосом організована у звичні для цієї стадії хромосомні конфігурації ($14^{Пз} +5^{Пв} +1^{І}$), решта – зібрана у клубок на периферії клітини.

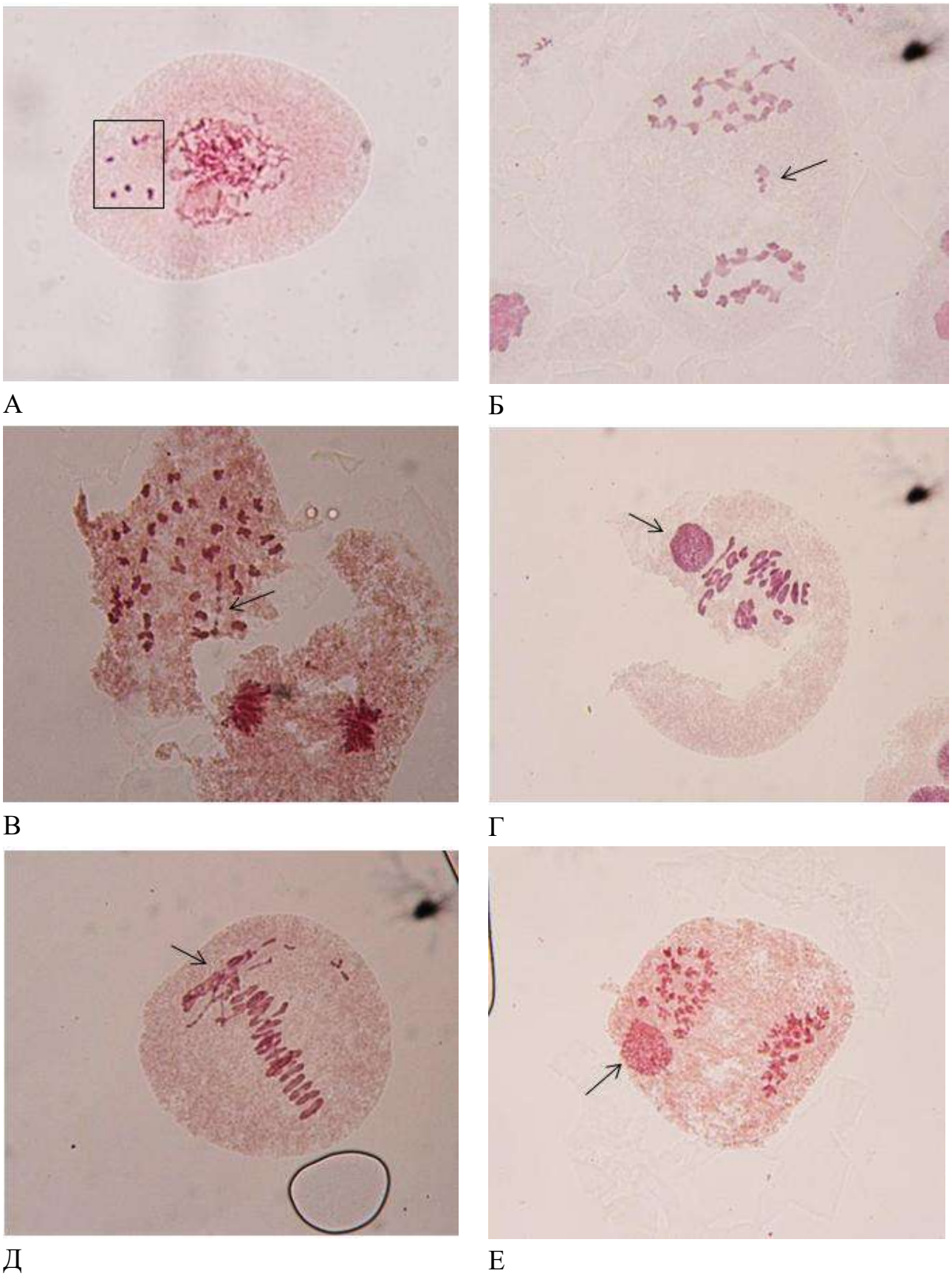


Рис. 3.45. Організація хроматину, непритаманна для певних стадій поділу у рослин 497/1 (А), 451/1 (Б), 516/1 (В), 454/1 (Г), 458/1 (Д), 503/1 (Е).

У 458/1 однозначно визначити хромосомну конфігурацію неможливо, але поруч з бівалентами та, можливо, унівалентами знаходиться частина хроматину, організована, як профазне ядро (див.рис.3.45 Д). У клітині 503/1 частина хромосом розійшлася до полюсів – 18 хромосом розташовано на одному полюсів та 19 на іншому, біля яких ще знаходиться ядро за ступенем конденсації схоже на профазне (див. рис. 3.45 Е).

У гібриду 406/2.1 на стадії телофази другого поділу у одній з клітин діади є два ядра з одним фрагментом хромосоми, у другій – два ядра більших розмірів, ще одне, розташоване між ними, трохи меншого розміру, хроматин у ньому виглядає менш конденсованим (рис.3.46 А).

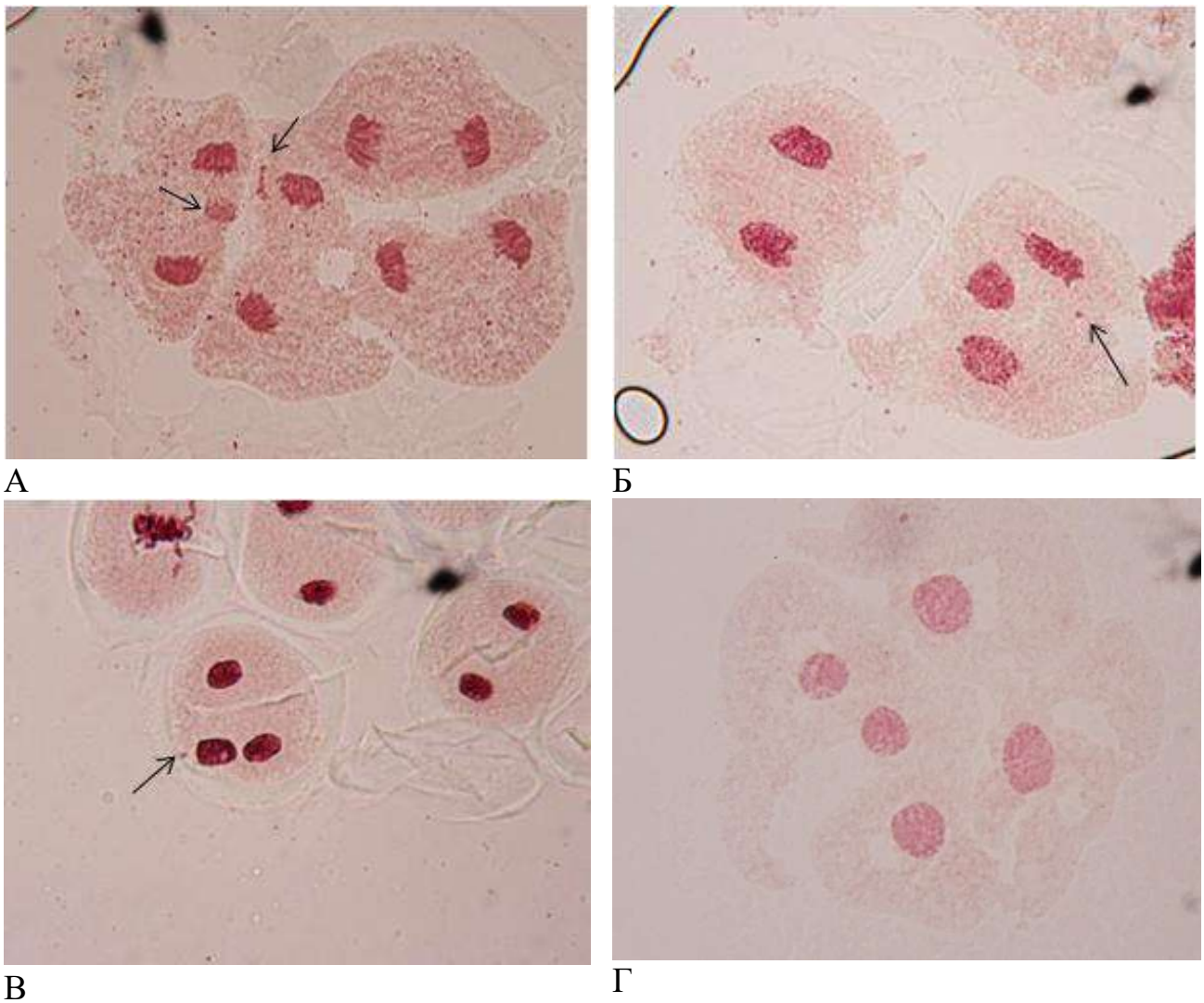
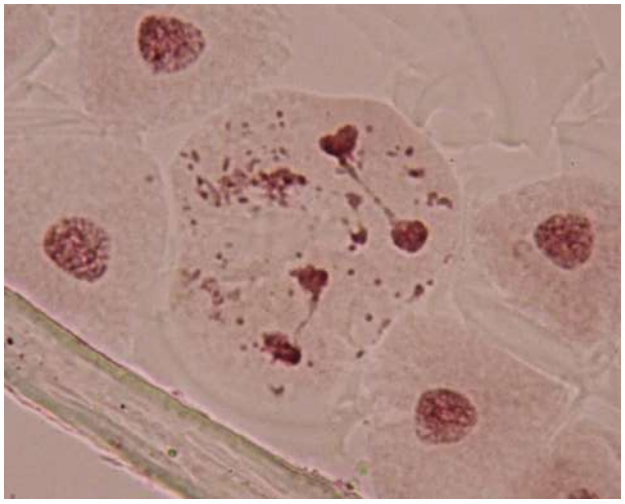


Рис. 3.46. Організація хроматину у ядра, відмінна від нормальної, у рослин 406/2.1 (А), 450/2 (Б), 454/1 (В), 488/2 (Г).

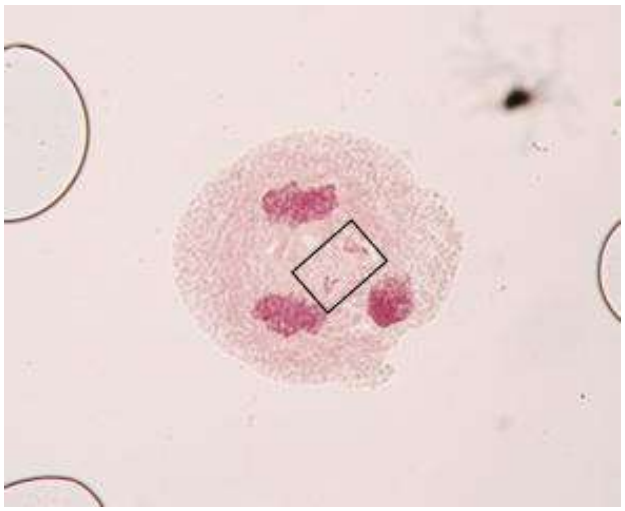
Подібний перебіг є і у клітини 450/2, з єдиною відмінністю – є мікроядро у клітині з трьома ядрами (див. рис. 3.46 Б). У 454/1 клітині на стадії телофази 1 хроматин розподілений по трьох ядрах, у клітини з двома ядрами додатково є 1 мікроядро (див. рис.3.46 В). У одному випадку 488/2 замість тетради спостерігали пентаду, одне з ядер було менших розмірів, в іншому – ядра приблизно однакового розміру (див. рис.3.46 Г). У 456/1 теж клітини утворюють пентаду, 4 клітини якої візуально з однаковими ядрами, одне меншого розміру.

Ще більш фрагментованим є хроматин у клітині гібриду 407/1 (рис. 3.47 А). Стадію визначити не вдалося. У цитоплазмі знаходиться багато шматків хроматину, розсіяних по цитоплазмі, поряд з якими є дві пари ядер, котрі попарно з'єднані мостом. У 486/2 клітина, напевно, знаходиться на стадії телофази першого поділу, проте ядро розділене на три фрагменти, кожен з яких лежить окремо один від одного (рис. 3.47 Б). Гібрид 507/1 додатково до таких трьох ядер має у цитоплазмі два хромосомні фрагменти (рис. 3.47 В), а 507/2 замість них – 1 мікроядро (рис. 3.47 Г). На стадії телофази другого поділу у 493/1 крім основних чотирьох ядер у діаді були ще додатково шматки хроматину у формі мікроядер та неоформлені у структури правильної форми (рис.3.47 Д). У тетраді 526/2 три клітини мали по одному великому ядру, дві з них на додаток мали три та одне великого розміру мікроядра (рис. 3.47 Е). У четвертій клітині хроматин розділений на дві приблизно однакові частини, поруч з якими знаходиться великий кільцевий фрагмент.

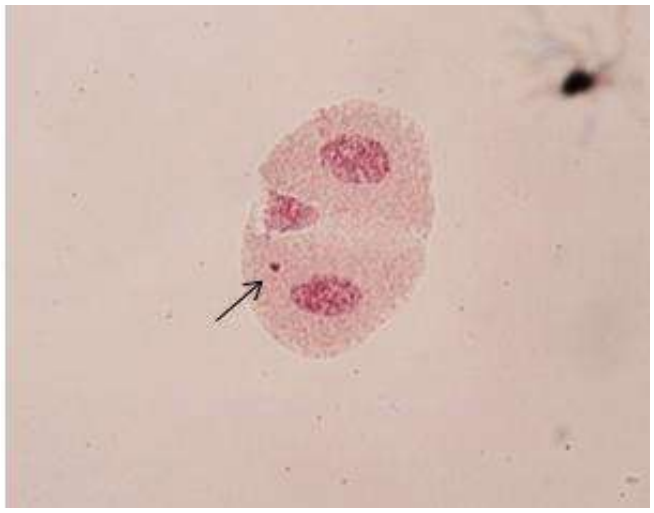


А

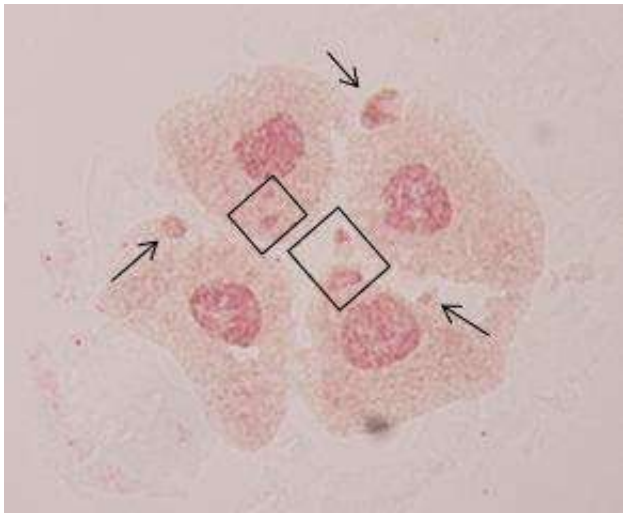
Б



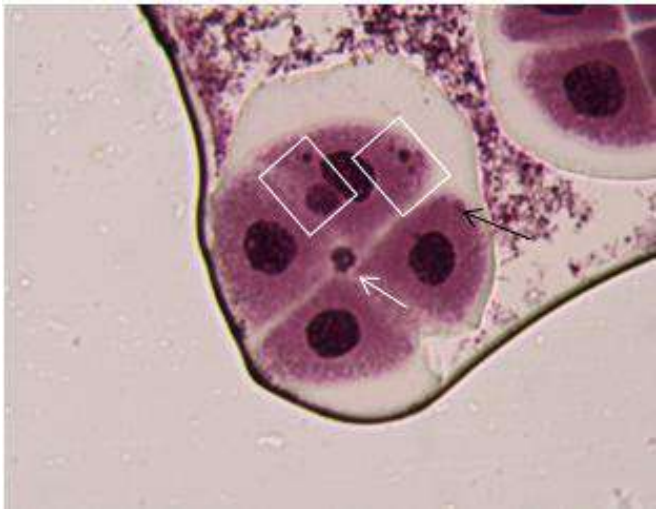
В



Г



Д

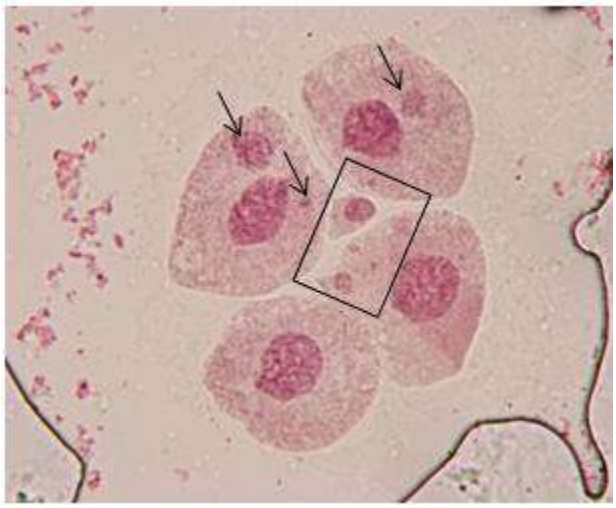


Е

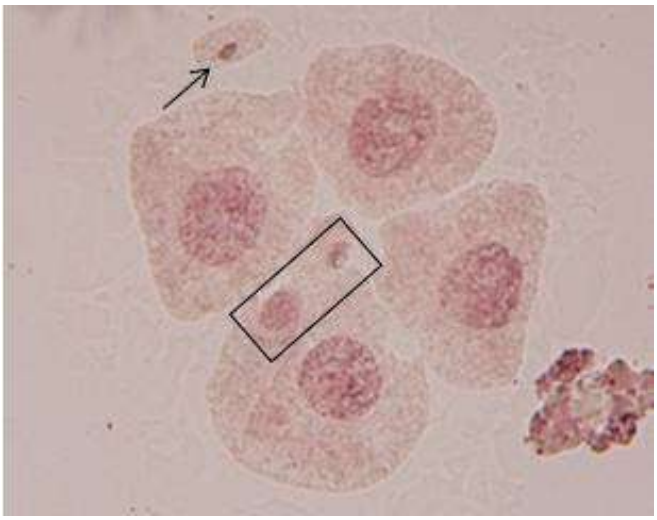
Рис.3.47. Фрагментнація хроматину у 407/1 (А), 486/2 (Б), 507/1 (В), 507/2 (Г), 493/1 (Д), 526/2 (Е).

Спостерігали порушення і на стадії формування пилкових зерен. У 446/1 калозна оболонка, яка оточувала клітини тетради, уже була зруйнована і кожна

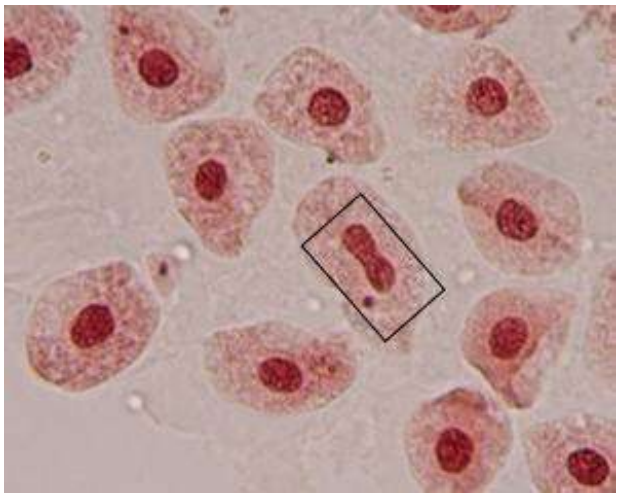
з клітин лежала окремо. Одна клітина була без мікроядер, ще в одній – 4 мікроядра різних розмірів, одне з яких велике, ще у двох клітинах по одному великому мікроядру та по одному малому (рис. 3.48 А). Крім того, поруч з описаними чотирма клітинами окремо у цитоплазмі лежать три мікроядра різних розмірів. У 471/1 тільки в одній з клітин було мікроядро великих розмірів, решта клітин без порушень, на додаток до цього поруч лежало 2 мікроядра в цитоплазмі (рис. 3.48 Б). Розмір мікроядер, які відокремились є меншим, порівняно з тим, що знаходилось під спільною цитоплазмою з ядром клітини. Ядро пилкового зерна 467/1 було не округлої форми, а гантелеподібної, на додаток було мікроядро (рис.3.48 В).



А



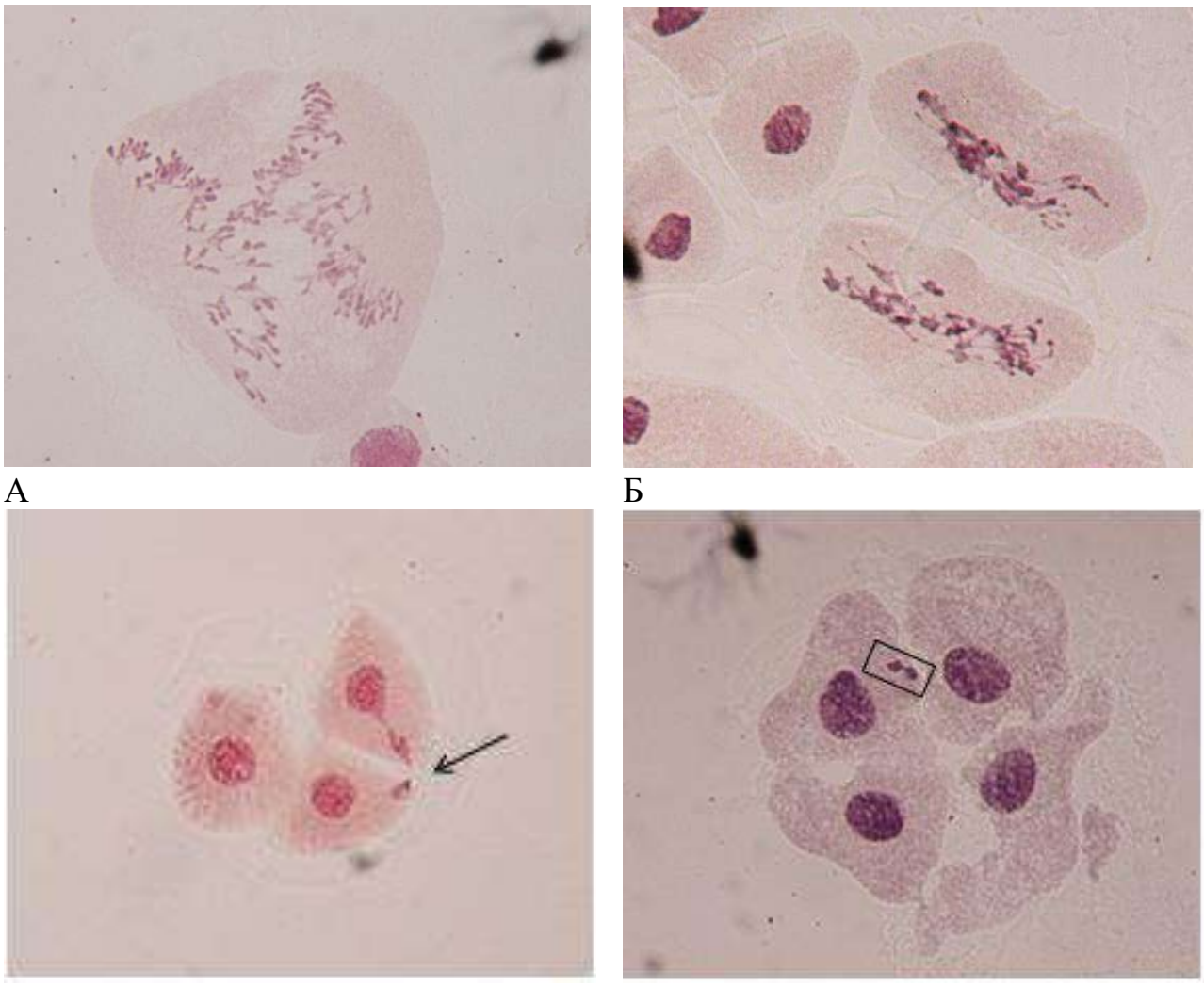
Б



В

Рис.3.48. Порушення організації хроматину на стадії пилкових зерен (А-В) у 446/1 (А), 471/1 (Б), 467/1 (В).

