

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНІВ β -ТУБУЛІНУ *PRUNUS PERSICA* ТА *PRUNUS DULCIS* ДЛЯ ФІНГЕРПРИНТИНГУ ЇХ МІЖВИДОВИХ ГІБРИДІВ

Ю.В. ЛИХОЛАТ¹, А.М. РАБОКОНЬ², Р.Я. БЛЮМ², Н.О. ХРОМИХ¹, О.О. ДІДУР¹,
В.Г. САХАРОВА², А.М. КАБАР¹, Я.В. ПІРКО², Я.Б. БЛЮМ²

¹ Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, пр. Гагаріна, 72, 49010, Дніпро, Україна

² Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України, вул. Осиповського, 2а, 04123, Київ, Україна

E-mail: didur@ua.fm; cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net; blume.rostislav@gmail.com

*Персик (Prunus persica (L.) Batsch) є однією з важливих плодкових культур, обсяги вирощування якої у зоні помірного клімату посідають третє місце серед плодкових дерев. Однак поширення даної культури у зонах з менш сприятливим кліматом потребує створення нових генотипів шляхом внутрішньовидової та міжвидової гібридизації, в тому числі й з мигдалем. Ефективне використання гібридів та їх подальша селекція, вимагають швидкого та надійного методу для молекулярно-генетичного профілювання з метою розрізнення близькоспорідених форм та детекції міжвидових гібридів. Одним з таких підходів є метод оцінки поліморфізму довжини інтронів β -тубуліну (ТВР-аналіз), який базується на оцінці поліморфізму довжини інтронів β -тубуліну. Однак, правильна інтерпретація результатів такого аналізу повинна спиратися на дані наявного різноманіття генів β -тубуліну в геномах аналізованих видів. Саме тому нами було здійснено повногеномний пошук, ідентифікацію та аналіз філогенії та синтенії генів β -тубуліну *P. persica* та *P. dulcis*, а на основі отриманих даних проведено генотипування міжвидових та внутрішньовидових гібридних форм персику та мигдалю за допомогою ТВР-аналізу. Загалом у геномі *P. persica* виявлено 11 генів β -тубуліну, а у геномі *P. dulcis* – 10 генів, враховуючи псевдогени. Подальший філогенетичний аналіз та синтенія дозволили виявити ортологи ідентифікованих генів у геномах *Arabidopsis thaliana* та *A. lyrata* і віднести їх до конкретних ізотипів. Використання ТВР-методу дало можливість отримати ДНК-профілі 11 зразків, серед яких 8 генотипів були гібридними формами. На основі отриманих даних було здійснено кластерний аналіз, результати якого добре корелюють із селекційною історією ана-*

лізованих генотипів персику та його гібридів, що додатково підтверджує ефективність та точність використаного методу генетичного профілювання.

Ключові слова: персик, мигдаль, міжвидові гібриди, генотипування, поліморфізм довжини інтронів, гени тубуліну, стійкість до патогенів.

Вступ. Персик (*Prunus persica* (L.) Batsch) походить з Китаю, де він був одомашнений 4000–5000 років тому, а пізніше поширився по всьому світу. На наш час персик вважається важливою сільськогосподарською культурою в усьому світі та посідає третє місце за величиною плантацій, зайнятих плодovими видами дерев помірного клімату, поступаючись лише яблуні та груші. У 2014 р. світове виробництво персику та нектарину становило приблизно 22,8 млн. т (Thurrow et al, 2017). Однак, кісточкові види роду *Prunus* сприйнятливі до грибкових захворювань, які можуть знижувати врожайність плодів майже на 30 % (Dag et al, 2017; Lykholat et al, 2021) та недостатньо ефективно усуваються хімічними засобами. Натомість уже стало очевидним, що інтенсивне використання антибактеріальних та протигрибкових препаратів різко підвищило стійкість мікробів (Zacchino et al, 2017). Одним із шляхів вирішення цієї проблеми може бути селекційне створення генотипів плодovих рослин, що мають підвищену стійкість до патогенів, однак такий шлях потребує вивчення генетичних особливостей батьківських і гібридних форм рослинних організмів. Степова зона України характеризується обмеженим видовим

© Ю.В. ЛИХОЛАТ, А.М. РАБОКОНЬ, Р.Я. БЛЮМ,
Н.О. ХРОМИХ, О.О. ДІДУР, В.Г. САХАРОВА,
А.М. КАБАР, Я.В. ПІРКО, Я.Б. БЛЮМ, 2022

складом та недостатнім поширенням автохтонних або інтродукованих плодкових рослин (Khromykh et al, 2018a). Одна з причин полягає в особливостях степового клімату, континентальні риси якого ускладнюють поширення важливих для людини плодкових рослин з інших географічних регіонів (Khromykh et al, 2018b). Загалом, перспективи плідництва у степовій зоні вимагають створення сортів, здатних забезпечити стабільну врожайність якісної плодової продукції та низьку чутливість до патогенів за умов посилення аридності клімату.

Для генотипування рослин досить широко використовують молекулярно-генетичні маркери, зокрема, ДНК-маркери, яких на сьогодні існує значна кількість. Наразі персик є одним з найкраще вивчених видів, з генетичної точки зору, серед кісточкових плодкових культур родини *Rosaceae* (Jung and Main, 2014). Також, для персику та його близького родича, мигдаля, наявні повногеномні сиквенси, що суттєво спрощує дослідження, пов'язані з аналізом генів чи окремих некодуєчих послідовностей (Verde et al, 2017; Alioto et al, 2020). За допомогою аналізу мікросателітних локусів (SSR-аналіз) було проведено широкомасштабні дослідження з генетичної різноманітності сортів персику, побудовано детальні молекулярно-генетичні карти цієї культури (Aranzana et al, 2002). У той же час постійно продовжуються пошуки нових, більш ефективних і зручних маркерних систем для проведення молекулярно-генетичного аналізу. Одна з таких систем побудована на основі поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну (ТВР-аналіз, Tubulin Based Polymorphism). На цей час вже розроблено декілька варіантів цього методу аналізу ДНК у рослин (Bardini et al, 2004; Breviario et al, 2007; Pirko et al, 2016; Rabokon et al, 2018). Експериментально доведено, що такий метод дозволяє генотипувати та диференціювати різні генотипи, сорти, популяції та види рослин, зокрема складні поліплоїдні види (Braglia et al, 2020; 2021; Guadalupi et al, 2022).

Коректна інтерпретація результатів такого молекулярно-генетичного профілювання за допомогою ТВР-методу вимагає розуміння різноманіття наборів генів β -тубуліну в аналізованих видів, а також ряду аспектів їх еволю-

ційної історії. Варто зазначити, що тубуліни є ключовими білками апарату клітинного поділу еукаріотів (входять до складу мікротрубочок як універсальні білкові компоненти) (Blume, 2019). Наявність декількох паралогічних копій генів β -тубуліну у одного з аналізованих видів може призвести до неправильної інтерпретації при порівнянні з видами, у яких ці гени не є дуплікованими. Також, це може стати значною проблемою при аналізі видів з різною плоїдністю або міжвидових гібридів. З іншого боку, у більшості подібних досліджень не було приділено значної уваги визначенню приналежності ідентифікованих тубулінів до певного ізо типу, що суттєво обмежує можливість встановлення функціональної ролі конкретного ізо типу тубуліну (відсутні дані про ортологію β -тубулінів). Недостатнє вивчення еволюційного контексту варіації їхньої копійності у різних видів значною мірою звужує розуміння причин виникнення такої широкої панелі цих генів. Встановлення типу гомологічних зв'язків генів є важливим не лише для їх правильної номенклатури, а й для вивчення їх еволюційної історії та субфункціоналізації паралогів, онологів чи гомеологів у складних поліплоїдних видів (Gasarov et al, 2021).

Саме тому метою цієї роботи було здійснити повногеномний пошук, ідентифікацію та аналіз філогенії та синтенії генів β -тубуліна персику (*P. persica*) та мигдаля (*P. dulcis*), а також на основі отриманих даних здійснити молекулярно-генетичне профілювання міжвидових та внутрішньовидових гібридних форм персику та мигдаля за допомогою методу оцінки поліморфізму довжини інтронів β -тубуліну.