Зміну конденсації хроматину, притаманну для певних стадій, спостерігали під час анафази першого поділу у гібриду 414/1 (рис.3.49 А), коли хроматин більше нагадував стадію хромосомних ниток, ніж самі хромосоми. Хроматин деконденсований. Проте частина таких ниток почала рух до полюсів клітини, за такою ознакою і віднесли побачену картину до стадії анафази 1. Такі порушення реєстрували і під час другого поділу. У двох клітинах діади 513/2 (рис.3.49 Б), 534/1 хроматин був організований у тяжі з чергуванням ділянок, які були конденсовані. Спостерігали випадки, коли хроматин ніби перетікає з однієї клітини в іншу.



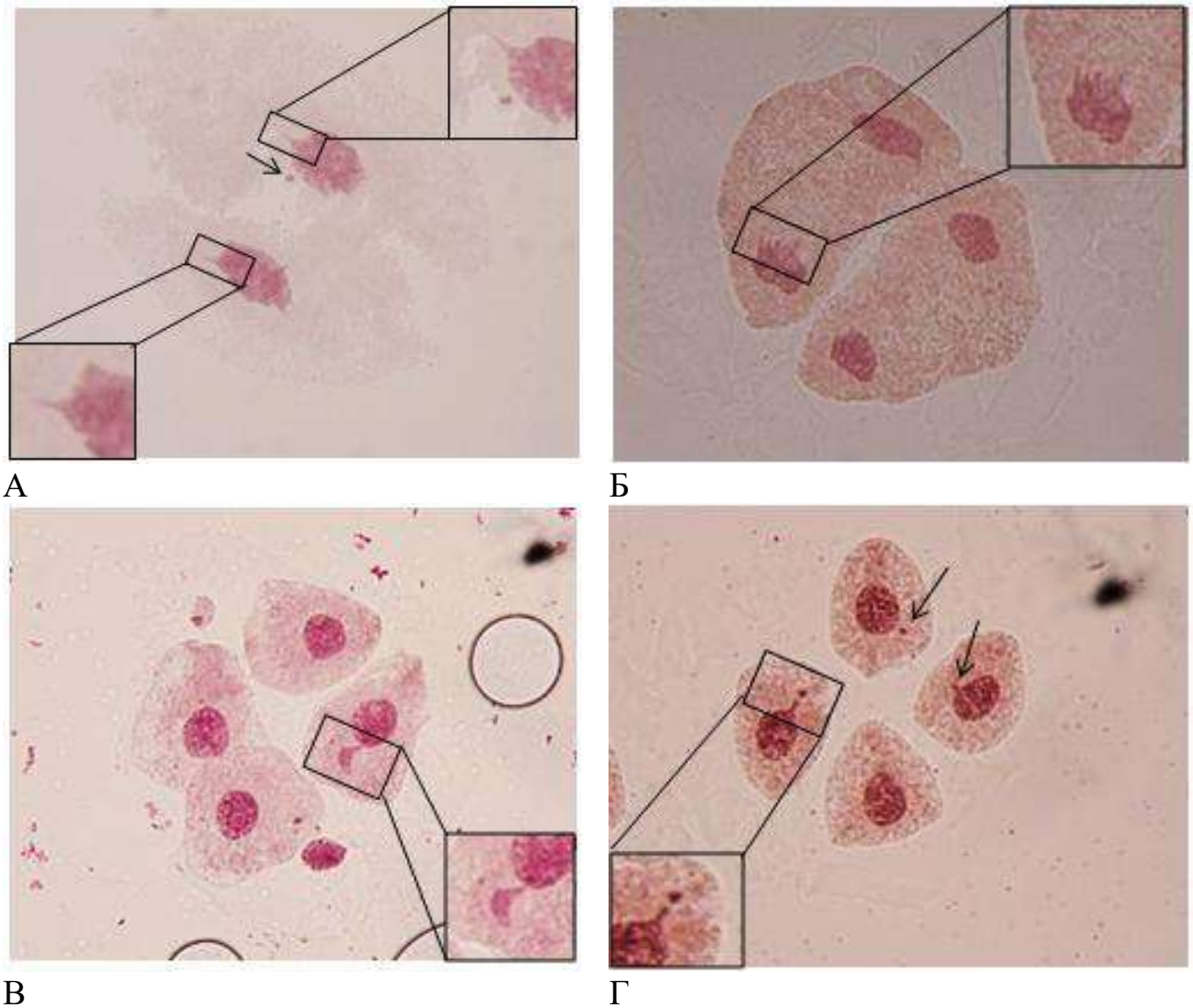
А Б

В Г

Рис.3.49. Деконденсація хроматину у 414/1 (А), 513/2 (Б) та перетікання хроматину між клітинами у 493/1 (В), між мікроядрами в одній клітині у гібриду 508/1 (Г).

У 493/1 в такий процес були залучені ядро однієї з клітин тетради, мікроядро цієї ж клітини та мікроядро іншої (див. рис.3.49 В). У 508/1 хроматиновим містком були з'єднані два мікроядра в одній з клітин тетради, решта клітин характеризувалася нормальним перебігом мейозу (див.рис.3.49 Г).

У частини гібридів спостерігали явище, коли хроматин виходить за межі оформленого ядра на стадіях телофази I (451/1, 465/1, 503/1) (рис.3.50 А), телофази II (431/2, 461/1, 503/1) (рис. 3.50 Б), тетрад (406/2, 446/1, 472/2, 473/1, 481/1) (рис.3.50 В), пилкових зерен (410/2) (рис.3.50 Г). Усі перераховані стадії об'єднані наявністю оформленого ядра з конденсованим хроматином.



А Б

В Г

Рис.3.50. Випинання хроматину з ядер у гібридів 451/1 (А), 431/2 (Б), 446/1 (В), 410/2 (Г).

Частина хроматину з ядер виходить за межі оформлених ядер у цитоплазму. На стадії телофази I та II таке явище можна пояснити за рахунок хромосом, які відстали від загального поділу та закінчують свій рух в той час, як переважна більшість хроматину знаходиться вже у конденсованому стані. Проте для інших стадій таке пояснення може бути недоречним.

Цитологічно помітною є втрата хроматину через відставання хромосом та їх подальшу конденсацію з утворенням мікроядер на стадії тетрад. Під час вивчення дослідного рослинного матеріалу спостерігали мікроядра у клітинах і на стадії телофази першого та другого поділу (табл. 3.47). Мікроядра могли розташовуватися ближче до одного з ядер або бути присутніми лише в одній клітині з пари на стадії телофази. Розташовуватися в різних частинах клітини, проте таке розташування може бути обумовлене самим процесом виготовлення чавлених препаратів.

Таблиця 3.47

Кількості мікроядер у МКП на стадії телофази першого та другого поділів

Гібрид	Кількість клітин	Кількість мікроядер	Гібрид	Кількість клітин	Кількість мікроядер
Телофаза 1			Телофаза 1		
414/1	1	3	516/1	1	1 + 0
414/2	1	1	516/1	1	1 + 1
414/2	1	1, 1 хромосомний фрагмент		2	1
421/1	2	1	519/2	1	1 + 1
427/2	1	1 + 2**	524/1	1	1 + 1
	1	1 + 1		1	3 та 3 фрагменти
431/2	1	1 + 0	524/2	1	1 + 1
437/1	1	1 + 0		1	1 + 0
438/2	1	1 +1	526/2	1	1 + 0
447/1	4	1 + 0		1	5
448/1	1	1	531/1.3	1	1 + 1
449/1	1	2			

Продовження табл. 3.47

Телофаза 1			Телофаза 2		
449/1	1	1 + 2	415/1	1	2 +3
450/1	2	1 + 1	415/1	1	4 + 3
	1	1 + 2	419/1	1	1 +1
	1	1 + 0	419/1	1	1 +0
451/1	1	1 + 2 та три фрагменти	423/1	1	1 +0
	2	1		1	1 +1*
454/1	3	1		1	1 +1
458/1	1	1 + 2		1	2 +2
465/1	1	1 + 2	426/1	1	2 + 0
465/1	1	1	432/1	1	1 + 2
466/1	1	1+1		1	1 + 0
	1	2 + 0	438/2	1	1 +0
	1	1 + 0	446/1	1	3 +0*
473/1	1	1 + 0	447/1	1	1 фрагмент + 1
474/1	1	1 + 1		1	1 + 0
481/1	1	1 + 2	449/1	1	1 + 0
	1	1 + 0	451/1	1	2 + 0
482/1	1	1 + 1		1	1 + 0
483/1	2	1 + 1	473/1	1	1 + 0
484/1	1	1 + 0	488/2	1	2 + 3
484/3	1	1 + 1 фрагмент	502/1	1	1 + 2
488/2	1	2 + 0		1	3 + 5
492/2	1	1 + 0	503/1	1	3 + 3
494/2	1	1 + 0	506/2	1	1 + 1
497/1	1	1 + 0	507/2	1	1 + 2
502/1	1	1		1	1 + 2
	1	1 + 0	516/1	1	2 + 2
503/1	1	2 + 0		1	1 + 0
503/2	1	1 + 1		1	1 + 1
506/1	1	3		1	1 + 0
506/2	1	1 + 1		1	1 + 2
507/1	1	1 + 0		1	1 + 1
	1	3	521/1	1	4 + 0

Продовження табл. 3.47

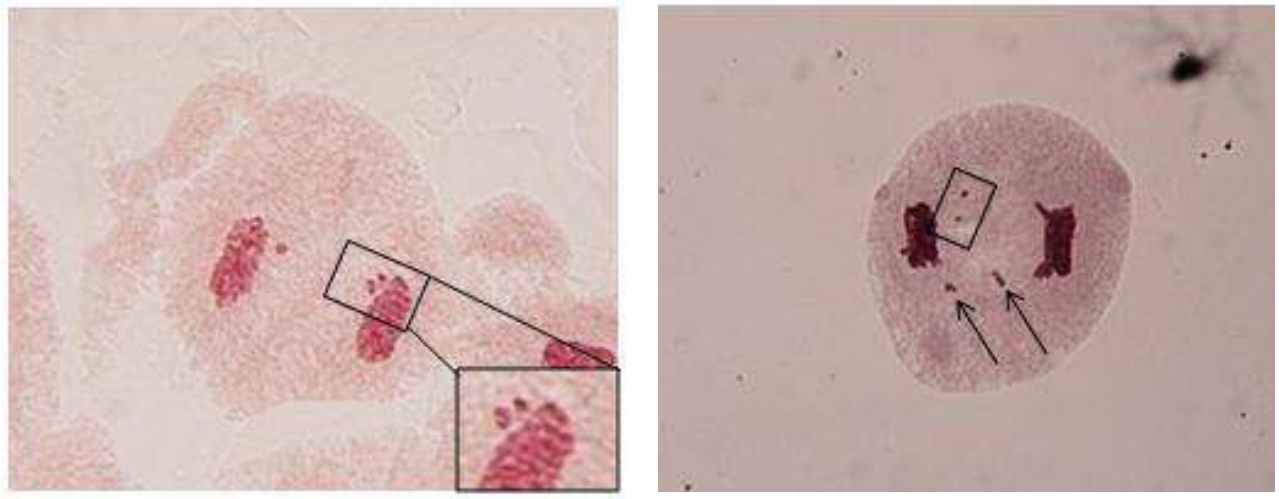
507/2	1	2 + 4	529/1	1	1 + 0
508/1	1	2 + 2		2	1 + 1 фрагмент
	1	1 + 0	-	-	-

Примітки:

1) * - мікроядра різних розмірів

2) ** - мікроядра розподілені по-різному відносно основних ядер.

Мікроядра могли бути різних розмірів (рис. 3.51 А) та паралельно з мікроядрами інколи спостерігали і неконденсований хроматин – хромосоми або їхні фрагменти (рис. 3.51 Б).

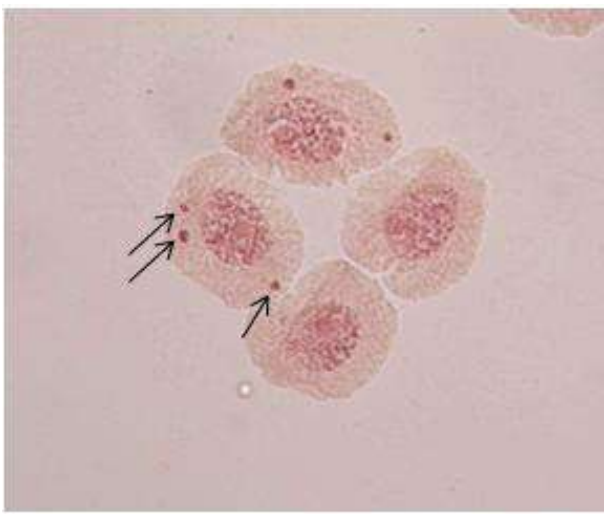


А Б

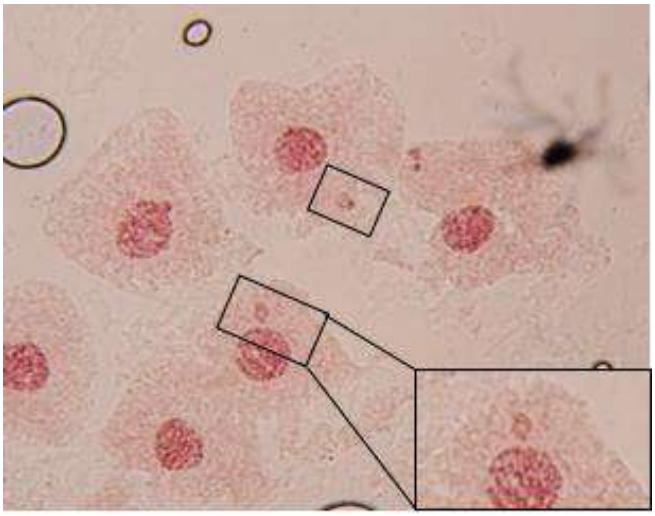
Рис. 3.51. Мікроядра та хромосомні фрагменти на стадії телофази II у 427/2 (А), 451/1 (Б).

Описані вище стадії є етапами спорогенезу, коли мікроспора проходить два поділи мейозу, в результаті чого утворюються пилкові зерна. Одна мікроспора дасть початок чотирьом пилковим зернам. Кожне з пилкових зерен буде мітотично ділитися та розвинеться до пилку. На стадії пилкових зерен в нормі мають бути одне вегетативне ядро та два генеративні. З останніх

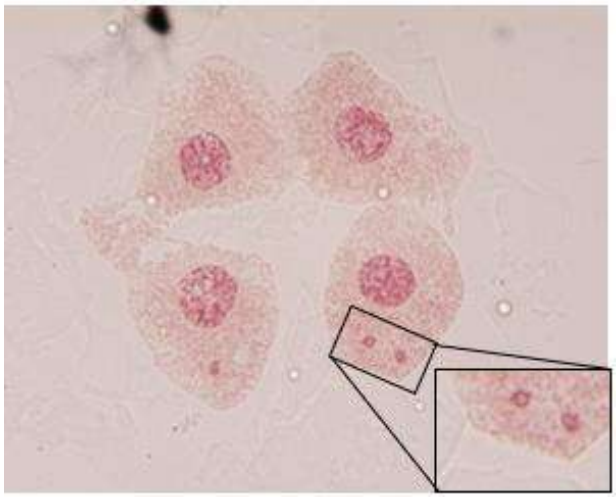
утворяться спермії, котрі будуть задіяні у заплідненні. Процеси, які відбуваються у пилкових зернах є етапами сперматогенезу, під час яких також були порушення їхнього перебігу. У 416/1 було одне пилкове зерно з трьома генеративними ядрами замість двох (рис. 3.52 А), що було і у пилку 451/1. У пилкових зернах також були кільцеві фрагменти у 466/1, 503/1 (рис. 3.52 Б) по одному на додаток до основного ядра. У гібридів 429/1, 471/1(рис. 3.52 В) в одному пилковому зерні було одне мікроядро та один кільцевий фрагмент одночасно. Спостерігали невелику кількість клітин під час гаметогенезу.



А



Б



В

Рис.3.52. Три генеративні ядра у пилковому зерні 416/1 (А), кільцева хромосома у 503/1 (Б) та мікроядра з кільцевими хромосомами у 471/1 (В).

Під час попередніх досліджень поділу у сортів пшениці м’якої, амфідиплоїдів [149], пшеничних гібридів з інтрогресіями [157] не спостерігали випадків відокремлення частини хроматину (мікроядра) з цитоплазмою. Можливо, більша кількість рослинного матеріалу дозволила побачити таку втрату хроматину. Під час другого поділу у попередніх дослідженнях спостерігали тетради, які в деяких випадках могли мати мікроядра, але вони були в складі всіх або кількох клітин тетради. Приклад для рослини 447/1 наведений на рисунку 3.53 А.

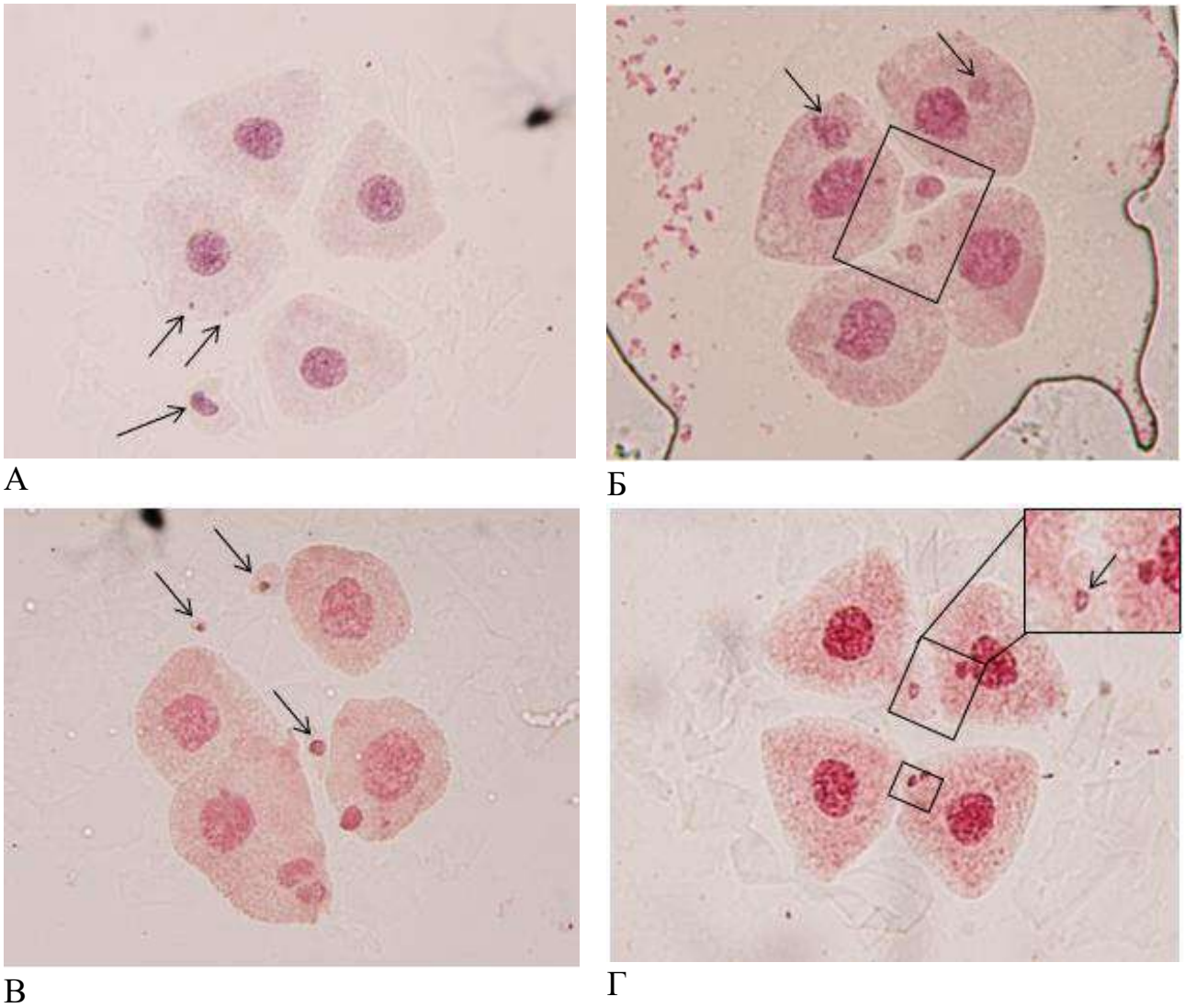


Рис.3.53. Відокремлення мікроядер з цитоплазмою у гібридів 447/1 (А), 446/1 (Б), 471/1 (В) та кільцевої хромосоми у 492/2 (Г).

Під час вивчення описаного в цьому підрозділі рослинного матеріалу такі випадки теж були і їх не залучали в розрахунки, наведені раніше. Більш нетиповим є саме втрата мікроядер з цитоплазмою. Така аномалія під час поділу не була рідкістю, її мали 41 гібрид, які є різними за походженням, а саме: 401/1, 402/1, 410/1, 414/1, 424/1, 431/2, 436/1, 438/2, 446/1, 447/1, 448/1, 451/1, 458/1, 466/1, 467/1, 471/1, 472/2, 473/1, 473/2, 475/1, 482/1, 486/2, 492/1, 492/2, 493/1, 494/1, 496/2, 497/2, 503/1, 503/2, 505/1, 506/2, 507/2, 508/2, 514/1, 516/1, 519/1, 524/1, 526/1, 537/1, 538/1.

Розмір хроматину в цитоплазмі міг бути різним – розмірів мікроядра, яке звикли бачити в тетрадах або розміру ядра клітини, яка утворює тетраду. Так само і розмір цитоплазми варіював. Клітини тетради, які лежали поруч, могли мати або ні мікроядра поруч з основним ядром. Мікроядра, які все ще знаходились під спільною цитоплазмою з ядром мікроспороциту теж були різних розмірів, наприклад як у 446/1 (див. рис. 3.53 Б). Варіювала кількість мікроядер, які відокремлювалися, та їхня кількість. У 427/1 – відокремилось два мікроядра. Великих розмірів мікроядра відокремлювались з цитоплазмою у 471/1, 472/2, та 473/2 (див. рис. 3.53 В). Відокремлювався з цитоплазмою не тільки конденсований хроматин (мікроядра), а і хромосоми (чи фрагменти хромосом) замкнуті у кільце. Таке спостерігали з 492/2 (див. рис. 3.53 Г), 494/1, 506/2, 507/2. Мікроядра також мали різний ступінь конденсації хроматину. Хроматин міг бути неорганізований у структури, а був фрагментованим. Наприклад у 526/1 цитоплазма з мікроядром має ще і три фрагменти хроматину. В клітинах тетради є і інші фрагменти та мікроядра, частина з них відокремилась.

У частині тетрад замість звичних мікроядер, які так були і названі через малі розміри відносно основного ядра клітини, спостерігали мікроядра великих розмірів, подібних до розмірів головного ядра (див. рис.3.53 Б). Такі збільшені мікроядра могли бути як одне в клітині і в тетраді без мікроядер (458/1) або паралельно з мікроядрами (табл.3.48).