Матеріали та методи. Рослинний матеріал. Для даного дослідження рослинний матеріал представників роду *Prunus* L. було отримано з колекції Ботанічного саду ДНУ імені Олесея Гончара (Дніпро). Ґрунти ділянок, де вирощувались плодіві дерева, представлені поверхнево-трансформованими ґрунтами – урбоборноземами, згідно класифікації ґрунтів урбанізованих територій (Didur et al, 2019, Khokhryakova, 2020). Будова профілю досліджених урбоборноземів має вигляд Н(у) [0–22 см] – Нр(у) [22–47 см] – Ph(k) [47–68 см] – Рк [глибше 68 см]. Крім вихідного матеріалу –

персика (*P. persica*) та мигдаля (*P. dulcis*) — для молекулярно-генетичного аналізу були використані їхні гібриди, створені авторами.

Форма F_2 1-1-1 походить від гібридної форми F_1 324-87 (*P. persica* subsp. *nectarina* (Ait.) Shof. \times *Prunus kansuensis* Rehder) і відзначається комплексною стійкістю до поширених патогенних захворювань.

Форма 1-2-5 походить від гібридної форми F_1 1004-88 (*P. persica* subsp. *nectarina* \times *Prunus davidiana* Carr.) \times *P. persica* subsp. *erythrocarpa* V.A. Zaiats), яка слабо уражається курчавістю листя, моніліозом, клястероспоріозом, борошнистою россою.

Форма 2-02-4 походить від гібридної форми F_1 1004-88 (*P. persica* subsp. *nectarina* \times *P. davidiana*.) \times *P. persica* subsp. *erythrocarpa*), що має комплексну стійкість до найбільш поширених патогенів.

Форма F_2 1-1-30 походить від вільного запилення гібридної форми F_2 , отриманої шляхом вільного запилення від селекційного гібриду F_1 631-89 (*P. dulcis* \times *P. persica* subsp. *nectarina*), що слабо уражається курчавістю листя, моніліозом, клястероспоріозом, борошнистою россою.

Форма F_4 1-4-8 походить від вільного запилення гібридної форми F_3 1-1-37 (вільнозапилена F_2 3-9-58 (F_1 623-89 (*P. persica* subsp. *nectarina* лінія 244-81 \times *P. dulcis*) \times F_1 623-89 (*P. persica* subsp. *nectarina* лінія 244-81 \times *P. dulcis*)), яка має ранні строки цвітіння та великі квітки.

Форма F_3 1-4-6 походить від вільного запилення гібридної форми F_2 (1-1-13), отриманої від селекційного гібриду F_1 631-89 (*P. dulcis* \times *P. persica* subsp. *nectarina*), яка має високі декоративні якості.

Форма F_3 1-4-11 походить від вільного запилення гібридної форми F_2 (1-1-4), отриманої від селекційного гібриду F_1 631-89 (*P. dulcis* \times *P. persica* subsp. *nectarina*), яка має високі декоративні якості.

Форма F_2 1-1-4 походить від вільного запилення гібридної форми F_1 631-89 (*P. dulcis* \times *P. persica* subsp. *nectarina*), яка утворює кореневу поросль з подальшим формуванням нової крони.

Власне вихідним матеріалом для отримання ДНК слугували термінальні бруньки із фрагментами пагонів рослин персику сорту Red Heaven, мигдалю (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb),

представленого двома зразками, та восьми внутрішньовидових і міжвидових гібридних форм, описаних вище.