Таблиця 3.48

Кількості клітин з мікроядрами та мікроядрами великих розмірів

Гібрид	Кількість клітин		
	з мікроядрами	з великими мікроядрами	без порушень
472/2	1 (1)*	1 (1)	2
473/1	3 (по 1)	1 (2)	0
474/1	0	1 (1)	3
481/1	0	1 (1)	0
484/3	0	1 (1)	0
488/2	1 (1)	1 (2)	2
	0	1 (1)	0
491/1	1 (1)	0	0
492/1	2 (1)	1 (1)	0
492/2	1 (1)	1 (1)	0
	1 (3)**, 1 (1)	1 (1)**	0
493/1	1 (2)**, 1 – окремо	3 (1)**	0
494/1	1 (1)**	1 (1)**	3
	0	1 (2)	3
	0	1 (1)	3
496/1	0	1 (1)	3
496/2	1 (1)	1 (1)	2
	1 (1)**	1 (1)**	2
497/2	1 (1), 2 (2)**	2 (2)**	1
502/1	1 (1)	1 (1)	2
503/1	1 (1), 1 (1)**	1 (1)**	2
	1 (1)	1 (1)	2
	1 (1)	1 (1)	2
503/2	1 (2)	2 (1)	1
	0	1 (1)	3
	1 (1)	1 (2)	2
	3 (1), 1 (1)**	1 (1), 1 (1)**	0
	0	2 (1)	0
505/2	1 (1)	1 (1)	2
508/1	2 (1) **	1 (1) **	2
508/2	1	2 (1)	1
509/1	0	1 (1)	3

Продовження табл. 3.48

513/1	0	1 (1)	3
	1 (1)	1 (1)	2
514/1	2 (1)	1 (1)	1
	0	3 (1)	1
516/1	0	1 (1)	3
	1 (1)	1 (1)	2
	1 (1) **, 1 (2), 1 (3)	1 (2) **	1
519/1	2 (1), 1 (2)	1 (1)	0
	3 (1)	1 (1)	0
	0	1 (1)	3
	1 (2) **	1 (2) **	2
	1 (1) **	2 (1) **	2
521/1	0	2 (1)	2 (1)
	0	1 (1)	3
	0	2 (1)	2
524/1	3 (1) **	1 (1) **	1
525/1	0	1 (1)	3
	0	1 (1)	3
525/2	1 (1)	1 (2)	2
	0	1 (1)	3
526/2	1 (3) **	1 (1), 1 – окремо	3
528/1	2 (1)	1 (1)	1
529/1	1 (1), 1 – окремо	2 (1)	1
534/1	2 (1) **	2 (1) **	2
536/1	0	1 (1)	3
	0	2 (1)	2

Примітки:

1) * – у дужках наведена кількість мікроядер або великих мікроядер у клітинах;

2) ** – у одній клітині були присутні одночасно 2 мікроядра різних розмірів.

Частина великих мікроядер були менш конденсовані, порівняно з мікроядрами, наприклад у 492/1, 492/2 (рис.3.54).

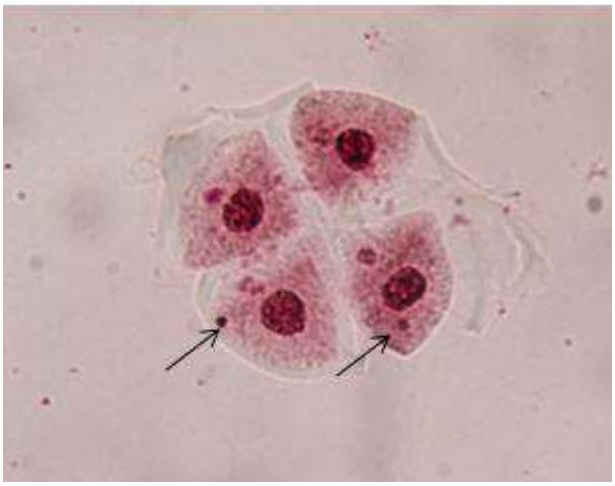


Рис.3.54. Мікроядра різного ступеню конденсації МКП гібриду 492/2 (більш конденсовані показані стрілками).

Описані в цьому підрозділі порушення є проявами втрати хроматину, ймовірно відбувається однобатьківська елеміниація, проте однозначно це стверджувати не можна. Як материнську рослину використовували гібрид F_2, який має мати більшу гомологію з пшеничним геномом, тому припускаємо, що може елімінуватися не тільки хроматин чужинного походження від гібриду-матері. В літературі описана і можливість однобатьківської елемінації геному для гібридів між жабою озерною та ставковою (*Pelophylax ridibundus* x *Pelophylax lessonae*). Один геном втрачається, а інший геном дублюється, щоб мейоз відбувався нормально з утворенням гаплоїдних гамет. У триплоїдних гібридів жаб втрачається геном, представлений однією копією, інші два геноми, ймовірно, лишаються, не подвоюються та мейоз завершується нормально. Тобто елімінуються послідовності, геноми, які не мають пари для кон'югації [168].

Причини, які призводять до втрати хроматину можуть бути різними, проявами яких є різні відхилення від нормального поділу. Хромосомні фрагменти та мости, унівалєнти, хромосоми, які відстають, можуть не потрапляти до ядер, які утворюються під час поділу, та дадуть початок мікроядрам. За літературними даними [169] елімінація хромосом відбувається під час мейозу. Висновок зроблений на основі цитологічних спостережень.

Батьківські геноми гібриду *Triticum timopheevii* × гексаплоїдний дикий овес просторово розділяються у ядрі гібриду. Хроматин, який буде втрачений, знаходиться на периферії інтерфазного ядра, або на периферії у метафазі I.

Фрагментація та нерозходження хромосом (у AI) або хроматид (у AII), утворення мостів може виникати, коли сила, яка рухає хромосоми до полюсів у анафазі, є сильнішою для одного полюса, порівняно з іншим. Хромосоми, переважно унівалентні, відстають через неможливість приєднання волокон веретена поділу до центромер таких хромосом, якщо це хромосомний фрагмент без центромери, то теж приєднання неможливе. Хромосоми / хроматиди, які відставали будуть розміщуватися на периферії клітини і не потраплять у новостворені ядра. Розташування хромосом на периферії пов'язують з порушенням роботи сестринських кінетохорів, що буде впливати на прикріплення компонентів веретена поділу. Хромосоми / хроматиди можуть лишатися по центру клітини через однакову силу полюсів, що теж призведе до їхньої втрати. У випадку сильного натягу до полюсів та поганої когезії в області центромери сестринські хроматиди будуть рухатися до полюсів без повного їх розділення, що призводитиме до утворення хромосомних містків, розриву плеч хромосом, утворення ацентричних фрагментів [170,171].

Хромосоми, які відстають та хромосомні мости можуть утворити мікроядра, що було показано у попередніх дослідженнях на рослинному матеріалі інтрогресивного походження [157]. Це відбувається, якщо навколо таких хромосом утворюється структура, подібна до ядерної оболонки. Якщо вона не формується, то хромосоми будуть втрачатися. [169].

Спостережувані випадки асинхронного поділу описані і для інших гібридів, наприклад між *Triticum timopheevii* та перловим просом [169,172]. Припускають, що таке відхилення від нормального поділу пов'язане з асинхронністю реплікації ДНК, що може призводити до пошкодження хромосом, які потрапили у нову цитоплазму. Для гібридних геномів описаний гібридно-опосередкований геномний шок, який активує мобільні генетичні елементи, що може спричиняти структурні зміни хромосом, призводити до

хромосомних аберацій [169]. Утворення мікроядер та мікроядер різних розмірів може бути і наслідком утворення множинного та мультиполярного верета поділу [171].

Між хроматином різного походження можлива різниця і в ступені конденсації хроматину. Проте у гібридів через потрапляння хроматину у нове середовище, нову цитоплазму, можлива реструктуризація хроматину в складі транслокацій, що може бути постачальником нових послідовностей, які контролюють ознаку [172]. Ще причинами елімінації є асинхронність синтезу нуклеопоринів, розщеплення хромосомних фрагментів нуклеазами, пригнічення функції центромер. Нуклеази є активними відносно малоконденсованого хроматину, порівняно з хромосомами. Фактори, які впливають на видалення хромосом або їхніх фрагментів пов'язані з ядерними молекулами, а не цитоплазматичними. Можлива і нестабільність цитоскелету під час сегрегації хромосом, що описано для гібридів *O. sativa* × *L. peruviana* [171]. Випадки перетікання хроматину з одного ядра ймовірно пов'язані з порушенням цитокінезу, що показано на гібридах між пшеницею м'якою та представниками роду Aegilops (*Ae. triuncialis* та *Ae. cylindrica*) [173].

Згадані явища можуть бути проявом геномного конфлікту у гібриду через асинхронність у тривалості клітинного циклу у батьків, різницю в часі реплікації, яка призводитиме до розривів ланцюгів та перебудову вихідних геномів. Можливі відмінності між батьками і у процесах синтезу білка або пострансляційних змінах у вже наявних білках. Елімінація хромосом та їхніх фрагментів може змінювати кількість хромосом. Клітини з аномальним поділом не мають просуватися далі під час поділу або ж порушення, які виникають мають бути виправлені. Можливо, що через події елімінації відбувається стабілізація новоствореного гібридного геному.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Одним з поширених захворювань гексаплоїдної пшениці є борошниста роса, збудник – *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*). Геноми сучасних сортів пшениці м'якої мають гени стійкості до *Bgt*, проте ці гени неефективні проти поширених рас патогену. Тому здійснюють передачу ділянок інтересу від близькоспоріднених видів [174]. Ці види об'єднують у три генофонди (gene pool) (первинний, вторинний та третинний) за еволюційними відстанями між ними, успішністю гібридизації. До первинного генофонду належать види, які мають спільні геноми / субгеноми з гексаплоїдною пшеницею – сучасні сорти гексаплоїдної пшениці (AABBDD), *Triticum spelta* (AABBDD), тетраплоїдна тверда пшениця *T. turgidum* (AABB), диплоїдний вид пшениці *T. urartu* (AA) та *Aegilops tauschii* (DD). Приклади видів вторинного генофонду: тетраплоїдний вид *T. timopheevii* (AAGG), диплоїдні *T. monococcum* (A^mA^m) та *Ae. speltoides* (SS). Види третинного генофонду включають культурні види, такі як жито (RR) та ячмінь (HH), а також диких родичів пшениці, які вважають джерелом мінливості, яку можна використовувати для покращення пшениці за агрономічноважливими ознаками, однією з яких є стійкість до грибних патогенів. Приклади дикорослих видів: *Thinopyrum elongantum* (EE), тетраплоїд *Ae. geniculata* (UUMM) та октоплоїд *Leymus arenarius* (XXXXNNNN). Геноми видів з первинного та вторинного генофондів мають певну гомологію з пшеничним геномом, з третинного – гомології не мають. Існують перешкоди у прямих схрещуванням між пшеницею м'якою та видами з трьох генофондів, тому потрібні альтернативні підходи – через створення амфідиплоїдів та їхніх ліній [167,175].

Припускаємо, що передача стійкості до борошнистої роси від диплоїдних видів, які її мають, відбувається шляхом передачі їхнього хроматину з геном (генами) до інтрогресивних ліній, в подальшому до сортів пшениці м'якої. Інтрогресивні лінії характеризуються як стійкі, ймовірно, через експресію гена (генів)-інтересу. Експресія має відбуватися за умови

потрапляння послідовностей на генетичне тло сортів пшениці м'якої під час інтрогресивної гібридизації. Пшеничні геноми та геноми дикорослих видів можуть мати різні умови, які забезпечують транскрипцію, що може впливати на прояв ознаки у гібридів. Від часу створення інтрогресивних ліній-похідних Авротіки спостерігали часткову втрату цільової ознаки, коли частина ліній будучи стійкою в попередньому поколінні розщеплювалася на стійких та уражених у наступному. Тому потрібно з'ясувати причини втрати цільової ознаки у рослинного матеріалу, створеного через інтрогресивну гібридизацію. Для з'ясування цього питання визначали, чи наявні ділянки, характерні генам стійкості, у складі контрастних за проявом ознаки генотипів та слідкували за поведінкою чужинного хроматину, коли він потрапляє на генетичне тло пшениці, через вивчення мейотичного поділу МКП.

Гени стійкості до патогенів мають консервативні ділянки, які кодують домени з кіназною активністю, нуклеотидозв'язувальні домени, повтори, багаті на лейцин, які є найбільш поширеними доменами, які входять до складу білків стійкості. Гени у своєму складі можуть поєднувати декілька з перерахованих ділянок, нуклеотидний склад може варіювати в межах кодувальних та некодувальних частин гена. Алелі одного і того ж *Pm* є мінливими за їхнім нуклеотидним складом, є більш варіабельні кодувальні ділянки, є менш. Нами було створено праймери до генів стійкості до борошнистої роси, які фланкували різні кодувальні ділянки генів. Для генів *Pm2, Pm3, Pm21* у біологічній базі даних GenBank було знайдено декілька сиквенсів, які могли бути або послідовностями різних алелів, або послідовностями, отриманими різними дослідниками або з різних рослинних зразків. В межах кожного з генів знайдені відмінності у порівнюваних сиквенсах. Послідовність *Pm2* має декілька ділянок, які кодують: Rx N-термінальний домен, домен з протеїнкіназною активністю, NB-ARC домен. Для семи послідовностей, які порівняли, найменш варіабельною є перша ділянка гена – має дві однонуклеотидні заміни (C→T, C→A). Rx N-термінальний домен має таку назву через подібність до N-кінця білка стійкості до картопляного вірусу X у

картоплі та *Nicotiana benthamiana*. Білок складається з спірального (coiled-coil, CC), нуклеотидозв'язувального доменів, лейцинових повторів. Через CC-домен Rx можлива міжмолекулярна взаємодія з білком 2, який активує Ran ГТФ-азу (RanGAP2) (кофактор). Амінокислотний склад CC впливає і на внутрішньомолекулярну взаємодію з NB-LRR. Делеція або інша мутація мотиву EDVID (глутамінова кислота-аспартат-валін-ізолейцин-аспартат) призводить до відсутності взаємодії з двома іншими доменами, але не впливає на взаємодію з кофактором. Є і протилежний вплив – зміни в амінокислотному складі, які впливають на міжмолекулярні взаємодії, але не впливають на міжмолекулярні [176]. RanGAP2 взаємодіє з білком стійкості через свій WPP домен та опосередковує розпізнавання білків авірулентності. Ran ГТФ-аза може впливати на подальшу передачу сигналу через забезпечення ядерно-цитоплазматичного транспорту. RanGAP2 утримує Rx1 у цитоплазмі. Перебування у ядрі білка стійкості блокує його автоактивацію [177,178]. Порівнювані раніше [52,75] амінокислотні послідовності CC-домену є висококонсервативними або абсолютно консервативними, тобто подібність між ними 100%. На противагу Rx N-термінальному домену, ділянки, які кодують LRR у складі гена *Pm3* є найбільш варіабельними серед порівнюваних. Ген має дві ділянки різної довжини, розмежовані некодувальними частинами гена. Мінливість цих регіонів описана [179] при порівнянні амінокислотних послідовностей PM3A, PM3B, PM3C, PM3D, PM3E та PM3F. Чотири мінливі області (α, β, γ та δ), в яких зосереджені амінокислотні заміни, розташовані у домені LRR. Ідентифіковані поліморфні області походять від спільної ділянки, яка не була пов'язана зі стійкістю у рослини. Мінливість свідчить про еволюційні події, які сприяли набуттю стійкості для адаптації, протистояння різним штамам патогенів та їхніх комбінацій. Резистентність пов'язана або з підвищеною сигнальною активністю NLR, або більшою ефективнісю відбувається розпізнавання білків авірулентності [107,179]. В нашому випадку порівняння амінокислотних послідовностей не робили, проте ідентифікована нуклеотидна варіабельність може впливати і на амінокислотний склад білків. З

праймерами, створеними до гена *Pm3* (комбінація Pm3-3) з низкою генотипів ліній-похідних (tica1007, tica1075, tica1084, tica1130, tica1187, tica1089, tica1094) ідентифікували дві ділянки, які кодують LRR. У електрофоретичному спектрі один з компонентів був основним, ще один – мінорним, за яким спостерігали мінливість – відсутність / наявність цього компонента з ДНК конкретного генотипу. Ці результати узгоджуються з біоінформатичним аналізом послідовностей гена – ген має дві LRR-кодувальні ділянки. Оскільки в цих ділянках зосереджена найбільша кількість нуклеотидних замін, це, можливо, було причиною відсутності гібридизації праймерів з ДНК-матрицею, що спричинило відсутність ампліфікації з деякими генотипами. За поліморфізмом з альтернативним проявом (є компонент / немає) Авротіку можна відрізнити від низки ліній, так і лінії між собою. У складі, як стійких (амфідиплоїди, інтрогресивні лінії), так і уражених генотипів (сорти пшениці м'якої) ідентифіковані різні ділянки, характерні для генів стійкості *Pm2*, *Pm3*, *Pm4*, *Pm21, Pm41*, за винятком послідовностей, притаманних *Pm24*. Ген кодує тандемну пшеничну кіназу WTK3 з кіназо-псевдокіназним доменом. Сиквенс, до якого були створені послідовності праймерів, отриманий з китайського місцевого зразка Hulutou [45]. Дослідження, які проводили з *Pm24* [приклади 117,180], були на рослинному матеріалі з Національних колекцій Китаю чи місцевих зразків з різних китайських провінцій. Інформації про наявність гена у європейських генотипів не було знайдено [приклади 117,180]. Можемо припустити, що послідовність гена виникла у генотипів, поширених на території Китаю, як відповідь на певні раси гриба, але ген не був перенесений у генотипи, поширені на європейській частині континенту. Кліматичні умови у згаданих місцевостях є різними, що і сприятиме поширенню різних рас гриба та добір ефективних генів саме проти ефекторів цих рас, що описує своєрідну гонку озброєнь між господарем та патогеном. Серед ідентифікованих генів мінливість між генотипами була у відсутності / присутності переважно одного компонента спектру.

Використання методики поліморфізму аналогів генів стійкості дало можливість отримати багатокомпонентні та поліморфні спектри, що дозволяє диференціювати контрастні за проявом ознаки генотипи. Варіабельність у спектрах отримана з комбінаціями, коли хоча би один з праймерів, які входили в комбінацію, був створений до ділянок, які кодують повтори багаті на лейцин, домени з протеїнкіназною активністю та NB-ARC. З цими ж комбінаціями проаналізовані популяції, які розщеплюються за дослідною ознакою та походять від різних амфідиплоїдів. Використали поєднання методик RGAP та групового аналізу популяцій (BSA). Для рослинного матеріалу, який має генетичний матеріал від Авродесу було знайдено різницю між групами ДНК від контрастних генотипів з праймерами до ділянок, які кодують LRR. З рослинами, які створені за участі ліній Авротіки та Аврозису (окремо) – з праймерами до кодувальних NB-ARC та домена з кіназною активністю. Кожен з перерахованих амфідиплоїдів має геном від одного з диплоїдів. За результатами повногеномного секвенування *Ae. sharonensis*, *Ae. longissima* та *Ae. speltoides* [181], егілопси мають велику кількість послідовностей, які мають структуру, характерну для генів стійкості до різних захворювань. Такі ділянки називають аналогами генів стійкості, коли їхня приналежність до резистентності показана за результатами анотації нуклеотидних послідовностей, тобто це потенційні гени стійкості поки не буде доведений їхній вплив на рівні рослини. Переважна більшість генів кодує білки з доменами лейцинових повторів та нуклеотидозв’язувальними. Велика кількість цих генів розташована у теломерних регіонах [182], які одночасно з тим є високодифернційованими між геномами порівнюваних видів [181]. У теломерних та субтеломерних ділянках рекомбінація відбувається з високою частотою, що може сприяти перебудовам геному. Якщо в одному організмі поєднується декілька геномів, які мають часткову гомологію між хромосомами, і немає блокування гомеологічної рекомбінації, то можливі перебудови цих геномів.

Для гібридів, отриманих з трьома інтрогресивними лініями-похідними Авротіки, знайдена різниця між стійкими та чутливими групами ДНК з комбінацією праймерів, створеною до гена *Pm2*. Ген перенесений у геном гексаплоїдної пшениці від *Ae. taushii*. Егілопс є донором субгеному D пшениці м'якої. У пшениці ген знаходиться в складі короткого плеча п'ятої хромосоми субгеному D (5DS) [35-37]. Між геномами T *Am. muticum* та D *Ae. taushii* є певна гомологія, що могло сприяти змінам у ділянці, фланкованій праймерами.

На передачу послідовностей генів стійкості впливають процеси поділу статевих клітин – материнських клітин пилку (МКП) та материнських клітин макроспори (МКП). Поділ у статевих клітинах чоловічої статевої сфери пшениці м'якої відбувається без порушень. Якщо геном гібриду поєднує хроматин різного походження, то це впливатиме на поведінку хромосом під час мейозу. Індуктором змін кон'югації між хромосомами є хроматин чужинного походження. Прояви змін спостерігали через утворення унівалентів, відкритих бівалентів та мультивалентів. Через наявність у геномі Аврори житньої транслокації на довгому плечі хромосоми 1 під час мейозу реєстрували 1-2 відкритих біваленти. У Авротіки та гібридів кількість і різноманітність зареєстрованих порушень більша. У Авротіки поєднуються два субгеноми Аврори та геном T від *Am. muticum*. Очікувалося, що кон'югація між хромосомами в межах кожного з геномів має відбуватися з утворенням закритих бівалентів, проте реєстрували і інші хромосомні конфігурації. Кон'югація між гомеологічними ділянками у пшениці блокується активністю локусу *Ph1*. За літературними даними [165], присутність чужинного генетичного матеріалу може порушувати синапсис та кон'югацію між гомологами. Може це відбуватися через структурні зміни в хромосомах або через взаємодію між факторами, які контролюють обміни ділянками між хромосомами. У рослин, які мають генетичний матеріал ліній є більша різноманітність порушень на стадіях, як першого, так і другого поділів. Відбувається відходження частини хроматину, яка не має партнера для кон'югації та його доля бути втраченим. В частині клітин відбувається

безладний поділ: хроматин фрагментований, що не дозволяє визначити, навіть, стадію поділу; хромосоми, які мали б лежати окремо, з'єднані в ланцюжок хроматином; утворення мікроядер, які за розмірами мало відрізняються від ядра клітини. Через такі події може відбуватися швидка стабілізація геному гібриду [173] – втрачається хроматин, клітини з різними порушеннями не будуть розвиватися далі. Однозначно можна сказати, що на стадії тетрад відбувається втрата хроматину, чи чужинного, чи пшеничного. Зареєстровані непоодинокі випадки відокремлення мікроядер з цитоплазмою.

Для того, щоб визначити коли відбувається втрата цільової ознаки потрібно продовжувати роботу. Що стійкі, що чутливі генотипи мають послідовності, які ідентифікували з праймерами до кодувальних ділянок генів стійкості. Можна припустити, що ці гени не транскрибуються або продукти цих генів неактивні. Знайдений негативний зв'язок між стійкістю та особливостями поділу МКП. Цитологічно нестабільні гібриди є стійкими до борошнистої роси, ймовірно, через наявність хроматину, який згодом втрачається. На стабільність створених гібридів впливає напрямок схрещування, за якого їх отримано.

За поєднання методи RGAP та BSA знайдена різниця між стійкими та ураженими генотипами у рухливості одного і того ж амплікону. Для того, щоб визначити якими змінами у нуклеотидній послідовності забезпечена відмінність між генотипами, потрібно буде секвенувати ампліконі. Варто буде визначити, який домен білка стійкості або його частину кодує секвенована послідовність через порівняння з уже секвенованими та анотованими послідовностями, розміщеними у біологічних базах даних.

Щоб переконатися, чи дійсно ідентифікована відмінність забезпечує різницю у прояві ознаки потрібно націлюватися на цю послідовність. Від того, яка буде знайдена різниця залежитиме те, які методи потрібно використовувати. Одним з сучасних підходів, які використовують для ідентифікації однонуклеотидних поліморфізмів є конкурентна алель-специфічна ПЛР (Kompetitive allele specific PCR, KASP). За допомогою KASP можна націлюватися на однонуклеотидний поліморфізм, який відрізняє чутливі

та стійкі генотипи. Має бути інформація, що певний нуклеотид характеризує, наприклад стійкий генотип. Є приклади використання методики для генів стійкості до *Fusarium graminearum* [183]. Якщо відмінність у сиквенсах між контрастними генотипами є у поліморфізмі типу «інсерція/делеція», то можна використати метод багаторазової зампліфікації з лігазо-залежними зондами (**M**ultiplex **L**igation-dependent **P**robe **A**mplification, MLPA). MLPA також дозволяє ідентифікувати SNP, дуплікації, які разом з інсерціями/делеціями є поліморфізмом «варіювання за кількістю копій» (**C**opy **N**umber **V**ariations, CNVs). CNV захоплюють ділянку геному понад 50п.о. Генні CNV виникають через помилки у гомологічній рекомбінації, неалельну гомологічну рекомбінацію (**n**on-**a**llelic **h**omologous **r**ecombination, NAHR), негомологічне з'єднання кінців (**n**on-**h**omologous **e**nd **j**oining (NHEJ), зупинку розгалуження та перемикання матриці (**fo**rk **s**talling and **te**mplate **s**witching, FoSTeS). Перші три причини пов'язані з наявністю високої подібності між послідовностями, які не є алелями або гомологічними послідовностями, такі ділянки можуть бути у складі генотипів гібридного походження. NAHR та NHEJ заснований на основі рекомбінації, ретротранспозиції, яка включає активацію та інсерцію ретротранспозонів. FoSTeS – на основі реплікації [184-186]. Метод було розроблено для аналізу людських послідовностей [187]. Було запропоноване [188] його використання для вивчення природних зразків арабідопсисів за варіюванням за кількістю копій, проте без прив'язування нуклеотидних варіацій з варіюванням на рівні фенотипу. CNV призводять до відмінностей у копіях та функціонуванні генів через вплив на експресію генів. Був виявлений зв'язок між CNV та впливом на стійкість до патогенів, деякі приклади: ген *rp1* та стійкість до в'янення кукурудзи Госса, ген *Rhg1* та стійкість сої до цистоподібної нематоди та інших [189,190].

Для KASP та MLPA передумовою для їхнього використання є наявність сиквенсів та наявність різниці між ними, яка характеризує фенотип рослини. З використанням котрогось з методів для скринування всієї множини рослинного матеріалу (вивчення ДНК кожної рослини окремо) потрібно довести, що є

залежність «відмінність у сиквенсі – резистентний фенотип». Такий підхід дозволить підтвердити чи спростувати, що саме зміна нуклеотидної послідовності спричиняє зміну фенотипу.

Важливо перевірити, чи відбувається експресія цільової ділянки і визначити рівні експресії, порівнюючи їх між чутливими та стійкими генотипами [191,192]. Частина інтрогресивних ліній-похідних Авротіки втрачає стійкість до збудника борошнистої роси, тому варто було б порівняти транскриптоми рослин, які втратили опірність патогенові, щоб спробувати визначити потенційних учасників втрати стійкості. Для ліній пшениці, інфікованих одночасно збудниками борошнистої роси та листової іржі, через використання секвенування РНК (RNA-Seq) та порівняння транскриптомів стійких та чутливих ліній ідентифіковані гени, рівень експресії яких зменшується у чутливих генотипів. Ці продукти генів залучені у ядерному транспорті, альтернативному сплайсингу, реакціях на пошкодження ДНК, убіквітин-опосередкованому протеолізі, сигнальних процесах за участі фосфоінозитолу та фотосинтезу [22].

Стійкість до патогенів є комплексною ознакою і може бути обумовлена впливом різних молекул та біохімічних шляхів, як було зазначено вище. Можлива перехресна регуляція між продуктами генів, залученні численних генів, які впливають на прогресування хвороби. З використання біоінформатичних підходів можна визначити, які молекули можуть бути задіяні у регулюванні експресії ідентифікованої ділянки геному *in silico* та спробувати побудувати генну мережу, в яку залучена ділянка інтересу, яка пов’язана з розвитком стійкості [193]. Такий підхід можна використати для нуклеотидної послідовності та для білкового продукту цієї ділянки. Продукт гену визначається через порівняння з уже анотованими послідовностями. Аналізувати білкові продукти важливо, оскільки для деяких продуктів *Pm3* та *Pm8* (гени-ортологи) описана взаємодія, яка призводить до відсутності стійкості на рівні організму за присутності у геномі генів стійкості [51]. У випадку *Pm4b* стійкість, яку він забезпечує, розвивається тільки за присутності обох ізоформ,

які утворюються в результаті альтернативного сплайсингу [53]. Побудова генних мереж є непростим завданням, оскільки регуляція розвитку ознаки має багатогранний характер. Деякі транскрипційні фактори утворюють білкові комплекси для регулювання експресії генів, а не діють самостійно. Це може призводити до випадків, коли член комплексу регулює активність гену, не маючи сайту для зв'язування з регуляторною ділянкою гена. В склад мереж можна включати не лише білки, а і РНК, як одні з регуляторних молекул. Генні мережі будують, наприклад, для вивчення впливу поживних речовин на рослину [194,195].

Чи будуть передаватися послідовності стійкості у наступні покоління залежить від того, чи буде ділянка в складі клітин-учасників запилення. Цими клітинами є продукти мейотичного поділу материнських клітин пилку та макроспори. Поведінка хромосом у МКП вивчали під час дисертаційного дослідження, але не в МКМ, що варто буде зробити теж. Від матері нащадкам буде передаватися весь вміст цитоплазми, від батька – тільки хроматин, який потрапить у спермії. Щоб визначити, чи є знайдена ділянка в складі статевих клітин, слід буде провести гібридизацію *in situ*. З отриманими сиквенсами ампліконів створити зонд (-и). Колоски у складі колоса мають різний розвиток, що довзолить для однієї рослини проводити гібридизацію на хроматині клітин, які перебувають на різних стадіях спорогенезу та гаметогенезу. Через використання зондів з різними флуоресцентними мітками можна аналізувати генотипи одночасно за ділянками, ідентифікованими з ДНК чутливих генотипів та стійких. Так за використання багатоколірної флуоресцентної гібридизації *in situ* (**m**ulti**c**olor **f**luorescence ***i**n* ***s**itu* **h**ybridization, mc-FISH) вивчали лінію пшениці з житньою транслокацією, з наявністю якої пов'язували стійкість до борошнистої роси у лінії. mc-FISH проводили на метафазних хромосомах корінців, ідентифіковані сигнали були у теломерних регіонах, що свідчило про наявність транслокації 1BL·1RS. Як зонди використовували повторювані послідовності, які дозволяють ідентифікувати ділянки, притаманні для різних субгеномів пшениці та геному жита [196-198]. Отже, перспективи для

продовження даного дослідження, з уже напрацьованими результатами, – зробити його комплексним, враховуючи і нуклеотидні послідовності генів стійкості, так і визначати, яким є їхній прояв та які можуть бути взаємодії за їхньої участі. Варто і визначати, чи передається ознака-інтересу через статеві клітини пшениці.

ВИСНОВКИ

1. Втрата стійкого фенотипу інтрогресивними нащадками від схрещування стійкого амфідиплоїда Авротіка та пшениці м'якої може відбуватися як за рахунок елімінації чужинного генетичного матеріалу під час перебігу мейозу у гібриді, так і за рахунок зміни у структурі чужинного гена стійкості у складі геному інтрогресивної лінії та її гібридних нащадків.

2. Інтрогресивні лінії *Triticum aestivum/Amblyopyrum muticum*, відібрані за ознакою стійкість до борошнистої роси, не зберігають цю ознаку в поколіннях константно і вимагають щогенераційного оцінювання і добору за ознакою інтересу.

3. Процес втрати стійкості інтрогресивними рослинами пшениці є перманентним і триває в поколіннях гібридів від схрещування стійких фенотипів інтрогресивних ліній з сортами пшениці м'якої.

4. Метод RGAP є ефективним для отримання інформації про наявний поліморфізм в досліджених геномах щодо стабільності в них генів *Pm* або змінах на рівні послідовності нуклеотидів в інших ділянках геному, що відбулися в геномах рослин гібридних популяцій.

5. Дослідження рослинного матеріалу з використанням метода RGAP надає велику інформацію про стабільність/мінливість ділянок у геномі, які долучаються до формування стійкого фенотипу. Метод може бути використаним для відстеження в популяціях, що розщеплюються, зв'язку між певними ампліконами спектрів і ознакою стійкість до борошнистої роси.

6. Геноми стійких і уражених рослин інтрогресивного походження відрізняються за ампліконами, отриманими з праймерами до всіх консервативних ділянок генів *Pm*. Встановлені відмінності між різними послідовностями *Pm*-генів, за порівнянням сиквенсів, депонованих у GenBank, є інделами, транзиціями та трансверсіями.

7. Найбільшу варіабельність у нуклеотидних послідовностях генів *Pm* виявлено з застосуванням праймерів до ділянок, що кодують LRR-домени генів

стійкості. Їх можна використовувати в комбінаціях з праймерами до інших генів *R* за методом RGAP, що збільшує кількість ефективних ПЛР-маркерів генів стійкості.

8. Наявність в умовній популяції стійких фенотипів рослин, геноми яких виявили поліморфізм за ефективними молекулярними маркерами стійкості і одночасно відмінність на молекулярному рівні від стійкого амфідиплоїда Авротіка, вказує на диференціацію стійких генотипів на рівні нуклеотидних послідовностей, що не руйнує стійкість ліній та гібридів до борошнистої роси. Отже, стійкість інтрогресивних рослин не забезпечується однозначно перенесенням відповідної нуклеотидної послідовності від Авротіки до геному пшениці м’якої.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Reilly A, Okoń S, Cieplak M, et al. Breadth of resistance to powdery mildew in commercial Oat cultivars available in Ireland. Crop Prot 2024;176(106517):106517. DOI: 10.1016/j.cropro.2023.106517

2. Kang Y, Zhou M, Merry A, Barry K. Mechanisms of powdery mildew resistance of wheat – a review of molecular breeding. Plant Pathology. 2020;69(4):601–17. DOI: 10.1111/ppa.13166

3. Bourras S, Kunz L, Xue M, Praz CR, Müller MC, Kälin C, et al. The AvrPm3-Pm3 effector-NLR interactions control both race-specific resistance and host-specificity of cereal mildews on wheat. Nature Communications. 2019;10(1):2292. DOI: 10.1038/s41467-019-10274-1

4. Pečenková T, Sabol P, Kulich I, Ortmannová J, Žárský V. Constitutive Negative Regulation of R Proteins in Arabidopsis also via Autophagy Related Pathway? Frontiers in Plant Science. 2016;7. DOI: 10.3389/fpls.2016.00260

5. Hewitt T, Müller MC, Molnár I, et al. A highly differentiated region of wheat chromosome 7AL encodes a Pm1a immune receptor that recognizes its corresponding AvrPm1a effector from *Blumeria graminis*. New Phytol 2021;229(5):2812–2826. DOI: 10.1111/nph.17075

6. Tirnaz S, Bayer PE, Inturrisi F, et al. Resistance gene analogs in the Brassicaceae: Identification, characterization, distribution, and evolution. Plant Physiol 2020;184(2):909–922. DOI: 10.1104/pp.20.00835

7. Garcia-Ruiz H, Szurek B, Van den Ackerveken G. Stop helping pathogens: engineering plant susceptibility genes for durable resistance. Curr Opin Biotechnol 2021;70:187–195. DOI: 10.1016/j.copbio.2021.05.005

8. Kishii M. An update of recent use of Aegilops species in wheat breeding. Front Plant Sci 2019;10:585. DOI: 10.3389/fpls.2019.00585

9. King J, Grewal S, Yang C-Y, et al. Introgression of *Aegilops speltoides* segments in *Triticum aestivum* and the effect of the gametocidal genes. Ann Bot 2018;121(2):229–240. DOI: 10.1093/aob/mcx149

10. Rakszegi M, Molnár I, Darkó É, et al. Editorial: Aegilops: Promising genesources to improve agronomical and quality traits of wheat. Front Plant Sci 2020;11:1060. DOI: 10.3389/fpls.2020.01060

11. Yang F, Fernández-Jiménez N, Tučková M, et al. Defects in meiotic chromosome segregation lead to unreduced male gametes in Arabidopsis SMC5/6 complex mutants. Plant Cell 2021;33(9):3104–3119. DOI: 10.1093/plcell/koab178

12. Moreno PE, Caetano CM, Olaya CA, et al. Chromosome Elimination in Intergeneric Hybrid of *Oryza sativa* × *Luziola peruviana*. Agric Sci 2014;05(13):1344–1350. DOI: 10.4236/as.2014.513144

13. Dodds PN. From gene-for-gene to resistosomes: Flor's enduring legacy. Mol Plant Microbe Interact 2023;36(8):461–467. DOI: 10.1094/MPMI-06-23-0081-HH

14. Flor HH. Current status of the gene-for-gene concept. Annu Rev Phytopathol 1971;9(1):275–296. DOI: 10.1146/annurev.py.09.090171.001423

15. Bourras S, McNally KE, Müller MC, et al. Avirulence genes in cereal powdery mildews: The gene-for-gene hypothesis 2.0. Front Plant Sci 2016;7:241. DOI: 10.3389/fpls.2016.00241

16. Brunner S, Hurni S, Streckeisen P, et al. Intragenic allele pyramiding combines different specificities of wheat Pm3 resistance alleles: *Pm3* allele pyramiding. Plant J 2010;64(3):433–445. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04342.x

17. van der Hoorn RAL, Kamoun S. From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. Plant Cell 2008;20(8):2009–2017. DOI: 10.1105/tpc.108.060194

18. Cesari S, Bernoux M, Moncuquet P, et al. A novel conserved mechanism for plant NLR protein pairs: the "integrated decoy" hypothesis. Front Plant Sci 2014;5:606. DOI: 10.3389/fpls.2014.00606

19. Thordal-Christensen H. A holistic view on plant effector-triggered immunity presented as an iceberg model. Cell Mol Life Sci 2020;77(20):3963–3976. DOI: 10.1007/s00018-020-03515-w

20. Dangl J, Jones J. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature. 2001;411(6839):826–33. DOI: 10.1038/35081161

21. Nguyen Q-M, Iswanto ABB, Son GH, et al. Recent advances in effector-triggered immunity in plants: New pieces in the puzzle create a different paradigm. Int J Mol Sci 2021;22(9):4709. DOI: 10.3390/ijms22094709

22. Poretti M, Sotiropoulos AG, Graf J, et al. Comparative transcriptome analysis of wheat lines in the field reveals multiple essential biochemical pathways suppressed by obligate pathogens. Front Plant Sci 2021;12:720462. DOI: 10.3389/fpls.2021.720462

23. Huang C-Y, Jin H. Coordinated epigenetic regulation in plants: A potent managerial tool to conquer biotic stress. Front Plant Sci 2021;12:795274. DOI: 10.3389/fpls.2021.795274.

24. Simeone R, Piarulli L, Nigro D, Signorile M, Blanco E, Mangini G, et al. Mapping Powdery Mildew (*Blumeria graminis f. sp. tritici*) Resistance in Wild and Cultivated Tetraploid Wheats. International Journal of Molecular Sciences. 2020;21(21):7910. DOI: 10.3390/ijms21217910

25. Pilet-Nayel M, Moury B, Caffier V, Montarry J, Kerlan M, Fournet S, et al. Quantitative Resistance to Plant Pathogens in Pyramiding Strategies for Durable Crop Protection. Frontiers in Plant Science. 2017;8. DOI: 10.3389/fpls.2017.01838

26. Li H, Dong Z, Ma C, Xia Q, Tian X, Sehgal S, et al. A spon-taneous wheat-*Aegilops longissima* translocation carrying Pm66 confers resistance to powdery mildew. Theoretical and Applied Genetics. 2020 Jan 13;133(4):1149–59. DOI: 10.1007/s00122-020-03538-8

27. Ning Y, Wang G-L. Breeding plant broad-spectrum resistance without yield penalties. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2018;115(12):2859–61. DOI: 10.1073/pnas.1801235115

28. Zhou X, Liao H, Chern M, Yin J, Chen Y, Wang J, et al. Loss of function of a rice TPR-domain RNA-binding protein confers broad-spectrum disease resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2018;115(12):3174–79. DOI: 10.1073/pnas.1705927115

29. Davidson VL. Protein-Derived Cofactors. In: Comprehensive Natural Products II. Elsevier; 2010. p. 675–710

30. Li H, Dong Z, Ma C, et al. Discovery of powdery mildew resistance gene candidates from *Aegilops biuncialis* chromosome 2Mb based on transcriptome sequencing. PLoS One 2019;14(11):e0220089. DOI: 10.1371/journal.pone.0220089

31. Li Y, Wei Z-Z, Sela H, et al. Dissection of a rapidly evolving wheat resistance gene cluster by long-read genome sequencing accelerated the cloning of Pm69. Plant Commun 2024;5(1):100646. DOI: 10.1016/j.xplc.2023.100646

32. Dong Z, Tian X, Ma C, Xia Q, Wang B, Chen Q, et al. Physical mapping of Pm57, a powdery mildew resistance gene derived from *Aegilops searsii*. Int J Mol Sci. 2020;21(1):322. DOI: 10.3390/ijms21010322

33. Zhang J, Yang H, Han G, et al. Fine mapping of Pm71, a novel powdery mildew resistance gene from emmer wheat. Crop J 2025. DOI: 10.1016/j.cj.2025.01.003

34. Плигун ВВ, Антонюк МЗ, Єфіменко ТС, Терновська ТК. Гени стійкості до *Blumeria graminis* та їхні продукти у злаків. Наукові записки НаУКМА. Біологія і екологія 2022;5:14–24. DOI: 10.18523/2617-4529.2022.5.14-24

35. Qie Y, Sheng Y, Xu H, Jin Y, Ma F, Li L, et al. Identification of a new powdery mildew resistance gene pmDHT at or closely linked to the *Pm5* locus in the Chinese wheat landrace Dahongtou. Plant Dis. 2019;103(10):2645–51. DOI: 10.1094/PDIS-02-19-0401-RE

36. Jia M, Xu H, Liu C, Mao R, Li H, Liu J, et al. Characterization of the powdery mildew resistance gene in the elite wheat cultivar Jimai 23 and its application in marker-assisted selection. Front Genet. 2020;11:241. DOI: 10.3389/fgene.2020.00241

37. Manser B, Koller T, Praz CR, Roulin AC, Zbinden H, Arora S, et al.Identification of specificity-defining amino acids of the wheat immune receptor Pm2 and powdery mildew effector AvrPm2. Plant J. 2021;106(4):993–1007. DOI: 10.1111/tpj.15214

38. Liu N, Bai G, Lin M, Xu X, Zheng W. Genome-wide association analysis of powdery mildew resistance in U.s. winter wheat. Sci Rep. 2017;7(1):11743. DOI: 10.1038/s41598-017-11230-z

39. Zhang Q, Li Y, Li Y, Fahima T, Shen Q, Xie C. Introgression of the powdery mildew resistance genes *Pm60* and *Pm60b* from *Triticum urartu* to common wheat using durum as a "bridge." Pathogens. 2021;11(1):25. DOI: 10.3390/pathogens11010025

40. Zhang X, Wang W, Liu C, Zhu S, Gao H, Xu H, et al. Diagnostic Kompetitive Allele-Specific PCR markers of wheat broad-spectrum powdery mildew resistance genes *Pm21*, *PmV*, and *Pm12* developed for high-throughput marker-assisted selection. Plant Dis. 2021;105(10):2844–50. DOI: 10.1094/PDIS-02-21-0308-RE

41. Lu N, Lu M, Liu P, Xu H, Qiu X, Hu S, et al. Fine mapping a broad-spectrum powdery mildew resistance gene in Chinese Landrace Datoumai, *PmDTM*, and its relationship with *Pm24*. Plant Disease. 2020;104(6):1709–14. DOI: 10.1094/PDIS-11-19-2431-RE

42. Wang Y, Long D, Wang Y, Wang C, Liu X, Zhang H, et al. Characterization and Evaluation of Resistance to Powdery Mildew of Wheat–*Aegilops geniculata* Roth 7Mg (7A) Alien Disomic Substitution Line W16998. Int J Mol Sci. 2020;21(5):1861. DOI: 10.3390/ijms21051861

43. Cao AZ, Wang XE, Chen YP, Zou XW, Chen PD. A sequence-specific PCR marker linked with Pm21 distinguishes chromosomes 6AS, 6BS, 6DS of Triticum aestivum and 6VS of *Haynaldia villosa.* Plant Breed. 2006;125(3):201–5. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2006.01222.x

44. Cao A, Xing L, Wang X, Yang X, Wang W, Sun Y, Qian C, Ni J, Chen Y, Liu D, Wang X, Chen P. Serine/threonine kinase gene Stpk-V, a key member of powdery mildew resistance gene Pm21, confers powdery mildew resistance in wheat. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2011;108(19):7727–32. DOI: 10.1073/pnas.101698110

45. Lu P, Guo L, Wang Z, Li B, Li J, Li Y, et al. A rare gain of function mutation in a wheat tandem kinase confers resistance to powdery mildew. Nature Communications. 2020;11(1). DOI: 10.1038/s41467-020-14294-0

46. Tang S, Hu Y, Zhong S, Luo P. The potential role of powdery mildew-resistance gene *Pm40* in Chinese wheat-breeding programs in the post-pm21 era. Engineering. 2018;4(4):500–6. DOI: 10.1016/j.eng.2018.06.004

47. Ren Y, Hou W, Lan C, Basnet BR, Singh RP, Zhu W, Cheng X, Cui D, Chen F. QTL Analysis and Nested Association Mapping for Adult Plant Resistance to Powdery Mildew in Two Bread Wheat Populations. Frontiers in Plant Science. 2017;8. DOI: 10.3389/fpls.2017.01212

48. Hua W, Liu Z, Zhu J, Xie C, Yang T, Zhou Y, et al. Identification and genetic mapping of *Pm42*, a new recessive wheat powdery mildew resistance gene derived from wild emmer (*Triticum turgidum var. dicoccoides*). Züchter Genet Breed Res. 2009;119(2):223–30. DOI: 10.1007/s00122-009-1031-4

49. Tan C, Li G, Cowger C, Carver BF, Xu X. Characterization of *Pm63*, a powdery mildew resistance gene in Iranian landrace PI 628024. Theoretical and Applied Genetics. 2018;132(4):1137–44. DOI: 10.1007/s00122-018-3265-5

50. Li G, Cowger C, Wang X, Carver BF, Xu X. Characterization of *Pm65*, a new powdery mildew resistance gene on chromosome 2AL of a facultative wheat cultivar. Theoretical and Applied Genetics. 2019;132(9):2625–32. DOI: 10.1007/s00122-019-03377-2

51. Hurni S, Brunner S, Stirnweis D, Herren G, Peditto D, McIntosh RA, et al. The powdery mildew resistance gene Pm8 derived from rye is suppressed by its wheat ortholog *Pm3*. Plant J. 2014;79(6):904–13. DOI: 10.1111/tpj.12593

52. Srichumpa P, Brunner S, Keller B, Yahiaoui N. Allelic series of four powdery mildew resistance genes at the *Pm3* locus in hexaploid bread wheat. Plant Physiol. 2005;139(2):885–95. DOI: 10.1104/pp.105.062406

53. Sánchez-Martín J, Widrig V, Herren G, Wicker T, Zbinden H, Gronnier J, et al. Wheat *Pm4* resistance to powdery mildew is controlled by alternative splice variants encoding chimeric proteins. Nat Plants. 2021;7(3):327–41. DOI: 10.1038/s41477-021-00869-2

54. Xie J, Guo G, Wang Y, Hu T, Wang L, Li J, et al. A rare single nucleotide variant in *Pm5e* confers powdery mildew resistance in common wheat. New Phytologist. 2020;228(3):1011–26. DOI: 10.1111/nph.16762

55. Li M, Dong L, Li B, Wang Z, Xie J, Qiu D, et al. A CNL protein in wild emmer wheat confers powdery mildew resistance. New Phytologist. 2020;228(3):1027–3. DOI: 10.1111/nph.16761

56. Sun H, Hu J, Song W, Qiu D, Cui L, Wu P, et al. *Pm61*: a recessive gene for resistance to powdery mildew in wheat landrace Xuxusanyuehuang identified by comparative genomics analysis. Theoretical and Applied Genetics. 2018;131(10):2085–97. DOI: 10.1007/s00122-018-3135-1