*Пошук та ідентифікація генів β -тубуліну *P. persica* та *P. dulcis*.* Первинний пошук генів тубуліну у геномах *P. persica* та *P. dulcis* було здійснено у базі даних KEGG Genome (<https://www.genome.jp/kegg/genome/>). Також для підтвердження результатів пошуку додатково були ідентифіковані гени тубуліну у геномах *P. persica* та *P. dulcis* за допомогою алгоритму TBLASTN для пошуку у базі даних транскрибованих нуклеотидів NCBI (Gertz, 2006; Altschul, 1990). Для запитів було використано білкові послідовності β -тубулінів *Arabidopsis thaliana*: TUB1-9 (Swarbreck, 2008). Використовували наступні параметри: граничне значення E — $1e^{-5}$, матриця порівняння BLOSUM62 (Henikoff, 1992; Altschul, 1993) довжина слова — 3. Короткі та незначущі співпадіння з референтними послідовностями були відкинуті і надалі не використовувались. Пошук та ідентифікацію генів β -тубулінів здійснювали виключно для збірок геномів *Prunus persica* NCBIv2 (GCA_000346465.2) та *ALMONDv2* (GCA_902201215.1) (Verde et al, 2017, Alioto et al, 2020).

Вивчення екзон-інтронної структури генів β -тубуліну та їх номенклатура. Надалі інформацію про знайдені гени *P. persica* та *P. dulcis*, включаючи їх розташування, ідентифікатор послідовності, геномну послідовність, послідовність білка та кодуєчу послідовність (CDS), було отримано з бази даних NCBI. Приналежність того чи іншого гена тубуліну *P. persica* чи *P. dulcis* до певного ізотипу було встановлено при множинному вирівнюванні пептидів, транскрибованих з кодуєчої частини гена, за допомогою алгоритму MUSCLE (Edgar, 2004). Нумерацію для ізотипів β -тубулінів було збережено у відповідності до їх розташування на хромосомах у вихідному геномі. Аналіз та візуалізацію екзон-інтронної структури генів тубуліну здійснювали за допомогою серверу відображення структури генів Gene Structure Display Server (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>, Hu, 2015).

*Філогенетичний аналіз β -тубуліну *P. persica* та *P. dulcis*.* Для філогенетичного аналізу β -тубуліну персику та мигдалю були використані білкові послідовності, транскрибовані з кодуєчої частини ідентифікованих генів β -тубуліну.

Також до аналізу були залучені послідовності β -тубулінів інших видів квіткових рослин. Зокрема, білкові послідовності дводольних *Arabidopsis thaliana* – AtTUB1 (NP_177706), AtTUB2/3 (NP_568959), AtTUB4 (NP_199247), AtTUB5 (NP_564101), AtTUB6 (NP_196786), AtTUB7 (NP_180515), AtTUB8 (NP_568437), AtTUB9 (NP_193821); *A. lyrata* – AtTUB (D7LH43); *Medicago truncatula* (XP_013457308.1, XP_003631111.1, XP_003630513.1, XP_003604818.1, XP_003604816.1, XP_003624926.1, XP_003603765.1, XP_003594596.1, XP_003592284.1); *Zinnia elegans* – ZeTUB1 (BAA82637), ZeTUB2 (BAA82638); *Eucalyptus grandis* – EgTUB1 (EF534219), EgTUB2 (EF534220), EgTUB3 (EF534221), EgTUB4 (EF534222), EgTUB5 (EF534223); *Lycopersicon esculentum* LeTUB1 (BT013153), LeTUB2 (BT014148), LeTUB3 (BT012803), LeTUB4 (DQ205342), LeTUB5 (BT013893), LeTUB6 (BT013141); *Solanum tuberosum* – StTUB1 (CAA83847), StTUB2 (CAA83853), StTUB3 (ABA46773), StTUB4 (ABA81852). В якості референсних білкових послідовностей однодольних було обрано послідовності β -тубуліну *Zea mays* – ZmTUB1 (P18025), ZmTUB2 (P18026), ZmTUB3 (Q43695), ZmTUB4 (Q41782), ZmTUB5 (Q43697), ZmTUB6 (Q41783), ZmTUB7 (Q4178), ZmTUB8 (Q4178); *Oryza sativa* – OsTUB1 (Q43594), OsTUB2 (Q8H7U1), OsTUB3 (Q40665), OsTUB4 (BAV39951), OsTUB5 (P46265), OsTUB6 (Q76FS3), OsTUB7 (P37832), OsTUB8 (Q76FS2). Як аутгрупу було використано послідовність β -тубуліну ChlR_TUB1/2 (P04690.1) *Chlamydomonas reinhardtii*, за якою дерево і було вкорінене.