57. Zhang R, Fan Y, Kong L, Wang Z, Wu J, Xing L, et al. *Pm62*, an adult-plant powdery mildew resistance gene introgressed from *Dasypyrum villosum* chromosome arm 2VL into wheat. Züchter Genet Breed Res. 2018;131(12):2613–20. DOI: 10.1007/s00122-018-3176-5

58. Wan W, Xiao J, Li M, Tang X, Wen M, Cheruiyot AK, et al. Fine mapping of wheat powdery mildew resistance gene *Pm6* using 2B/2G homoeologous recombinants induced by the ph1b mutant. Züchter Genet Breed Res [Internet]. 2020;133(4): 1265–75. DOI: 10.1007/s00122-020-03546-8

59. Chen T, Xiao J, Xu J, Wan W, Qin B, Cao A, Chen W, Xing L, Du C, Gao X, Zhang S, Zhang R, Shen W, Wang H, Wang X. Two members of TaRLK family confer powdery mildew resistance in common wheat. BMC Plant Biology. 2016;16(1). DOI: 10.1186/s12870-016-0713-8

60. Lutz J, Hsam S, Limpert E, Zeller F. Chromosomal location of powdery mildew resistance genes in *Triticum aestivum* L. (common wheat). 2. Genes Pm2 and Pm19 from *Aegilops squa*rrosa L. Heredity. 1995;74(2):152–6. DOI: 10.1038/hdy.1995.22

61. Hao M, Liu M, Luo J, Fan C, Yi Y, Zhang L, Yuan Z, Ning S, Zheng Y, Liu D. Introgression of Powdery Mildew Resistance Gene *Pm56* on Rye Chromosome Arm 6RS Into Wheat. Frontiers in Plant Science. 2018;9. DOI: 10.3389/fpls.2018.01040

62. Zeller F, Kong L, Hartl L, Mohler V, Hsam S. Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.) 7. Gene Pm29 in line Pova. Euphytica. 2002;123(2):187–94. DOI:10.1023/A:1014944619304

63. Liu Z, Sun Q, Ni Z, Nevo E, Yang T. Molecular characterization of a novel powdery mildew resistance gene *Pm30* in wheat originating from wild emmer Euphytica. 2002;123(1):21–9. DOI: 10.1023/A:1014471113511

64. He R, Chang Z, Yang Z, Yuan Z, Zhan H, Zhang X, Liu J. Inheritance and mapping of powdery mildew resistance gene *Pm43* introgressed from *Thinopyrum intermedium* into wheat. Theoretical and Applied Genetics. 2009;118(6):1173–80. DOI: 10.1007/s00122-009-0971-z

65. Petersen S, Lyerly JH, Worthington ML, Parks WR, Cowger C, Marshall DS, Brown-Guedira G, Murphy JP. Mapping of powdery mildew resistance gene *Pm53* introgressed from *Aegilops speltoides* into soft red winter wheat. Theoretical and Applied Genetics. 2014;128(2):303–12. DOI: 10.1007/s00122-014-2430-8

66. Hao Y, Parks R, Cowger C, Chen Z, Wang Y, Bland D, et al. Molecular characterization of a new powdery mildew resistance gene *Pm54* in soft red winter wheat. Theoretical and Applied Genetics. 2014;128(3):465–76. DOI: 10.1007/s00122-014-2445-1

67. Liu W, Koo D-H, Xia Q, Li C, Bai F, Song Y, Friebe B, Gill BS. Homoeologous recombination-based transfer and molecular cytogenetic mapping of powdery mildew-resistant gene *Pm57* from *Aegilops searsii* into wheat. Theoretical and Applied Genetics. 2017;130(4):841–8. DOI: 10.1007/s00122-017-2855-y

68. Zhang D, Zhu K, Dong L, Liang Y, Li G, Fang T, et al. Wheat powdery mildew resistance gene Pm64 derived from wild emmer (*Triticum turgidum var. dicoccoides*) is tightly linked in repulsion with stripe rust resistance gene *Yr5*. The Crop Journal. 2019;7(6):761–70. DOI: 10.1016/j.cj.2019.03.003

69. Jin Y, Xu H, Ma P, et al. Characterization of a new *Pm2* allele associated with broad-spectrum powdery mildew resistance in wheat line Subtil. Sci Rep 2018;8(1):475. DOI: 10.1038/s41598-017-18827-4

70. Neu C, Stein N, Keller B. Genetic mapping of the *Lr20-Pm1* resistance locus reveals suppressed recombination on chromosome arm 7AL in hexaploid wheat. Genome 2002;45(4):737–744. DOI: 10.1139/g02-040

71. Szakács É, Szőke-Pázsi K, Kalapos B, et al. 1RS arm of *Secale cereanum* "Kriszta" confers resistance to stripe rust, improved yield components and high arabinoxylan content in wheat. Sci Rep 2020;10(1):1792; doi: 10.1038/s41598-020-58419-3

72. Wu X, Bian Q, Gao Y, Ni X, Sun Y, Xuan Y, et al. Evaluation of resistance to powdery mildew and identification of resistance genes in wheat cultivars. PeerJ. 2021;9:e10425. DOI: 10.7717/peerj.10425

73. Jacott C, Charpentier M, Murray J, Ridout C. Mildew Locus O facilitates colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in angiosperms. New Phytologist. 2020;227(2):343–51. DOI: 10.1111/nph.16465

74. Liang Y, Xia Y, Chang X, Gong G, Yang J, Hu Y, et al. Comparative Proteomic Analysis of Wheat Carrying *Pm40* Response to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* Using Two-Dimensional Electrophoresis. International Journal of Molecular Sciences. 2019 Feb 21;20(4):933. DOI: 10.3390/ijms20040933

75. Koller T, Brunner S, Herren G, et al. Pyramiding of transgenic *Pm3* alleles in wheat results in improved powdery mildew resistance in the field. Züchter Genet Breed Res 2018;131(4):861–871. DOI: 10.1007/s00122-017-3043-9

76. Wang Z, Li H, Zhang D, et al. Genetic and physical mapping of powdery mildew resistance gene *MlHLT* in Chinese wheat landrace Hulutou. Züchter Genet Breed Res 2015;128(2):365–373. DOI: 10.1007/s00122-014-2436-2

77. Singh SP, Hurni S, Ruinelli M, et al. Evolutionary divergence of the rye *Pm17* and *Pm8* resistance genes reveals ancient diversity. Plant Mol Biol 2018;98(3):249–260. DOI: 10.1007/s11103-018-0780-3

78. O'Hara T, Steed A, Goddard R, et al. The wheat powdery mildew resistance gene *Pm4* also confers resistance to wheat blast. Nat Plants 2024;10(6):984–993. DOI: 10.1038/s41477-024-01718-8

79. Jia J, Devos KM, Chao S, et al. RFLP-based maps of the homoeologous group-6 chromosomes of wheat and their application in the tagging of *Pm12*, a powdery mildew resistance gene transferred from *Aegilops speltoides* to wheat. Züchter Genet Breed Res 1996;92(5):559–565. DOI: 10.1007/BF00224558

80. Zhang R, Xiong C, Mu H, et al. Pm67, a new powdery mildew resistance gene transferred from Dasypyrum villosum chromosome 1V to common wheat (*Triticum aestivum* L.). Crop J 2021;9(4):882–888. DOI: 10.1016/j.cj.2020.09.012

81. Van Ghelder C, Parent GJ, Rigault P, Prunier J, Giguère I, Caron S, et al. The large repertoire of conifer NLR resistance genes includes drought responsive and highly diversified RNLs. Scientific Reports. 2019;9(1). DOI: 10.1038/s41598-019-47950-7

82. McIntosh RA, Dubcovsky J, Rogers WJ, Xia XC, and Raupp WJ. Catalogue of Gene Symbols for Wheat - 2020 Supplement. Available from: https://wheat.pw.usda.gov/GG3/wgc

83. van Ooijen G, Mayr G, Kasiem MM, Albrecht M, Cornelissen BJ, Takken FL. Structure–function analysis of the Nb-ARC domain of plant disease resistance proteins. Journal of Experimental Botany. 2008;59(6):1383–97. DOI: 10.1093/jxb/ern045

84. Wang W, Feng B, Zhou J-M, et al. Plant immune signaling: Advancing on two frontiers. J Integr Plant Biol 2020;62(1):2–24. DOI: 10.1111/jipb.12898

85. Duan Q, Liu M-CJ, Kita D, et al. FERONIA controls pectin- and nitric oxide-mediated male-female interaction. Nature 2020;579(7800):561–566. DOI: 10.1038/s41586-020-2106-2

86. Haruta M, Gaddameedi V, Burch H, et al. Comparison of the effects of a kinase-dead mutation of FERONIA on ovule fertilization and root growth of Arabidopsis. FEBS Lett 2018;592(14):2395–2402. DOI: 10.1002/1873-3468.13157

87. Guo H, Nolan TM, Song G, et al. FERONIA receptor kinase contributes to plant immunity by suppressing jasmonic acid signaling in Arabidopsis thaliana. Curr Biol 2018;28(20):3316-3324.e6. DOI: 10.1016/j.cub.2018.07.078

88. Kim D, Yang J, Gu F, et al. A temperature-sensitive FERONIA mutant allele that alters root hair growth. Plant Physiol 2021;185(2):405–423. DOI: 10.1093/plphys/kiaa051

89. Dünser K, Gupta S, Herger A, et al. Extracellular matrix sensing by FERONIA and Leucine-Rich Repeat Extensins controls vacuolar expansion during cellular elongation in Arabidopsis thaliana. EMBO J 2019;38(7):e100353; doi: 10.15252/embj.2018100353

90. Yang H, Wang D, Guo L, et al. Malectin/Malectin-like domain-containing proteins: A repertoire of cell surface molecules with broad functional potential. Cell Surf 2021;7(100056):100056. DOI: 10.1016/j.tcsw.2021.100056

91. Dievart A, Gottin C, Périn C, et al. Origin and diversity of plant receptor-like kinases. Annu Rev Plant Biol 2020;71(1):131–156. DOI: 10.1146/annurev-arplant-073019-025927

92. Betti F, Ladera-Carmona MJ, Weits DA, et al. Exogenous miRNAs induce post-transcriptional gene silencing in plants. Nat Plants 2021;7(10):1379–1388. DOI: 10.1038/s41477-021-01005-w

93. Mahanty B, Mishra R, Joshi RK. Cross-kingdom small RNA communication between plants and fungal phytopathogens-recent updates and prospects for future agriculture. RNA Biol 2023;20(1):109–119. DOI: 10.1080/15476286.2023.2195731

94. Nien Y-C, Vanek A, Axtell MJ. Trans-species mobility of RNA interference between plants and associated organisms. Plant Cell Physiol 2024;65(5):694–703. DOI: 10.1093/pcp/pcae012

95. Jerome Jeyakumar JM, Ali A, Wang W-M, et al. Characterizing the role of the miR156-SPL network in plant development and stress response. Plants 2020;9(9):1206. DOI: 10.3390/plants9091206

96. Denancé N, Sánchez-Vallet A, Goffner D, et al. Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. Front Plant Sci 2013;4:155. DOI: 10.3389/fpls.2013.00155

97. Li X, Pei Y, Sun Y, et al. A cotton cyclin-dependent kinase E confers resistance to Verticillium dahliae mediated by jasmonate-responsive pathway. Front Plant Sci 2018;9:642. DOI: 10.3389/fpls.2018.00642

98. Zhang B-S, Li Y-C, Guo H-S, et al. Verticillium dahliae secretes small RNA to target host MIR157d and retard plant floral transition during infection. Front Plant Sci 2022. DOI: 13:847086; doi: 10.3389/fpls.2022.847086

99. Derbyshire M, Mbengue M, Barascud M, et al. Small RNAs from the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* highlight host candidate genes associated with quantitative disease resistance. Mol Plant Pathol 2019;20(9):1279–1297. DOI: 10.1111/mpp.12841

100. Schouten A, Van Baarlen P, Van Kan JAL. Phytotoxic Nep1-like proteins from the necrotrophic fungus Botrytis cinerea associate with membranes and the nucleus of plant cells. New Phytol 2008;177(2):493–505. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02274.x

101. Alexander NJ, Hohn TM, McCormick SP. The *TRI11* gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P-450 monooxygenase required for C-15 hydroxylation in trichothecene biosynthesis. Appl Environ Microbiol 1998;64(1):221–225. DOI: 10.1128/aem.64.1.221-225.1998

102. Ma L, Li S, Wang H. MicroRNA: A mobile signal mediating information exchange within and beyond plant organisms. CRC Crit Rev Plant Sci 2024;43(4):313–325. DOI: 10.1080/07352689.2024.2338006

103. Loreti E, Perata P. Mobile plant microRNAs allow communication within and between organisms. New Phytol 2022;235(6):2176–2182. DOI: 10.1111/nph.18360

104. Shi L, Guo C, Fang M, et al. Cross-kingdom regulation of plant microRNAs: potential application in crop improvement and human disease therapeutics. Front Plant Sci 2024;15:1512047. DOI: 10.3389/fpls.2024.1512047

105. Tamura K. Nuclear pore complex-mediated gene expression in *Arabidopsis thaliana*. J Plant Res 2020;133(4):449–455. DOI: 10.1007/s10265-020-01177-0

106. Stirnweis D, Milani SD, Brunner S, et al. Suppression among alleles encoding nucleotide-binding-leucine-rich repeat resistance proteins interferes with resistance in F_1 hybrid and allele-pyramided wheat plants. Plant J 2014;79(6):893–903. DOI: 10.1111/tpj.12592

107. Zou S, Xu Y, Li Q, et al. Wheat powdery mildew resistance: from gene identification to immunity deployment. Front Plant Sci 2023;14:1269498. DOI: 10.3389/fpls.2023.1269498

108. Шпильчин ВВ. Зміна експресії гена *Wi* у поколіннях амфідиплоїдів Triticinae: дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії). Національний університет "Києво-Могилянська академія": м.Київ; 2018:1-148

109. Єфіменко ТС, Федак ЮГ, Антонюк М., Терновська ТК. Мікросателітний аналіз хромосом п'ятої гомологічної групи інтрогресивних ліній пшениці *Triticum aestivum*/*Amblyopyrum muticum*. Цитологія і генетика - сайт наукового журналу "Цитологія і генетика." 2015, том 49, № 3, 45-54 Available from: https://cytgen.com/uk/2015/45-54N3V49.htm

110. Антонюк МЗ. Інтрогресія як індуктор мінливості геному пшениці *Triticum aestivum* L.: дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук. Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України: м.Київ; 2019:1-539

111. Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin. 1987;19:11-5

112. Shtefiuk TV, Mykhailyk SYU, Antonyuk MZ, Ternovska TK, Characteristics of genetic diversity in the introgressive wheat lines by *R* genes conservative regions, Fact in Exp Evol of Org., 2016;19:55–60. Available from: https://ekmair.ukma.edu.ua/server/api/core/bitstreams/26e0cbb6-3dd5-4e46-b152-a7e5d710e9d7/content

113. Korbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. Nat Protoc 2008;3(9):1452–1456. DOI: 10.1038/nprot.2008.133

114. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, editors. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. 1626 p. 931-57

115. Chen XM, Line RF, Leung H. Genome scanning for resistance-gene analogs in rice, barley, and wheat by high-resolution electrophoresis. Züchter Genet Breed Res 1998;97(3):345–355. DOI: 10.1007/s001220050905

116. Yan G, Chen X. Molecular mapping of the rps1.A recessive gene for resistance to stripe rust in BBA 2890 barley. Phytopathology 2007;97(6):668–673. DOI: 10.1094/PHYTO-97-6-0668

117. Cheng P, Chen XM. Molecular mapping of a gene for stripe rust resistance in spring wheat cultivar IDO377s. Züchter Genet Breed Res 2010;121(1):195–204. DOI: 10.1007/s00122-010-1302-0

118. Shi ZX, Chen XM, Line RF, et al. Development of resistance gene analog polymorphism markers for the *Yr9* gene resistance to wheat stripe rust. Genome 2001;44(4):509–516. DOI: 10.1139/g01-028

119. NCBI Multiple Sequence Alignment Viewer. n.d. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/msaviewer/

120. Tutorial for GeneDoc 2.7. 2012. Available from: https://genedoc.software.informer.com/2.7/

121. DnaSP Software. n.d. Available from: http://www.ub.edu/dnasp/cgi/cntloadTv6.pl

122. Multiple Sequence Alignment - CLUSTALW. n.d. Available from: https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw

123. Primer3 Input. n.d. Available from: https://primer3.ut.ee/

124. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. Москва: Агропромиздат; 1988, 271с.

125. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 1989;123(3):585–595. DOI: 10.1093/genetics/123.3.585

126. Атраментова ЛО, Утєвська ОМ. Статистичні методи в біології. Харків: ХНУ ім. В.Н. Каразіна; 2007, 288с.

127. Kunz L, Sotiropoulos AG, Graf J, et al. The broad use of the *Pm8* resistance gene in wheat resulted in hypermutation of the *AvrPm8* gene in the powdery mildew pathogen. BMC Biol 2023;21(1):29. DOI: 10.1186/s12915-023-01513-5

128. He H, Zhu S, Zhao R, et al. Pm21, encoding a typical CC-NBS-LRR protein, confers broad-spectrum resistance to wheat powdery mildew disease. Mol Plant 2018;11(6):879–882. DOI: 10.1016/j.molp.2018.03.004

129. Nicholas KB, Nicholas HB, Deerfield DW. Genedoc: analysis and visualization of genetic variation. EMBNEW News. 1997. Vol. 4

130. Плигун ВВ, Антонюк МЗ. Мінливість послідовностей низки генів *Pm* у представників Triticeae. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2024; 34.1624:102-108. DOI: 10.7124/FEEO.v34.1624

131. Tirnaz S, Bayer PE, Inturrisi F, et al. Resistance gene analogs in the Brassicaceae: Identification, characterization, distribution, and evolution. Plant Physiol 2020;184(2):909–922. DOI: 10.1104/pp.20.00835

132. Slootweg EJ, Spiridon LN, Roosien J, et al. 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;162(3):1510–1528. DOI: 10.1104/pp.113.218842

133. Lagudah ES, Moullet O, Appels R. Map-based cloning of a gene sequence encoding a nucleotide-binding domain and a leucine-rich region at the Cre3 nematode resistance locus of wheat. Genome 1997;40(5):659–665. DOI: 10.1139/g97-087

134. Ayliffe MA, Steinau M, Park RF, et al. Aberrant mRNA processing of the maize Rp1-D rust resistance gene in wheat and barley. Mol Plant Microbe Interact 2004;17(8):853–864. DOI: 10.1094/mpmi.2004.17.8.853

135. McHale J, Fivaz-Depeursinge E, Dickstein S, et al. New evidence for the social embeddedness of infants' early triangular capacities. Fam Process 2008;47(4):445–463. DOI: 10.1111/j.1545-5300.2008.00265.x

136. Leister D. Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance genes. Trends Genet 2004;20(3):116–122. DOI: 10.1016/j.tig.2004.01.007

137. Плигун ВВ, Антонюк МЗ, Терновська ТК. Консервативні ділянки генів стійкості як джерело нуклеотидних поліморфізмів у дослідженні гексаплоїдів пшениці. Цитологія і генетика. 2025; 59(4):3-14. ISSN 0564–3783

138. Structure Software: V. 2.3.4. n.d. Available from: https://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure_software/release_versions/v2.3.4/html/structure.html

139. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 2000;155(2):945–959. DOI: 10.1093/genetics/155.2.945

140. van Rheenen W, Peyrot WJ, Schork AJ, et al. Genetic correlations of polygenic disease traits: from theory to practice. Nat Rev Genet 2019;20(10):567–581. DOI: 10.1038/s41576-019-0137-z

141. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol Ecol 2005;14(8):2611–2620. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x

142. Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, et al. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. Mol Ecol Resour 2015;15(5):1179–1191. DOI: 10.1111/1755-0998.12387

143. Ternovska TK, Iefimenko TS, Antonyuk MZ. Improvement of wheat genetic resistance to powdery mildew retrospects and prospects. Open Agric J 2022;17(1). DOI: 10.2174/18743315-v16-e221026-2022-ht14-3623-1

144. Arora S, Steuernagel B, Chandramohan S, et al. Resistance Gene Discovery and Cloning by Sequence Capture and Association Genetics. bioRxiv 2018. DOI: 10.1101/248146

145. Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(21):9828–9832. DOI: 10.1073/pnas.88.21.9828

146. Colas I. A study of the mechanisms of meiosis in wheat [dissertation in Internet]. University of East Anglia Norwich Research Park, Colney Lane, Norwich NR4 7UH; 2008. 189p.

147. Stebbins GL Jr. Cytological characteristics associated with the different growth habits in the dicotyledons. Am J Bot 1938;25(3):189–198. DOI: 10.1002/j.1537-2197.1938.tb09203.x

148. Martín AC, Rey M-D, Shaw P, et al. Dual effect of the wheat *Ph1* locus on chromosome synapsis and crossover. Chromosoma 2017;126(6):669–680. DOI: 10.1007/s00412-017-0630-0

149. Li H, Deal KR, Luo M-C, et al. Introgression of the *Aegilops speltoides* Su1-Ph1 Suppressor into Wheat. Front Plant Sci 2017;8:2163. DOI: 10.3389/fpls.2017.02163

150. Dover GA, Riley R. Variation at two loci affecting homoeologous meiotic chromosome pairing in *Triticum aestivum x Aegilops mutica* hydrids. Nat New Biol 1972;235(54):61–62. DOI: 10.1038/newbio235061a0

151. Плигун ВВ, Єфіменко ТС, Антонюк МЗ, Терновська ТК. Цитологічна стабільність пшеничних амфідиплоїдів і сортів пшениці в мейозі I. Наукові записки НаУКМА. Біологія і екологія 2020;3(0):3–13. DOI: 10.18523/2617-4529.2020.3.3-13

152. Able JA, Crismani W, Boden SA. Understanding meiosis and the implications for crop improvement. Funct Plant Biol 2009;36(7):575–588. DOI: 10.1071/FP09068

153. Sanei M, Pickering R, Kumke K, et al. Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids. Proc Natl Acad Sci U S A 2011;108(33):E498-505. DOI: 10.1073/pnas.1103190108

154. Ishii T, Ueda T, Tanaka H, et al. Chromosome elimination by wide hybridization between Triticeae or oat plant and pearl millet: pearl millet chromosome dynamics in hybrid embryo cells. Chromosome Res 2010;18(7):821–831. DOI: 10.1007/s10577-010-9158-3

155. Love RM. Varietal differences in meiotic chromosome behavior of Brazilian wheats 1. Agron J 1951;43(2):72–76. DOI: 10.2134/agronj1951.00021962004300020005x

156. Tanaka I. Differentiation of generative and vegetative cells in angiosperm pollen. Sex Plant Reprod 1997;10(1):1–7. DOI: 10.1007/s004970050060

157. Плигун ВВ, Антонюк МЗ, Єфіменко ТС, Терновська ТК. Спорогенез у гібридів першого покоління від схрещування пшениці м'якої і ліній з інтрогресіями від *Amblyopyrum muticum*. Наукові записки НаУКМА. Біологія і екологія 2021;4:13–20. DOI: 10.18523/2617-4529.2021.4.13-20

158. Sficas AG. Statistical analysis of chromosome pairing in interspecific hybrids. I. the probability distributions. Genetics 1962;47(9):1163–1170. DOI: 10.1093/genetics/47.9.1163

159. Sears E-R. Misdivision of univalents in common wheat. Chromosoma 1950;4(1):535–550. DOI: 10.1007/bf00325789

160. Naranjo T. Variable patterning of chromatin remodeling, telomere positioning, synapsis, and chiasma formation of individual rye chromosomes in meiosis of wheat-rye additions. Front Plant Sci 2018;9:880. DOI: 10.3389/fpls.2018.00880

161. Tanaka I. Differentiation of generative and vegetative cells in angiosperm pollen. Sex Plant Reprod 1997;10(1):1–7. DOI: 10.1007/s004970050060

162. Win KT, Kubo T, Miyazaki Y, et al. Identification of two loci causing F_1 pollen sterility in inter- and intraspecific crosses of rice. Breed Sci 2009;59(4):411–418. DOI: 10.1270/jsbbs.59.411

163. Єфіменко ТС. Молекулярно-генетичні механізми стійкості до холодового стресу в геномно-заміщеної форми пшениці: дисертація на здобуття

наукового ступеня кандидата біологічних наук. Національний університет “Києво-Могилянська академія”: м.Київ; 2017: 1-226

164. Ohta S. Phylogenetic relationship of Aegilops mutica Boiss. with the diploid species of congeneric Aegilops-Triticum complex, based on the new method of genome analysis using its B-chromosomes. Mem. Coll. Agric. Kyoto Univ. 1991; 137: 1–116

165. Dvorák J, McGuire PE. Nonstructural chromosome differentiation among wheat cultivars, with special reference to differentiation of chromosomes in related species. Genetics 1981;97(2):391–414. DOI: 10.1093/genetics/97.2.391

166. Kihara H. Wheat Studies: Retrospect and Prospects. Elsevier Science: London, England; 1982

167. Riley R, Kimber G. Aneuploids and the cytogenetic structure of wheat varietal populations. Heredity (Edinb) 1961;16(3):275–290. DOI: 10.1038/hdy.1961.34

168. Tiwari VK, Rawat N, Neelam K, et al. Random chromosome elimination in synthetic Triticum-Aegilops amphiploids leads to development of a stable partial amphiploid with high grain micro- and macronutrient content and powdery mildew resistance. Genome 2010;53(12):1053–1065. DOI: 10.1139/G10-083

169. Dedukh D, Riumin S, Chmielewska M, et al. Micronuclei in germ cells of hybrid frogs from *Pelophylax esculentus* complex contain gradually eliminated chromosomes. Sci Rep 2020;10(1):8720. DOI: 10.1038/s41598-020-64977-3

170. An H, Hu M, Li P, et al. Chromosomal Behavior during Meiosis in the Progeny of *Triticum timopheevii* × Hexaploid Wild Oat. PLoS One 2015;10(5):e0126398. DOI: 10.1371/journal.pone.0126398

171. Yang F, Fernández-Jiménez N, Tučková M, et al. Defects in meiotic chromosome segregation lead to unreduced male gametes in Arabidopsis SMC5/6 complex mutants. Plant Cell 2021;33(9):3104–3119. DOI: 10.1093/plcell/koab178

172. Moreno PE, Caetano CM, Olaya CA, et al. Chromosome Elimination in Intergeneric Hybrid of *Oryza sativa* × *Luziola peruviana*. Agric Sci 2014;05(13):1344–1350. DOI: 10.4236/as.2014.513144

173. Kashkush K, Feldman M, Levy AA. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. Genetics 2002;160(4):1651–1659. DOI: 10.1093/genetics/160.4.1651

174. Fakhri Z, Mirzaghaderi G, Ahmadian S, et al. Unreduced gamete formation in wheat × Aegilops spp. hybrids is genotype specific and prevented by shared homologous subgenomes. Plant Cell Rep 2016;35(5):1143–1154. DOI: 10.1007/s00299-016-1951-9

175. Yadav IS, Rawat N, Chhuneja P, et al. Comparative genomic analysis of 5Mg chromosome of *Aegilops geniculata* and 5Uu chromosome of *Aegilops umbellulata* reveal genic diversity in the tertiary gene pool. Front Plant Sci 2023;14:1144000. DOI: 10.3389/fpls.2023.1144000

176. Schoen A, Saripalli G, Hosseinirad S, et al. Genome Sequences from Diploids and Wild Relatives of Wheat for Comparative Genomics and Alien Introgressions. In: Compendium of Plant Genomes Springer International Publishing: Cham; 2024; pp. 241–263

177. Hao W, Collier SM, Moffett P, et al. Structural basis for the interaction between the potato virus X resistance protein (Rx) and its cofactor Ran GTPase-activating protein 2 (RanGAP2). J Biol Chem 2013;288(50):35868–35876. DOI: 10.1074/jbc.M113.517417

178. Carpentier J, Grenier E, Esquibet M, et al. Evolution and variability of Solanum RanGAP2, a cofactor in the incompatible interaction between the resistance protein GPA2 and the *Globodera pallida* effector Gp-RBP-1. BMC Evol Biol 2013;13:87. DOI: 10.1186/1471-2148-13-87

179. Zheng Q, Putker V, Goverse A. Molecular and cellular mechanisms involved in host-specific resistance to cyst nematodes in crops. Front Plant Sci 2021;12:641582. DOI: 10.3389/fpls.2021.641582

180. Lindner S, Keller B, Singh SP, et al. Single residues in the LRR domain of the wheat PM3A immune receptor can control the strength and the spectrum of the immune response. Plant J 2020;104(1):200–214. DOI: 10.1111/tpj.14917

181. Zhang W, Yu Z, Wang D, et al. Characterization and identification of the powdery mildew resistance gene in wheat breeding line ShiCG15-009. BMC Plant Biol 2023;23(1):113. DOI: 10.1186/s12870-023-04132-y

182. Avni R, Lux T, Minz-Dub A, et al. Genome sequences of three Aegilops species of the section Sitopsis reveal phylogenetic relationships and provide resources for wheat improvement. Plant J 2022;110(1):179–192. DOI: 10.1111/tpj.15664

183. Li L-F, Zhang Z-B, Wang Z-H, et al. Genome sequences of five Sitopsis species of Aegilops and the origin of polyploid wheat B subgenome. Mol Plant 2022;15(3):488–503. DOI: 10.1016/j.molp.2021.12.019

184. Singh L, Anderson JA, Chen J, et al. Development and validation of a perfect KASP marker for Fusarium head blight resistance gene Fhb1 in wheat. Plant Pathol J 2019;35(3):200–207. DOI: 10.5423/PPJ.OA.01.2019.0018

185. Ottaviani D, LeCain M, Sheer D. The role of microhomology in genomic structural variation. Trends Genet 2014;30(3):85–94. DOI: 10.1016/j.tig.2014.01.001

186. Plagnol V, Clayton D. Copy Number Variant Association Studies. In: Analysis of Complex Disease Association Studies Elsevier; 2011; pp. 215–230

187. Schiessl S-V, Katche E, Ihien E, et al. The role of genomic structural variation in the genetic improvement of polyploid crops. Crop J 2019;7(2):127–140. DOI: 10.1016/j.cj.2018.07.006

188. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Res 2002;30(12):e57. DOI: 10.1093/nar/gnf056

189. Samelak-Czajka A, Marszalek-Zenczak M, Marcinkowska-Swojak M, et al. MLPA-based analysis of copy number variation in plant populations. Front Plant Sci 2017;8:222. DOI: 10.3389/fpls.2017.00222

190. Silaiyiman S, Liu J, Wu J, et al. A systematic review of the advances and new insights into copy number variations in plant genomes. Plants 2025;14(9):1399. DOI: 10.3390/plants14091399

191. Dolatabadian A, Yuan Y, Bayer PE, et al. Copy number variation among resistance genes analogues in *Brassica napus*. Genes (Basel) 2022;13(11):2037. DOI: 10.3390/genes13112037

192. Dorostkar S, Dadkhodaie A, Ebrahimie E, et al. Comparative transcriptome analysis of two contrasting resistant and susceptible *Aegilops tauschii* accessions to wheat leaf rust *(Puccinia triticina)* using RNA-sequencing. Sci Rep 2022;12(1):821. DOI: 10.1038/s41598-021-04329-x

193. Kumar R, Chanda B, Adkins S, et al. Comparative transcriptome analysis of resistant and susceptible watermelon genotypes reveals the role of RNAi, callose, proteinase, and cell wall in squash vein yellowing virus resistance. Front Plant Sci 2024;15:1426647. DOI: 10.3389/fpls.2024.1426647

194. Leong R, He X, Beijen BS, et al. Unlocking gene regulatory networks for crop resilience and sustainable agriculture. 2025. DOI: 10.17863/CAM.118921

195. Dong Y, Krishnamoorthi S, Tan GZH, et al. Co-option of plant gene regulatory network in nutrient responses during terrestrialization. Nat Plants 2024;10(12):1955–1968. DOI: 10.1038/s41477-024-01851-4

196. Sonawane AR, DeMeo DL, Quackenbush J, et al. Constructing gene regulatory networks using epigenetic data. NPJ Syst Biol Appl 2021;7(1):45; doi: 10.1038/s41540-021-00208-3

197. Li W, Zhang Q, Wang S, et al. Development and characterization of wheat-sea wheatgrass (*Thinopyrum junceiforme*) amphiploids for biotic stress resistance and abiotic stress tolerance. Züchter Genet Breed Res 2019;132(1):163–175. DOI: 10.1007/s00122-018-3205-4

198. Han G, Yan H, Wang J, et al. Molecular cytogenetic identification of a new wheat-rye 6R addition line and physical localization of its powdery mildew resistance gene. Front Plant Sci 2022;13:889494. DOI: 10.3389/fpls.2022.889494

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Публікації, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. **Плигун ВВ**, Єфіменко ТС, Антонюк МЗ, Терновська ТК. Цитологічна стабільність пшеничних амфідиплоїдів і сортів пшениці в мейозі І. Наукові записки НаУКМА. Біологія і екологія. 2020; 3:3-13. DOI: 10.18523/2617-4529.2020.3.3-13 (Особистий внесок здобувача – опрацьованння літератури, отримання експериметнальних даних, написанння тексту та обговорення зі співавторами).

2. **Плигун ВВ**, Антонюк МЗ, Єфіменко ТС, Терновська ТК. Спорогенез у гібридів першого покоління від схрещування пшениці м'якої і ліній з інтрогресіями від *Amblyopyrum muticum*. Наукові записки НаУКМА. Біологія і екологія. 2021; 4:13-20. DOI: 10.18523/2617-4529.2021.4.13-20 (Особистий внесок здобувача – опрацьованння літератури, отримання експериметнальних даних, написанння тексту та обговорення зі співавторами).

3. **Плигун ВВ**, Антонюк МЗ, Єфіменко ТС, Терновська ТК. Гени стійкості до *Blumeria graminis* та їхні продукти у злаків. Наукові записки НаУКМА. Біологія і екологія. 2022; 5:14-2. DOI: 10.18523/2617-4529.2022.5.14-24 (Особистий внесок здобувача – опрацьованння літератури, отримання експериметнальних даних, написанння тексту та обговорення зі співавторами).

4. **Плигун ВВ**, Антонюк МЗ. Формування стійкості до патогенів у рослин за участі епігенетичних чинників і фітогормонів. Наукові записки НаУКМА. Біологія і екологія. 2023; 6:3-16. DOI: 10.18523/2617-4529.2023.6.3-16 (Особистий внесок здобувача – опрацьованння літератури, отримання експериметнальних даних, написанння тексту та обговорення зі співавторами).

5. **Плигун ВВ**, Антонюк МЗ. Мінливість послідовностей низки генів *Pm* у представників Triticeae. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2024; 34.1624:102-108. DOI: 10.7124/FEEO.v34.1624 (Особистий внесок здобувача – опрацьованння літератури, отримання експериметнальних даних, написанння тексту та обговорення зі співавторами).

6. **Плигун ВВ**, Антонюк МЗ, Терновська ТК. Консервативні ділянки генів стійкості як джерело нуклеотидних поліморфізмів у дослідженні гексаплоїдів пшениці. Цитологія і генетика. 2025; 59(4):3-14. ISSN 0564–3783 (Особистий внесок здобувача – опрацьованння літератури, отримання експериметнальних даних, написанння тексту та обговорення зі співавторами).

Публікації, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Плигун ВВ**. Особливості проходження мейозу у амфідиплоїдів пшениці. Збірник тез доповідей XVI Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології»; м. Львів, Україна, 27-29 квітня 2020; с. 80-81.

2. **Плигун ВВ**. Аналіз мікро- та макроспорогенезу у гібридів між лініями пшениці м'якої з інтрогресіями від *Ambliopyrum muticum* та сортами пшениці м'якої. Збірник тез доповідей XVII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології»; м. Львів, 19-21 квітня 2021; с. 109-110.

3. **Плигун ВВ**, Антонюк МЗ, Єфіменко ТС, Терновська ТК. Вивчення структури генів стійкості до борошнистої роси у ліній пшениці м`якої з інтрогресіями від *Amblyopyrum muticum*. Матеріали конференції XVIII Міжнародної наукової конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» у 33 томі збірника наукових праць «Фактори експериментальної еволюції організмів», м. Київ, Україна, 26–29 вересня 2023; с. 203 (Особистий внесок здобувача – опрацьованння літератури, отримання експериметнальних даних, написанння тексту та обговорення зі співавторами).

4. **Плигун ВВ**, Антонюк МЗ. Мінливість послідовностей низки генів *Pm* у представників Triticeae. XIX Міжнародна наукова конференція «Фактори експериментальної еволюції організмів», м. Тернопіль, Україна, 23–26 вересня 2024; 34.1624:102-108 (Особистий внесок здобувача – опрацьованння літератури, отримання експериметнальних даних, написанння тексту та обговорення зі співавторами).

5. **Плигун ВВ**, Антонюк МЗ, Єфіменко ТС, Терновська ТК. Створення та апробація праймерів до консервативних ділянок генів стійкості до борошнистої роси з залученням інтрогресій від дикорослих видів Triticinae (Development and evaluation of primers to conserved regions of *Pm* with the involvement of introgressions from wild species Triticinae). Збірник матеріалів Національної конференції з міжнародною участю «Природничі науки в діалозі поколінь», м. Кишинів, Республіка Молдова, 12-13 вересня 2024; видання 7, с. 224. ISBN 978-9975-62-756-6 (Особистий внесок здобувача – опрацьованнння літератури, отримання експериметнальних даних, написаннння тексту та обговорення зі співавторами).

6. **Плигун ВВ**, Антонюк МЗ, Єфіменко ТС, Терновська ТК. Аналіз мейозу у гібридів пшениці м’якої з інтрогресіями від *Amblyopirum muticum*. Збірник тез доповідей XXI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ в біології», м. Львів, Україна, 28 квітня–01 травня 2025; с. 152-154 (Особистий внесок здобувача – опрацьованнння літератури, отримання експериметнальних даних, написаннння тексту та обговорення зі співавторами).

7. **Плигун ВВ**, Антонюк МЗ, Єфіменко ТС, Терновська ТК. Мінливість консервативних районів генів стійкості до патогенів у представників Triticeae. Збірник матеріалів V Конференції молодих учених «Біологія рослин і біотехнологія», м. Київ, Україна, 15-16 травня 2025; с. 18 (Особистий внесок здобувача – опрацьованнння літератури, отримання експериметнальних даних, написаннння тексту та обговорення зі співавторами).

ДОДАТОК Б

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ГЕНІВ, ВИКОРИСТАНИХ ДЛЯ ПОРІВНЯННЯ

№ з/п	*Pm2*	
	Назва послідовності у GenBank	Номер доступу у GenBank
1	*Triticum aestivum Pm2* gene for PM2 protein, complete cds	LN999386.1
1	*Aegilops tauschii* subsp. *strangulata* PM2 protein (*Pm2*) gene, алель *Pm2-e*, complete cds	MW538904.1
2	*Aegilops tauschii* subsp. *strangulata* PM2 protein *(Pm2) gene,* алель *Pm2-i*, complete cds	MW538907.1
3	*Aegilops tauschii* subsp. *strangulata* PM2 protein *(Pm2)* gene, алель *Pm2-j*, complete cds	MW538906.1
4	*Aegilops tauschii* subsp. *strangulata* PM2 protein (*Pm2*) gene, алель *Pm2-f*, complete cds	MW538905.1
5	*Aegilops tauschii* subsp. *strangulata* PM2 protein *(Pm2) gene,* алель *Pm2-d*, complete cds	MW538903.1
6	*Aegilops tauschii* subsp. *strangulata* PM2 protein (*Pm2*) gene, алель *Pm2-g*, complete cds	MW538910.1
7	*Aegilops tauschii* subsp. *strangulata* PM2 protein *(Pm2) gene,* алель *Pm2-h*, complete cds	MW538911.1
Pm3		
1	*Triticum aestivum Pm3 (Pm3)* gene, *Pm3_8152* allele, complete cds	GU230859.1
2	*Triticum aestivum Pm3 (Pm3)* gene, *Pm3_11150* allele, complete cds	GU230858.1
3	*Triticum aestivum Pm3 (Pm3)* gene, *Pm3_2816* allele, complete cds	GU230857.1
4	*Triticum aestivum Pm3 (Pm3)* gene, *Pm3_15011* allele, complete cds	GU230856.1

Продовження додатку Б

5	*Triticum aestivum Pm3 (Pm3)* gene, *Pm3_2616* allele, complete cds	GU230855.1
6	*Triticum aestivum Pm3 (Pm3)* gene, *Pm3_4650* allele, complete cds	GU230854.1
7	*Triticum aestivum Pm3 (Pm3)* gene, *Pm3_7524* allele, complete cds	GU230853.1
8	*Triticum aestivum Pm3 (Pm3)* gene, *Pm3Go/Jho* allele, complete cds	GU230852.1
9	*Triticum aestivum cultivar Chancellor Pm3-like disease resistance protein (PM3)* gene, complete cds	FJ794605.1
10	*Triticum aestivum powdery mildew resistance protein PM3D (Pm3)* gene, *Pm3-d* allele, complete cds	AY939881.1
11	*Triticum aestivum powdery mildew resistance protein PM3A (Pm3)* gene, *Pm3-a* allele, complete cds	AY939880.1
12	*Triticum aestivum powdery mildew resistance protein PM3F (Pm3)* gene, *Pm3-f* allele, complete cds	DQ071554.1
13	*Triticum monococcum powdery mildew resistance-like protein (Pm3)* gene, complete cds	KR262061.1
14	*Triticum aestivum powdery mildew resistance protein PM3b (Pm3)* gene, *Pm3-b* allele, complete cds	AY325736.1
15	*Triticum aestivum cultivar W150 powdery mildew resistance protein PM3E (Pm3)* gene, *Pm3-e* allele, complete cds	DQ251488.1
16	*Triticum aestivum cultivar Triticale/8*Chancellor powdery mildew resistance protein PM3C (Pm3)* gene, *Pm3-c* allele, complete cds	DQ251487.1
17	*Triticum aestivum cultivar Galaxie powdery mildew resistance protein (Pm3)* gene, complete cds	DQ251491.1

Продовження додатку Б

18	*Triticum aestivum cultivar Chinese Spring powdery mildew resistance protein PM3CS (Pm3)* gene*, Pm3-CS* allele, complete cds	DQ251490.1
19	*Triticum aestivum cultivar Aristide powdery mildew resistance protein PM3G (Pm3)* gene, *Pm3-g* allele, complete cds	DQ251489.1
20	*Triticum dicoccoides* genotype *8-39 powdery mildew resistance protein Pm3* gene*, complete cds*	JF739349.1
21	*Triticum dicoccoides* genotype *8-37 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739348.1
22	*Triticum dicoccoides* genotype *8-35 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739347.1
23	*Triticum dicoccoides* genotype *8-22 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739346.1
24	*Triticum dicoccoides* genotype *8-2 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739345.1
25	*Triticum dicoccoides* genotype *30-45 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739344.1
26	*Triticum dicoccoides* genotype *30-44 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739343.1
27	*Triticum dicoccoides* genotype *30-42 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739342.1
28	*Triticum dicoccoides* genotype *30-37 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739341.1
29	*Triticum dicoccoides* genotype *286 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739340.1

Продовження додатку Б

30	*Triticum dicoccoides* genotype *28-6 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739339.1
31	*Triticum dicoccoides* genotype *28-53 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739338.1
32	*Triticum dicoccoides* genotype *28-30 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739337.1
33	*Triticum dicoccoides* genotype *28-3 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739336.1
34	*Triticum dicoccoides* genotype *28-2 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739335.1
35	*Triticum dicoccoides* genotype *28-15 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739334.1
36	*Triticum dicoccoides* genotype *28-14 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739333.1
37	*Triticum dicoccoides* genotype *23-30 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739332.1
38	*Triticum dicoccoides* genotype *23-3 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739331.1
39	*Triticum dicoccoides* genotype *23-26 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739330.1
40	*Triticum dicoccoides* genotype *23-15 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739329.1
41	*Triticum dicoccoides* genotype *225 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739328.1

Продовження додатку Б

42	*Triticum dicoccoides* genotype *220 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739327.1
43	*Triticum dicoccoides* genotype *215 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739326.1
44	*Triticum dicoccoides* genotype *210 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739325.1
45	*Triticum dicoccoides* genotype *199 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739324.1
46	*Triticum dicoccoides* genotype *19-16 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739323.1
47	*Triticum dicoccoides* genotype *189 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739322.1
48	*Triticum dicoccoides* genotype *18-48 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739321.1
49	*Triticum dicoccoides* genotype *18-25 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739320.1
50	*Triticum dicoccoides* genotype *18-20 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739319.1
51	*Triticum dicoccoides* genotype *18-1 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739318.1
52	*Triticum dicoccoides* genotype *176 truncated powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739317.1
53	*Triticum dicoccoides* genotype *174 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739316.1

Продовження додатку Б

54	*Triticum dicoccoides* genotype *15-33 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739315.1
55	*Triticum dicoccoides* genotype *146 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739314.1
56	*Triticum dicoccoides* genotype *141 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739313.1
57	*Triticum dicoccoides* genotype *14 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739312.1
58	*Triticum dicoccoides* genotype *13-83 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739311.1
59	*Triticum dicoccoides* genotype *124 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739310.1
60	*Triticum dicoccoides* genotype *111 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739309.1
61	*Triticum dicoccoides* genotype *11-4 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739308.1
62	*Triticum dicoccoides* genotype *11-14 powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739307.1
63	*Triticum dicoccoides* genotype *11-13 truncated powdery mildew resistance protein Pm3* gene, complete cds	JF739306.1
64	*Triticum aestivum* voucher *IG42920 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	FJ212314.1
65	*Triticum aestivum* voucher *IG42525 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	FJ212313.1

Продовження додатку Б

66	*Triticum aestivum* voucher *IG42416 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	FJ212312.1
67	*Triticum aestivum* voucher *VIR23728 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	FJ212310.1
68	*Triticum aestivum* voucher *IG42469 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	FJ212309.1
69	*Triticum aestivum* voucher *AUS10963 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	FJ212308.1
70	*Triticum aestivum* voucher *AUS14475 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	FJ212307.1
71	*Triticum aestivum* voucher *IG42281 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	FJ212306.1
72	*Triticum aestivum* voucher *IG41606 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	FJ212305.1
73	*Triticum aestivum* voucher *AUS13636 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	FJ212304.1
74	*Triticum aestivum* voucher *VIR31594 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	FJ212303.1
75	*Triticum aestivum* voucher *IG42868 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	FJ212302.1
76	*Triticum aestivum* voucher *IG42255 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	FJ212301.1
77	*Triticum aestivum* voucher *AUS9939 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	FJ212300.1

Продовження додатку Б

78	*Triticum turgidum* subsp. *durum* voucher *PI 176228 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	EU192128.1
79	*Triticum turgidum* subsp. *durum* voucher *PI 119327 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	EU192127.1
80	*Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides voucher IG-46439 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	EU192126.1
81	*Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides* voucher *PI 538684 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	EU192125.1
82	*Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides* voucher *IG-46457 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	EU192124.1
83	*Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides* voucher *PI 538657 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	EU192123.1
84	*Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides* voucher *PI 428063 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	EU192122.1
85	*Triticum turgidum* subsp. *durum* voucher *TRI 1908 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	EU192121.1
86	*Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides voucher TRI 9803 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	EU192120.1
87	*Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides* voucher *TTD20 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	EU192119.1

Продовження додатку Б

88	*Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides* voucher *PI 428093 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	EU192118.1
89	*Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides* voucher *IG-46310 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	EU192117.1
90	*Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides* voucher *TTD25 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	EU192116.1
91	*Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides* voucher *TRI 11504 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	EU192115.1
92	*Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides* voucher *TTD54 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	EU192114.1
93	*Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides* voucher *PI 428014 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	EU192113.1
94	*Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides* voucher *TTD62 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	EU192112.1
95	*Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides* voucher *TTD123 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	EU192111.1
96	*Triticum turgidum* subsp. *dicoccon* voucher *PI 94635 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	EU192110.1
97	*Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides* voucher *IG-113302 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	EU192109.1

Продовження додатку Б

98	*Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides* voucher *PI 428091 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	EU192108.1
99	*Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides* voucher *PI 428018 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	EU192107.1
100	*Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides* voucher *PI 538656 powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete cds	EU192106.1
101	*Triticum aestivum* voucher *AUS14442 powdery mildew resistance protein PM3 variant pseudogene, partial sequence*	FJ212315.1
101	*Triticum aestivum* cultivar Yumai 13 *Pm3b-like disease resistance protein (PM3)* gene, complete cds	FJ794606.1
102	*Triticum aestivum powdery mildew resistance protein PM3 variant* gene, complete sequence	FJ607139.1
103	*Triticum turgidum* subsp. *durum Pm3 locus,* genomic sequence	AY146587.2
104	*Triticum aestivum PM3-1B (Pm3-1B)* gene, complete cds	KF572031.1
105	*Triticum aestivum powdery mildew resistance protein PM8 (Pm8)* gene, complete cds	KF572030.1
106	*Triticum aestivum* cultivar Glenlea clone TaBAC1594F05, complete sequence	FJ447464.1
Pm21		
1	*Triticum aestivum* cultivar Yang Mai 158 *serine/threonine protein kinase Stpk-B (Stpk-B)* gene, complete cds	JF439308.1
2	*Triticum aestivum* cultivar Yang Mai 158 *serine/threonine protein kinase Stpk-A (Stpk-A)* gene, complete cds	JF439306.1

Продовження додатку Б

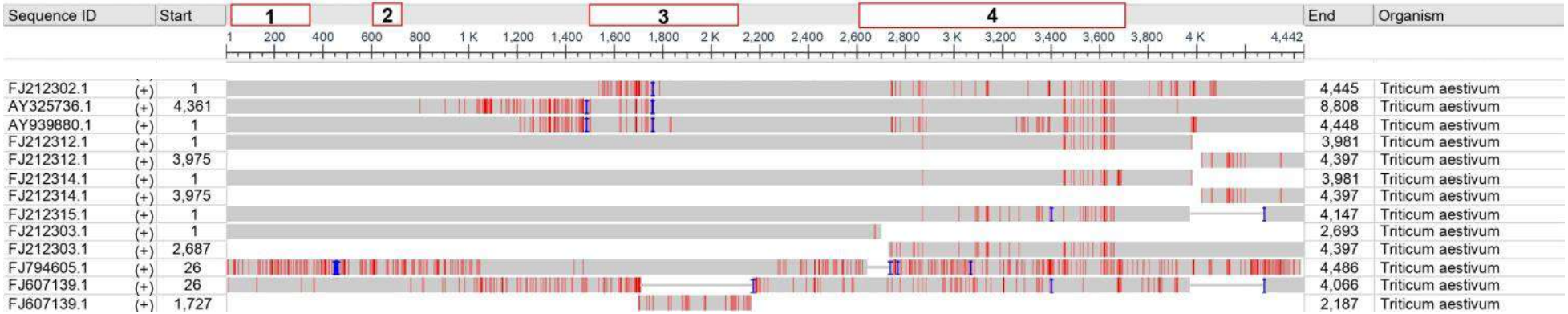
3	*Triticum aestivum* cultivar Yang Mai 158 *serine/threonine protein kinase Stpk-D (Stpk-D)* gene, complete cds	JF439307.1

ДОДАТОК В

ВИРІВНЮВАННЯ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ *Pm3*, РОЗМІЩЕНИХ У GENBANK

Продовження додатку В

Продовження додатку В



Примітка. Цифрами позначені послідовності, які кодують: 1 – Rx N-термінальну ділянку білка; 2 – NB-ARC; 3-4 – повтори, багаті на лейцин.

ДОДАТОК Г

ТАБЛИЦІ З КОМПОНЕНТАМИ ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНИХ СПЕКТРІВ, ОТРИМАНИМИ ЗА МЕТОДИКОЮ RGAP ТА ДНК АВРОТІКИ ТА ЇЇ ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ-ПОХІДНИХ

Таблиця 1

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Pm8-LRR-R + Pm8-LRR-L та ДНК Авротіки та її інтрогресивних ліній-похідних

Номер компонента спектру	Генотип												
	Авротіка	tica1007	tica1049	tica1058	tica1063 (2018)	tica1063 (2021)	tica1075 (2018)	tica1075 (2021)	tica1084	tica1130	tica1187	tica1089	tica1094
1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
2	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0

Таблиця 2

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів RLRRrev + XLRRrev та ДНК Авротіки та її інтрогресивних ліній-похідних

Номер компонента спектру	Генотип												
	Авротіка	tica1007	tica1049	tica1058	tica1063 (2018)	tica1063 (2021)	tica1075 (2018)	tica1075 (2021)	tica1084	tica1130	tica1187	tica1089	tica1094
1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
3	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
4	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
7	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0
8	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
9	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0
10	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
12	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0
13	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
14	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0

Таблиця 3

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Cre3k3 + Cre3_P-loop та ДНК Авротіки та її інтрогресивних ліній-похідних

Номер компонента спектру	Генотип												
	Авротіка	tica1007	tica1049	tica1058	tica1063 (2018)	tica1063 (2021)	tica1075 (2018)	tica1075 (2021)	tica1084	tica1130	tica1187	tica1089	tica1094
1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1

Таблиця 4

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Cre3k3 + Cre3Lr-F та ДНК Авротіки та її інтрогресивних ліній-похідних

Номер компонента спектру	Генотип												
	Авротіка	tica1007	tica1049	tica1058	tica1063 (2018)	tica1063 (2021)	tica1075 (2018)	tica1075 (2021)	tica1084	tica1130	tica1187	tica1089	tica1094
1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0
6	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0
7	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
8	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Таблиця 5

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Pm8-LRR-R + Pm8-MHD-L та ДНК Авротіки та її інтрогресивних ліній-похідних

Номер компонента спектру	Генотип												
	Авротіка	tica1007	tica1049	tica1058	tica1063 (2018)	tica1063 (2021)	tica1075 (2018)	tica1075 (2021)	tica1084	tica1130	tica1187	tica1089	tica1094
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1

Таблиця 6

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів RLRRrev + Cre3_P-loop та ДНК Авротіки та її інтрогресивних ліній-похідних

Номер компонента спектру	Генотип												
	Авротіка	tica1007	tica1049	tica1058	tica1063 (2018)	tica1063 (2021)	tica1075 (2018)	tica1075 (2021)	tica1084	tica1130	tica1187	tica1089	tica1094
1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Таблиця 7

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Cre3LrF + XLRRrev та ДНК Авротіки та її інтрогресивних ліній-похідних

Номер компонента спектру	Генотип												
	Авротіка	tica1007	tica1049	tica1058	tica1063 (2018)	tica1063 (2021)	tica1075 (2018)	tica1075 (2021)	tica1084	tica1130	tica1187	tica1089	tica1094
1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
2	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
4	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
5	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
6	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
10	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
11	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Таблиця 8

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Cre3LrF + Cre3_P-loop та ДНК Авротіки та її інтрогресивних ліній-похідних

Номер компонента спектру	Генотип												
	Авротіка	tica1007	tica1049	tica1058	tica1063 (2018)	tica1063 (2021)	tica1075 (2018)	tica1075 (2021)	tica1084	tica1130	tica1187	tica1089	tica1094
1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
2	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
3	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
7	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0
8	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
9	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
10	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Таблиця 9

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Cre3k3 + XLRRrev та ДНК Авротіки та її інтрогресивних ліній-похідних

Номер компонента спектру	Генотип												
	Авротіка	tica1007	tica1049	tica1058	tica1063 (2018)	tica1063 (2021)	tica1075 (2018)	tica1075 (2021)	tica1084	tica1130	tica1187	tica1089	tica1094
1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
2	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
3	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
4	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0
5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
6	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
7	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
8	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
9	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0

Таблиця 10

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Cre3k3 + XLRRrev та ДНК Авротіки та її інтрогресивних ліній-похідних

Номер компонента спектру	Генотип												
	Авротіка	tica1007	tica1049	tica1058	tica1063 (2018)	tica1063 (2021)	tica1075 (2018)	tica1075 (2021)	tica1084	tica1130	tica1187	tica1089	tica1094
1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

ДОДАТОК Д

ТАБЛИЦІ З КОМПОНЕНТАМИ ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНИХ СПЕКТРІВ, ОТРИМАНИМИ ЗА МЕТОДИКОЮ RGAP ТА ДНК АВРОТІКИ ТА СОРТІВ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ

Таблиця 1

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів RLRRrev + Cre3_P-loop та ДНК Авротіки, сортів пшениці м'якої

Номер компонента спектру	Генотип								
	Авротіка	Аврора	Тіра	Панна	Лелека	Одеська 267	Селянка	Вдала	Ніконія
1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
2	0	1	0	1	1	1	0	0	0
3	0	1	0	0	0	0	0	0	0
4	0	1	0	1	1	1	0	0	0
5	0	0	0	1	1	1	0	0	0
6	0	0	0	0	0	1	0	0	0
7	0	0	0	0	0	1	0	0	0
8	0	1	1	1	1	1	0	0	0
9	0	1	0	0	1	1	0	0	0
10	0	0	0	0	0	1	0	0	0
11	0	0	0	0	0	1	0	0	0
12	0	0	0	0	1	1	0	0	0
13	0	0	0	1	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	1	0	0	0
15	1	1	0	0	0	0	0	0	0

Таблиця 2

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Cre3LrF + XLRRrev та ДНК Авротіки, сортів пшениці м’якої

Номер компонента спектру	Генотип								
	Авротіка	Аврора	Тіра	Панна	Лелека	Одеська 267	Селянка	Вдала	Ніконія
1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
2	0	1	0	0	1	0	0	0	0
3	0	1	0	0	0	0	0	0	0
4	0	1	1	0	1	0	0	0	0
5	0	1	0	0	1	0	0	0	0
6	0	1	0	1	1	1	0	0	0
7	0	1	0	1	1	1	0	0	0
8	0	1	0	0	1	1	0	0	0
9	0	1	0	0	1	1	0	0	0

Таблиця 3

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Cre3k3 + Cre3_P-loop та ДНК Авротіки, сортів пшениці м’якої

Номер компонента спектру	Генотип								
	Авротіка	Аврора	Тіра	Панна	Лелека	Одеська 267	Селянка	Вдала	Ніконія
1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Таблиця 4

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Cre3k3 + XLRRrev та ДНК Авротіки, сортів пшениці м’якої

Номер компонента спектру	Генотип								
	Авротіка	Аврора	Тіра	Панна	Лелека	Одеська 267	Селянка	Вдала	Ніконія
1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
3	0	1	1	1	1	1	0	0	0
4	0	1	1	1	1	1	0	0	0
5	0	0	0	0	1	1	0	0	0
6	0	0	0	0	1	0	0	0	0

Таблиця 5

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів RLRRrev + RLRRfor та ДНК Авротіки, сортів пшениці м’якої

Номер компонента спектру	Генотип								
	Авротіка	Аврора	Тіра	Панна	Лелека	Одеська 267	Селянка	Вдала	Ніконія
1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
2	1	1	1	1	1	1	0	0	0
3	1	1	1	1	1	1	0	0	0
4	1	1	1	1	1	1	0	0	0
5	1	1	1	1	1	1	0	0	0

Таблиця 6

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Cre3k3 + RLRRfor та ДНК Авротіки, сортів пшениці м’якої

Номер компонента спектру	Генотип								
	Авротіка	Аврора	Тіра	Панна	Лелека	Одеська 267	Селянка	Вдала	Ніконія
1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	1	1	0	0	0	0
3	0	1	0	1	0	0	0	0	0
4	0	1	0	0	0	0	0	0	0
5	1	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	1	0	1	1	0	0	0	0
7	0	1	0	0	0	0	0	0	0
8	0	1	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	1	0	0	0	0
10	0	1	0	0	1	1	0	0	0
11	0	1	0	1	0	0	0	0	0
12	0	1	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	1	0	0	0
14	1	0	0	1	1	0	0	0	0
15	0	0	0	0	1	0	0	0	0
16	1	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	1	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	1	0	0	0
19	0	1	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	1	0	0	0
21	0	0	0	0	0	1	0	0	0
22	1	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	1	1	0	0	0
24	1	1	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Таблиця 7

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Pm8-LRR-R + Pm8-MHD-L та ДНК Авротіки, сортів пшениці м’якої

Номер компонента спектру	Генотип								
	Авротіка	Аврора	Тіра	Панна	Лелека	Одеська 267	Селянка	Вдала	Ніконія
1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
2	1	1	1	1	1	1	0	0	0

Таблиця 8

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів RLRRrev + Cre3_P-loop та ДНК Авротіки, сортів пшениці м’якої

Номер компонента спектру	Генотип								
	Авротіка	Аврора	Тіра	Панна	Лелека	Одеська 267	Селянка	Вдала	Ніконія
1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
2	0	1	0	1	1	1	0	0	0
3	0	1	0	0	0	0	0	0	0
4	0	1	0	1	1	1	0	0	0
5	0	0	0	1	1	1	0	0	0
6	0	0	0	0	0	1	0	0	0
7	0	0	0	0	0	1	0	0	0
8	0	1	1	1	1	1	0	0	0
9	0	1	0	0	1	1	0	0	0
10	0	0	0	0	0	1	0	0	0
11	0	0	0	0	0	1	0	0	0
12	0	0	0	0	1	1	0	0	0
13	0	0	0	1	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	1	0	0	0
15	1	1	0	0	0	0	0	0	0

Таблиця 9

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів RLRRfor + Cre3_P-loop та ДНК Авротіки, сортів пшениці м’якої

Номер компонента спектру	Генотип								
	Авротіка	Аврора	Тіра	Панна	Лелека	Одеська 267	Селянка	Вдала	Ніконія
1	1	0	1	1	1	0	0	0	0
2	1	0	1	1	1	0	0	0	0

Таблиця 10

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Cre3LrF + XLRRrev та ДНК Авротіки, сортів пшениці м’якої

Номер компонента спектру	Генотип								
	Авротіка	Аврора	Тіра	Панна	Лелека	Одеська 267	Селянка	Вдала	Ніконія
1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
2	0	1	0	0	1	0	0	0	0
3	0	1	0	0	0	0	0	0	0
4	0	1	1	0	1	0	0	0	0
5	0	1	0	0	1	0	0	0	0
6	0	1	0	1	1	1	0	0	0
7	0	1	0	1	1	1	0	0	0
8	0	1	0	0	1	1	0	0	0
9	0	1	0	0	1	1	0	0	0

Таблиця 11

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Cre3LrF + Cre3_P-loop та ДНК Авротіки, сортів пшениці м’якої

Номер компонента спектру	Генотип								
	Авротіка	Аврора	Тіра	Панна	Лелека	Одеська 267	Селянка	Вдала	Ніконія
1	0	1	0	1	1	1	0	0	0
2	0	1	0	1	1	1	0	0	0
3	0	1	0	1	1	1	0	0	0

Таблиця 12

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Cre3k3 + Cre3_P-loop та ДНК Авротіки, сортів пшениці м’якої

Номер компонента спектру	Генотип								
	Авротіка	Аврора	Тіра	Панна	Лелека	Одеська 267	Селянка	Вдала	Ніконія
1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Таблиця 13

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Cre3k3 + XLRRrev та ДНК Авротіки, сортів пшениці м’якої

Номер компонента спектру	Генотип								
	Авротіка	Аврора	Тіра	Панна	Лелека	Одеська 267	Селянка	Вдала	Ніконія
1	1	1	0	1	1	1	0	0	0
2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	1	1	1	0	0	0
5	0	1	0	0	0	0	0	0	0
6	1	0	0	0	0	0	0	0	0
7	1	1	0	1	1	1	0	0	0
8	1	1	0	1	1	1	0	0	0
9	1	0	0	1	1	1	0	0	0
10	0	1	0	0	0	0	0	0	0
11	1	1	0	1	1	1	0	0	0
12	1	1	0	1	1	1	0	0	0
13	0	0	0	1	0	0	0	0	0
14	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Таблиця 14

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Pm8-LRR-R + Cre3-Lr-F та ДНК Авротіки, сортів пшениці м’якої

Номер компонента спектру	Генотип								
	Авротіка	Аврора	Тіра	Панна	Лелека	Одеська 267	Селянка	Вдала	Ніконія
1	0	1	0	1	1	1	0	0	0
2	0	0	0	1	0	0	0	0	0
3	0	1	0	1	1	0	0	0	0
4	0	1	0	1	1	1	0	0	0

Таблиця 15

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів RLRRrev + RLRRfor та ДНК Авротіки, сортів пшениці м’якої

Номер компонента спектру	Генотип								
	Авротіка	Аврора	Тіра	Панна	Лелека	Одеська 267	Селянка	Вдала	Ніконія
1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
2	1	1	1	1	1	1	0	0	0
3	1	1	1	1	1	1	0	0	0
4	1	1	1	1	1	1	0	0	0
5	1	1	1	1	1	1	0	0	0

Таблиця 16

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Pm8-LRR-L + RLRRrev та ДНК Авротіки, сортів пшениці м’якої

Номер компонента спектру	Генотип								
	Авротіка	Аврора	Тіра	Панна	Лелека	Одеська 267	Селянка	Вдала	Ніконія
1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	1	0	0	0	0	0	0
3	0	1	0	1	1	0	0	0	0
4	0	1	1	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	1	0	0	0	0
6	1	1	1	1	1	1	0	0	0

Таблиця 17

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Pm8-LRR-R +Cre3k3 та ДНК Авротіки, сортів пшениці м’якої

Номер компонента спектру	Генотип								
	Авротіка	Аврора	Тіра	Панна	Лелека	Одеська 267	Селянка	Вдала	Ніконія
1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	1	0	0	0	0	0	0	0
3	0	1	1	1	1	1	0	0	0
4	0	1	1	1	1	1	0	0	0
5	0	1	1	1	1	0	0	0	0
6	0	1	1	1	1	0	0	0	0
7	1	1	1	1	1	1	0	0	0

Таблиця 18

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Cre3k3 + Pm8-MHD-L та ДНК Авротіки, сортів пшениці м’якої

Номер компонента спектру	Генотип								
	Авротіка	Аврора	Тіра	Панна	Лелека	Одеська 267	Селянка	Вдала	Ніконія
1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	1	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	1	0	0	0	0

Таблиця 19

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Cre3LrF +Pm8-MHD-L та ДНК Авротіки, сортів пшениці м’якої

Номер компонента спектру	Генотип								
	Авротіка	Аврора	Тіра	Панна	Лелека	Одеська 267	Селянка	Вдала	Ніконія
1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
2	0	1	0	0	0	0	0	0	0
3	0	1	0	0	0	0	0	0	0
4	0	1	0	1	1	1	0	0	0

Таблиця 20

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів RLRRfor + XLRRrev та ДНК Авротіки, сортів пшениці м’якої

Номер компонента спектру	Генотип								
	Авротіка	Аврора	Тіра	Панна	Лелека	Одеська 267	Селянка	Вдала	Ніконія
1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
2	0	1	1	1	1	0	0	0	0
3	0	1	0	0	0	0	0	0	0
4	0	1	0	0	0	0	0	0	0
5	0	1	1	1	1	1	0	0	0
6	0	1	0	1	0	1	0	0	0
7	0	1	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	1	0	0	0	0
9	0	0	1	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	1	0	0	0	0	0

ДОДАТОК Е
ТАБЛИЦІ З КОМПОНЕНТАМИ ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНИХ СПЕКТРІВ, ОТРИМАНИМИ ЗА МЕТОДИКОЮ RGAP ТА ДНК ГІБРИДІВ, ПРИ СТВОРЕННІ ЯКИХ ЗАЛУЧАЛИ ІНТРОГРЕСИВНІ ЛІНІЇ-ПОХІДНІ АМФІДИПЛОЇДІВ

Таблиця 1

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Pm2-3-L + Pm2-4-L та ДНК груп, окремих гібридів

№ з/п	Генотип	Номер компонента спектру													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	група res для Аврозису	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1
2	група sus для Аврозису	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
3	303/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	306/14	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
5	309/15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	309/6	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
7	310/10	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
8	310/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	група res для Авродесу	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
10	група sus для Авродесу	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
11	781/1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1
12	783/13	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
13	784/14	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	784/4	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	785/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	789/9	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
17	група res для Авролати	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
18	група sus для Авролати	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1
19	792/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	793/15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	798/8	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1

Таблиця 2

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Cre3LrF + XLRRrev та ДНК груп, окремих гібридів

№ з/п	Генотип	Номер компонента спектру					
		1	2	3	4	5	6
1	група res для Аврозису	1	1	1	1	1	1
2	група sus для Аврозису	1	1	1	1	1	0
3	303/11	0	0	0	1	1	1
4	306/14	1	1	1	1	0	1
5	309/15	1	1	1	1	1	0
6	309/6	1	1	1	1	1	0
7	310/10	0	0	0	1	1	1
8	310/8	0	0	0	0	0	0
9	група res для Авродесу	0	0	0	0	0	0
10	група sus для Авродесу	1	1	1	1	0	0
11	781/1	1	1	1	1	0	0
12	783/13	0	0	0	0	0	1
13	784/14	0	0	0	0	0	1
14	784/4	0	0	0	0	0	0
15	785/5	0	0	0	0	0	0
16	789/9	0	0	0	0	0	0
17	група res для Аврола ти	1	1	1	1	1	0
18	група sus для Аврола ти	0	0	1	1	1	0
19	792/13	0	0	0	0	0	0
20	793/15	0	0	0	0	0	0
21	798/8	1	1	1	1	0	0

Таблиця 3

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів RLLrev + XLRRrev та ДНК груп, окремих гібридів

№ з/п	Генотип	Номер компонента спектру										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	стійка група для Аврозису	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	чутлива група для Аврозису	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
3	303/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	306/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
5	309/15	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1
6	309/6	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
7	310/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	310/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	стійка група для Авродесу	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	чутлива група для Авродесу	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1
11	781/1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
12	783/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	784/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	784/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	785/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	789/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	стійка група для Авролати	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
18	чутлива група для Авролати	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
19	792/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	793/15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	798/8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Таблиця 4

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Cre3LrF + Cre3_P-loop та ДНК груп, окремих гібридів

№ з/п	Генотип	Номер компонента спектру						
		1	2	3	4	5	6	7
1	стійка група для Аврозису	0	0	0	1	1	1	0
2	чутлива група для Аврозису	0	0	0	1	1	1	0
3	303/11	0	0	0	0	0	0	0
4	306/14	0	0	0	1	1	1	0
5	309/15	1	1	1	1	1	1	1
6	309/6	0	0	0	1	1	1	0
7	310/10	0	0	0	0	0	0	0
8	310/8	0	0	0	0	0	0	0
9	стійка група для Авродесу	0	0	0	0	0	0	0
10	чутлива група для Авродесу	0	0	0	0	0	0	0
11	781/1	0	0	0	1	1	1	0
12	783/13	0	0	0	0	0	0	0
13	784/14	0	0	0	0	0	0	0
14	784/4	0	0	0	0	0	0	0
15	785/5	0	0	0	0	0	0	0
16	789/9	0	0	0	0	0	0	0
17	стійка група для Авролати	0	0	0	0	0	0	0
18	чутлива група для Авролати	0	0	0	0	0	0	0
19	792/13	0	0	0	0	0	0	0
20	793/15	0	0	0	0	0	0	0
21	798/8	0	0	0	0	0	0	0

Таблиця 5

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів RLRRrev + Cre3_P-loop та ДНК груп, окремих гібридів

№ з/п	Генотип	Номер компонента спектру						
		1	2	3	4	5	6	7
1	стійка група для Аврозису	0	0	0	0	0	0	0
2	чутлива група для Аврозису	0	0	1	0	0	0	0
3	303/11	0	0	0	0	0	0	0
4	306/14	1	1	1	0	1	1	1
5	309/15	0	0	1	0	0	0	1
6	309/6	0	0	1	0	0	0	1
7	310/10	0	0	0	0	0	0	0
8	310/8	0	0	0	0	0	0	0
9	стійка група для Авродесу	0	0	0	0	0	0	0
10	чутлива група для Авродесу	0	0	0	0	0	0	0
11	781/1	0	0	1	1	0	0	0
12	783/13	0	0	0	0	0	0	0
13	784/14	0	0	0	0	0	0	0
14	784/4	0	0	0	0	0	0	0
15	785/5	0	0	0	0	0	0	0
16	789/9	0	0	0	0	0	0	0
17	стійка група для Авролати	0	0	0	0	0	0	0
18	чутлива група для Авролати	0	0	0	0	0	0	0
19	792/13	0	0	0	0	0	0	0
20	793/15	0	0	0	0	0	0	0
21	798/8	0	0	0	0	0	0	0

Таблиця 6

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Pm8-LRR-L + Pm8-MHD-L та ДНК груп, окремих гібридів

№ з/п	Генотип	Номер компонента спектру		
		1	2	3
1	стійка група для Аврозису	0	0	0
2	чутлива група для Аврозису	0	1	1
3	303/11	0	0	0
4	306/14	0	1	1
5	309/15	0	1	1
6	309/6	0	1	0
7	310/10	0	0	0
8	310/8	0	0	0
9	стійка група для Авродесу	0	0	0
10	чутлива група для Авродесу	1	1	1
11	781/1	1	1	0
12	783/13	0	0	0
13	784/14	0	1	0
14	784/4	0	0	0
15	785/5	0	1	0
16	789/9	0	0	0
17	група res для Аврола ти	0	1	0
18	група sus для Аврола ти	0	1	1
19	792/13	0	0	0
20	793/15	0	0	0
21	798/8	0	1	0

Таблиця 7

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Pm8-LRR-L + XLRRrev та ДНК груп, окремих гібридів

№ з/п	Генотип	Номер компонента спектру								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	стійка група для Аврозису	1	1	1	0	0	0	1	0	0
2	чутлива група для Аврозису	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	303/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	306/14	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	309/15	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	309/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	310/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	310/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	стійка група для Авродесу	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	чутлива група для Авродесу	1	1	1	0	0	0	0	0	0
11	781/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	783/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	784/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	784/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	785/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	789/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	група res для Авролати	1	1	1	1	0	1	1	0	0
18	група sus для Авролати	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	792/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	793/15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	798/8	1	1	1	1	0	1	1	1	1

Таблиця 8

Нумерація компонентів електрофоретичного спектру, отриманого з комбінацією праймерів Cre3k3 + Cre3_P-loop та ДНК груп, окремих гібридів

№ з/п	Генотип	Номер компонента спектру		
		1	2	3
1	стійка група для Аврозису	0	1	0
2	чутлива група для Аврозису	0	1	0
3	303/11	0	0	0
4	306/14	0	1	0
5	309/15	0	1	0
6	309/6	0	1	0
7	310/10	0	0	0
8	310/8	0	0	0
9	стійка група для Авродесу	0	0	0
10	чутлива група для Авродесу	0	1	0
11	781/1	0	1	0
12	783/13	0	0	0
13	784/14	0	1	0
14	784/4	0	0	0
15	785/5	0	1	0
16	789/9	0	0	0
17	стійка група для Авролати	1	1	0
18	чутлива група для Авролати	0	1	1
19	792/13	0	1	0
20	793/15	0	0	0
21	798/8	0	0	1

ДОДАТОК Є

КІЛЬКОСТІ МІКРОЯДЕР У ТЕТРАДАХ ГІБРИДІВ F_1 ТА МЕЙОТИЧНИЙ ІНДЕКС

№ з/п	Гібриди F_1	Мейотичний індекс, %	Кількості мікроядер						
			0	1	2	3	4	5	>5
1	401*	84,76	89	13	2	1	0	0	0
2	402	91,55	466	36	7	0	0	0	0
3	403	80,44	473	100	13	2	0	0	0
4	404	97,57	321	7	1	0	0	0	0
5	405	84,76	89	13	2	1	0	0	0
6	406	91,55	466	36	7	0	0	0	0
7	407	78,76	293	59	19	0	1	0	0
8	408	94,55	52	2	1	0	0	0	0
9	409	92,54	62	3	2	0	0	0	0
10	418/1	67,05	59	23	6	0	0	0	0
11	419/1	74,47	35	9	3	0	0	0	0
12	421/1	80,65	300	59	12	1	0	0	0
13	424/1	62,20	181	93	17	0	0	0	0
14	425/1	80,41	197	44	4	0	0	0	0
15	426/1	100,00	6	0	0	0	0	0	0
16	427	43,50	241	218	83	11	1	0	0
17	428/1	97,22	70	2	0	0	0	0	0
18	429	97,58	363	8	1	0	0	0	0
19	430	94,91	261	14	0	0	0	0	0
20	431	71,17	232	76	18	0	0	0	0
21	432/1	75,45	83	24	3	0	0	0	0
22	435/1	99,50	199	1	0	0	0	0	0
23	436/1	77,68	87	19	4	2	0	0	0
24	437/1	71,59	63	23	1	1	0	0	0
25	438	97,96	624	11	2	0	0	0	0
26	439/2	100,00	301	0	0	0	0	0	0
27	441/1	96,12	297	12	0	0	0	0	0
28	442/1	82,49	311	53	13	0	0	0	0
29	444/1	88,89	8	1	0	0	0	0	0
30	446/1	43,60	92	83	25	9	1	1	0
31	447/1	56,61	304	194	37	1	1	0	0
32	448/1	45,52	61	50	22	1	0	0	0

Продовження додатку Є

33	449/1	76,32	29	8	1	0	0	0	0
34	450/2	50,57	89	77	10	0	0	0	0
35	451/1	45,50	86	75	24	3	1	0	0
36	454/1	70,19	252	88	18	1	0	0	0
37	456/1	79,87	127	29	2	1	0	0	0
38	457/1	95,33	143	6	0	1	0	0	0
39	458/1	96,97	192	6	0	0	0	0	0
40	459/1	88,98	226	21	7	0	0	0	0
41	461/1	100,00	16	0	0	0	0	0	0
42	462/1	92,75	64	4	1	0	0	0	0
43	465/1	81,32	74	10	5	1	1	0	0
44	466/1	69,39	272	83	29	6	2	0	0
45	467/1	55,88	19	10	4	1	0	0	0
46	469/1	75,00	6	1	1	0	0	0	0
47	471/1	78,19	294	70	11	1	0	0	0
48	472/2	91,52	561	41	10	1	0	0	0
49	473	91,83	731	52	11	1	1	0	0
50	474/1	90,11	237	20	6	0	0	0	0
51	475/1	70,34	268	89	20	4	0	0	0
52	476/1	89,47	459	42	11	1	0	0	0
53	479/1	73,22	309	98	15	0	0	0	0
54	481/1	74,60	47	12	3	1	0	0	0
55	482/1	94,70	125	7	0	0	0	0	0
56	483/1	87,26	137	15	4	1	0	0	0
57	484	89,39	337	36	4	0	0	0	0
58	485	76,60	216	58	8	0	0	0	0
59	486	94,37	67	3	1	0	0	0	0
60	487	85,37	70	9	3	0	0	0	0
61	488	78,14	679	165	23	2	0	0	0
62	489/2	100,00	12	0	0	0	0	0	0
63	490/1	86,54	90	12	2	0	0	0	0
64	491/1	86,67	91	12	2	0	0	0	0
65	492	67,35	66	25	6	1	0	0	0
66	493/1	85,23	225	30	7	2	0	0	0
67	494/1	74,36	232	66	13	1	0	0	0
68	496	80,82	118	21	5	2	0	0	0
69	497	87,76	215	22	7	1	0	0	0

Продовження додатку Є

70	498/1	93,94	93	6	0	0	0	0	0
71	499/1	92,86	26	2	0	0	0	0	0
72	501/1	100,00	12	0	0	0	0	0	0
73	502/1	92,94	250	15	3	1	0	0	0
74	503	78,82	852	189	38	1	0	0	1
75	505	96,38	666	19	6	0	0	0	0
76	506	96,41	349	11	1	1	0	0	0
77	507	81,22	692	120	34	6	0	0	0
78	508	59,06	277	137	47	8	0	0	0
79	509/1	41,43	29	28	12	1	0	0	0
80	513	92,71	267	17	4	0	0	0	0
81	514/1	49,27	169	113	45	14	2	0	0
82	516/1	50,99	180	113	46	10	4	0	0
83	519	71,12	463	128	44	12	3	0	1
84	521/1	70,97	22	6	3	0	0	0	0
85	523/1	85,19	46	5	1	2	0	0	0
86	524	84,71	532	79	16	1	0	0	0
87	525	94,15	563	28	7	0	0	0	0
88	526	93,96	684	39	3	2	0	0	0
89	528/1	96,98	481	14	1	0	0	0	0
90	529	96,88	248	7	1	0	0	0	0
91	530/1	100,00	122	0	0	0	0	0	0
92	531/1.3	88,78	87	8	3	0	0	0	0
93	532/1	91,18	31	3	0	0	0	0	0
94	534/1	93,16	177	9	4	0	0	0	0
95	535/1	100,00	101	0	0	0	0	0	0
96	536/1	95,45	189	9	0	0	0	0	0
97	537/1	85,60	315	46	7	0	0	0	0
98	538	92,98	159	10	2	0	0	0	0

* Примітка. Для номерів гібридів, записаних без скісної лінії, кількості мікроядер об’єднані для декількох рослин. Перевірку на однорідність проводили за допомогою критерію Колмогорова-Смірнова.

ДОДАТОК Ж

ЕМПІРИЧНІ ЗНАЧЕННЯ КРИТЕРІЮ КОЛМОГОРОВА-СМІРНОВА, ОТРИМАНІ ПРИ ПОРІВНЯННІ ГІБРИДІВ, ОТРИМАНИХ ЗА УЧАСТІ НІКОНІЇ

Таблиця 1

Генотипи	484	485	486	487	488	489/2	490/1	491/1	492	493/1	494/1	496	497	498/1
483/1	0,22	1,07	0,50	0,14	1,05	0,43	0,10	0,10	1,55	0,20	1,32	0,56	0,05	0,52
484	-	1,63	0,38	0,33	1,82	0,36	0,26	0,25	1,94	0,52	1,96	0,88	0,27	0,40
485	-	-	1,34	0,70	0,22	0,79	0,87	0,88	0,79	1,01	0,27	0,41	1,28	1,48
486	-	-	-	0,56	1,31	0,18	0,51	0,50	1,73	0,68	1,52	0,94	0,49	0,09
487	-	-	-	-	0,63	0,47	0,12	0,12	1,20	0,06	0,89	0,33	0,19	0,57
488	-	-	-	-	-	0,75	0,81	0,83	1,01	1,01	0,57	0,30	1,33	1,49
489/2	-	-	-	-	-	-	0,44	0,44	1,07	0,50	0,87	0,64	0,41	0,20
490/1	-	-	-	-	-	-	-	0,01	1,36	0,13	1,08	0,45	0,11	0,53
491/1	-	-	-	-	-	-	-	-	1,38	0,13	1,09	0,46	0,12	0,52
492	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,51	0,61	1,03	1,71	1,87
493/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,30	0,43	0,28	0,74
494/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,64	1,57	1,70
496	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,66	1,01
497	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,52

Продовження додатку Ж

Генотип	499/1	501/1	502/1	503	505	506	507	508	509/1	513	514/1	516/1	519	521/1
483/1	0,27	0,43	0,57	0,99	1,03	0,96	0,70	3,06	3,19	0,55	3,94	3,78	1,82	0,83
484	0,18	0,36	0,44	1,77	1,09	0,95	1,32	4,38	3,69	0,42	5,38	5,18	2,82	0,99
485	0,82	0,79	1,92	0,33	2,80	2,49	0,67	2,33	2,63	1,92	3,40	3,21	0,89	0,36
486	0,07	0,18	0,11	1,27	0,16	0,16	1,06	2,77	3,14	0,13	3,46	3,33	1,86	1,09
487	0,34	0,47	0,60	0,57	0,94	0,90	0,36	2,20	2,70	0,59	2,94	2,80	1,22	0,68
488	0,77	0,75	2,12	0,18	3,58	2,92	0,64	3,33	2,95	2,14	4,53	4,30	1,35	0,39
489/2	0,21	0,00	0,24	0,73	0,12	0,12	0,65	1,40	1,87	0,25	1,73	1,67	0,99	0,85
490/1	0,30	0,44	0,55	0,75	0,94	0,89	0,51	2,54	2,92	0,54	3,33	3,19	1,46	0,76
491/1	0,29	0,44	0,54	0,77	0,93	0,88	0,53	2,56	2,93	0,53	3,35	3,21	1,48	0,77
492	1,19	1,07	2,17	1,09	2,69	2,55	1,30	0,75	1,66	2,17	1,58	1,43	0,35	0,18
493/1	0,38	0,50	0,89	0,93	1,54	1,38	0,57	3,40	3,26	0,88	4,39	4,21	1,93	0,75
494/1	0,94	0,87	2,23	0,69	3,23	2,85	1,04	2,09	2,49	2,25	3,21	3,01	0,69	0,28
496	0,58	0,64	1,18	0,23	1,71	1,59	0,07	2,30	2,71	1,17	3,19	3,03	1,06	0,50
497	0,26	0,41	0,59	1,26	1,16	1,05	0,90	3,64	3,42	0,57	4,60	4,42	2,22	0,88
498/1	0,05	0,20	0,13	1,44	0,23	0,22	1,20	3,15	3,36	0,12	3,92	3,78	2,12	1,12
499/1	-	0,21	0,07	0,73	0,18	0,18	0,61	1,74	2,30	0,07	2,22	2,13	1,13	0,84
501/1	-	-	0,24	0,73	0,12	0,12	0,65	1,40	1,87	0,25	1,73	1,67	0,99	0,85
502/1	-	-	-	2,07	0,48	0,43	1,68	4,43	3,84	0,04	5,36	5,18	3,01	1,16
503	-	-	-	-	3,61	2,90	0,52	3,57	3,03	2,10	4,77	4,54	1,55	0,43
505	-	-	-	-	-	0,05	2,96	6,24	4,38	0,52	7,13	6,94	4,62	1,38
506	-	-	-	-	-	-	2,42	5,34	4,21	0,47	6,26	6,07	3,86	1,36

Продовження додатку Ж

507	-	-		-	-	-		3,85	3,20	1,69	5,00	4,78	1,94	0,56
508	-	-	-	-	-	-	-	-	1,38	4,49	1,38	1,15	1,99	0,64
509/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,85	0,60	0,73	2,36	1,37
513	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,43	5,25	3,05	1,15
514/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,23	3,27	1,16
516/1	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	3,05	1,07
519	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,13

Продовження додатку Ж

Генотип	523/1	524	525	526	528/1	529	530/1	531/1.3	532/1	534/1	535/1	536/1	537/1	538
483/1	0,19	0,29	0,77	0,76	0,73	0,95	1,06	0,12	0,21	0,55	1,00	0,77	0,17	0,52
484	0,31	0,72	0,72	0,72	1,11	0,92	1,02	0,18	0,10	0,42	0,95	0,69	0,52	0,39
485	0,58	1,13	2,43	2,48	2,73	2,35	2,16	1,04	0,80	1,76	2,02	2,03	1,14	1,69
486	0,51	0,77	0,02	0,06	0,21	0,19	0,38	0,36	0,15	0,09	0,36	0,10	0,68	0,10
487	0,21	0,08	0,75	0,74	0,97	0,91	1,02	0,23	0,28	0,59	0,98	0,77	0,14	0,57
488	0,50	1,26	3,01	3,15	3,35	2,64	2,26	1,00	0,75	1,88	2,08	2,20	1,20	1,77
489/2	0,46	0,52	0,20	0,21	0,10	0,11	0,00	0,37	0,26	0,23	0,00	0,15	0,49	0,23
490/1	0,22	0,17	0,72	0,71	0,97	0,89	1,01	0,16	0,23	0,54	0,96	0,74	0,08	0,52
491/1	0,22	0,19	0,71	0,70	0,96	0,88	1,00	0,15	0,23	0,53	0,96	0,73	0,10	0,51
492	1,05	1,60	2,46	2,47	2,68	2,49	2,41	1,50	1,20	2,08	2,30	2,28	1,61	2,02
493/1	0,20	0,10	1,21	1,21	1,54	1,33	1,35	0,30	0,33	0,83	1,26	1,09	0,19	0,79
494/1	0,73	1,49	2,83	2,90	3,13	2,67	2,40	1,24	0,93	2,04	2,24	2,32	1,46	1,96
496	0,27	0,42	1,44	1,45	1,72	1,55	1,56	0,61	0,54	1,12	1,48	1,34	0,49	1,08
497	0,22	0,40	0,84	0,84	1,18	1,02	1,11	0,09	0,19	0,56	1,04	0,81	0,26	0,52
498/1	0,52	0,85	0,11	0,06	0,28	0,25	0,45	0,36	0,14	0,17	0,43	0,12	0,74	0,09
499/1	0,33	0,42	0,07	0,06	0,21	0,20	0,34	0,19	0,07	0,10	0,33	0,13	0,37	0,06
501/1	0,46	0,52	0,20	0,21	0,10	0,11	0,00	0,37	0,26	0,23	0,00	0,15	0,49	0,23
502/1	0,52	1,13	0,16	0,14	0,53	0,45	0,65	0,35	0,10	0,07	0,61	0,27	0,91	0,04
503	0,46	1,18	3,01	3,16	3,35	2,60	2,22	0,94	0,71	1,82	2,04	2,15	1,12	1,72
505	0,79	2,12	0,40	0,46	0,11	0,07	0,37	0,70	0,30	0,39	0,34	0,12	1,67	0,40
506	0,77	1,77	0,34	0,38	0,08	0,06	0,34	0,67	0,29	0,36	0,32	0,11	1,46	0,37

Продовження додатку Ж

507	0,28	0,66	2,42	2,52	2,79	2,20	1,94	0,71	0,57	1,49	1,78	1,80	0,70	1,40
508	1,82	4,20	5,69	5,89	5,89	4,87	4,03	2,68	1,81	3,96	3,73	4,29	3,81	3,80
509/1	2,42	3,44	4,17	4,20	4,35	4,11	3,91	3,03	2,38	3,70	3,77	3,89	3,39	3,63
513	0,51	1,12	0,20	0,18	0,58	0,49	0,68	0,34	0,08	0,08	0,63	0,30	0,90	0,03
514/1	2,45	5,28	6,63	6,82	6,79	5,76	4,81	3,45	2,33	4,85	4,48	5,17	4,84	4,67
516/1	2,34	5,07	6,43	6,62	6,60	5,59	4,67	3,31	2,24	4,69	4,34	5,01	4,65	4,51
519	0,99	2,43	4,07	4,23	4,34	3,49	2,93	1,63	1,14	2,67	2,70	3,00	2,22	2,54
521/1	0,63	0,75	1,26	1,25	1,40	1,36	1,44	0,86	0,81	1,15	1,41	1,27	0,78	1,13
523/1	-	0,25	0,63	0,62	0,82	0,78	0,91	0,22	0,27	0,52	0,88	0,67	0,25	0,50
524	-	-	1,65	1,70	2,04	1,64	1,55	0,37	0,37	1,02	1,43	1,32	0,13	0,96
525	-	-	-	0,09	0,47	0,37	0,59	0,49	0,17	0,12	0,54	0,16	1,29	0,13
526	-	-	-	-	0,52	0,40	0,62	0,48	0,16	0,17	0,57	0,19	1,31	0,11
528/1	-	-	-	-	-	0,02	0,30	0,74	0,33	0,45	0,28	0,18	1,65	0,45
529	-	-	-	-	-	-	0,28	0,68	0,31	0,39	0,27	0,15	1,39	0,39
530/1	-	-	-	-	-	-	-	0,83	0,45	0,59	0,00	0,39	1,38	0,59
531/1.3	-	-	-	-	-	-	-	-	0,15	0,35	0,79	0,54	0,28	0,33
532/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,11	0,45	0,23	0,31	0,10
534/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,56	0,23	0,85	0,09
535/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,37	1,28	0,56
536/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,12	0,24
537/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,80

ДОДАТОК З
ПОКАЗНИКИ, ВИКОРИСТАНІ ПРИ РОЗРАХУНКУ ЕМПІРИЧНИХ ЗНАЧЕНЬ z

Гібрид	Кількість МКП	Мейотичний індекс (частка)	Біноміальна похибка частки
Гібриди, об'єднані за сортом Одеська267			
427	554	0,435	0,021
428/1	72	0,972	0,019
429	372	0,976	0,008
430	275	0,949	0,013
435/1	200	0,995	0,005
436/1	112	0,777	0,472
437/1	88	0,716	0,048
438	637	0,980	0,006
439/2	301	1,000	0,000
441/1	309	0,961	0,010991
Гібриди, об'єднані за сортом Тіра			
466/1	392	0,694	0,023
467/1	34	0,559	0,085
471/1	376	0,782	0,021
472/2	613	0,915	0,011
473	796	0,918	0,010
474/1	263	0,901	0,018
475/1	381	0,703	0,023
476/1	513	0,895	0,014
479/1	422	0,732	0,022
481/1	63	0,746	1,829
482/1	132	0,947	0,020
Гібриди, об'єднані за сортом Ніконія			
488	869	0,781	0,014
492	98	0,673	0,047
494	312	0,744	0,025
497	245	0,878	0,021
498/1	99	0,939	0,024
502/1	269	0,929	0,016
503	1081	0,788	0,012

Продовження додатку З

505	691	0,964	0,007
506	362	0,964	0,010
507	852	0,812	0,013
508	469	0,591	0,023
509/1	70	0,414	0,059
513	288	0,927	0,015
514/1	343	0,493	0,027
516/1	353	0,510	0,027
519	651	0,711	0,018
523/1	54	0,852	0,048
524	628	0,847	0,014
525	598	0,941	0,010
526	728	0,940	0,009
528/1	496	0,970	0,008
529	256	0,969	0,011
530/1	122	1,000	0,000
531/1	98	0,888	0,032
532/1	34	0,912	0,049
534/1	190	0,932	0,018
535/1	101	1,000	0,000
536/1	198	0,955	0,015
537/1	368	0,856	0,018
538	171	0,930	0,020

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 12:03:13 19.06.2025

Назва файлу з підписом: Plyhun_dis_18_06_2025.pdf.asice
Розмір файлу з підписом: 4.9 МБ

Перевірені файли:
Назва файлу без підпису: Plyhun_dis_18_06_2025.pdf
Розмір файлу без підпису: 6.1 МБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: ПЛИГУН ВІКТОРІЯ ВОЛОДИМИРІВНА
П.І.Б.: ПЛИГУН ВІКТОРІЯ ВОЛОДИМИРІВНА
Країна: Україна
РНОКПП: 3585602600
Організація (установа): ФІЗИЧНА ОСОБА
Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 12:03:09 19.06.2025
Сертифікат виданий: КНЕДП АЦСК АТ КБ "ПРИВАТБАНК"
Серійний номер: 5E984D526F82F38F04000000CE1EE70001036606
Алгоритм підпису: ДСТУ 4145
Тип підпису: Удосконалений
Тип контейнера: Підпис та дані в архіві (розширений) (ASiC-E)
Формат підпису: З повними даними для перевірки (XAdES-B-LT)
Сертифікат: Кваліфікований

Версія від: 2025.02.05 13:00