Вирівнювання білкових послідовностей проведено за допомогою алгоритму MUSCLE (Edgar, 2004) в програмному забезпеченні MEGA-X (Kumar, 2018), вирівнювання були відредаговані з метою видалення значних прогалів, що могли негативно вплинути на якість подальшого аналізу. Також було підбрано найбільш оптимальну модель для реконструкції філогенії аналізованих тубулінів для методу найбільшої правдоподібності (ML – Maximum Likelihood). Як найоптимальнішу модель обрано JTT – Jones-Taylor-Thornton: для неї було отримано найбільш оптимальні значення *lnL* та BIC. Філогенетичні дерева сконструйовані також з використанням програмного забезпечення MEGA-X. Деревя були

побудовані за допомогою методу Maximum Likelihood за моделлю JTT+G+I з бустреп-підтримкою в 1000 ітерацій. Ідентифікація приналежності різних ізотипів β -тубуліну здійснена на основі раніше опублікованих даних (Rao, 2016, Gavazzi et al, 2017).

Аналіз синтенії генів β -тубуліну. З метою виявлення пар потенційно ортологічних генів було проведено аналіз синтенії генів *P. persica* та *P. dulcis* з геномами модельних організмів *A. thaliana* та *A. lyrata*. Для здійснення аналізу синтенії було використано останні геномні збірки *A. thaliana* (GCA_000001735.2) та *A. lyrata* (GCA_000004255.1), доступні у базі даних NCBI. Даний аналіз проведено за допомогою алгоритму MCSanX (Wang, 2012), інтегрованого у програмне забезпечення TTools v1.0971 (Chen, 2020). Аналіз базувався на тотальному порівнянні нуклеотидних послідовностей усіх транскриптів аналізованих видів за допомогою алгоритму MCSanX, який процесував результати вирівнювання алгоритмом BLAST з такими параметрами: граничне значення E – $1e^{-10}$, кількість влучень та кількість найкращих вирівнювань – 5. Результати даного аналізу дозволили виявити пари потенційно ортологічних генів з найвищим рівнем подібності нуклеотидних послідовностей. Результати були візуалізовані у вигляді діаграми, на якій «нитками» поєднувались пари хромосомних локусів гомологічних генів. Гени інтересу та їх пари були виділені окремими кольорами на діаграмі.

Виділення ДНК, ПЛР та обробка даних ТВР-аналізу. Загальну ДНК з рослинних зразків виділяли за допомогою методу з використанням цетилтриметиламоній-бромідного буферу. Концентрацію та чистоту отриманої ДНК перевіряли за допомогою біофотометру «Eppendorf» (США) та електрофорезу в 1,5%-вому агарозному гелі. Зразки ДНК зберігали за температури -20 °C. Генетичне профілювання рослин роду *Prunus* здійснювали за допомогою ТВР-методу, методики проведення якого, зокрема умови ПЛР, були описані нами раніше (Rabokon et al, 2018, Blume et al, 2020). Для дослідження варібельності інтронів генів β -тубуліну були використані вироджені праймери, що фланкують перший інтрон (Breviario, 2007). Продукти ПЛР розділяли за допомогою електрофорезу в 6%-вому поліакрил-

амідному гелі за неденатуруючих умов (Rabokon et al, 2018); фрагменти ДНК було візуалізовано шляхом фарбування нітратом срібла (Benbouza, 2006).

Цифрові зображення гелів аналізували з використанням програмного забезпечення Gel Analyzer program (<http://www.gelanalyzer.com/>). Розмір смужок на електрофореграмі визначали шляхом порівняння з ДНК-маркером (O'Gene Ruler TM 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; «Fermentas», Литва). Стандартну генетичну дистанцію Нея та коефіцієнт подібності Нея та Лі (Nei, 1972, Nei and Li, 1979) між генотипами визначали за наявністю/відсутністю ампліфікованих фрагментів у аналізованих зразках за допомогою програми FreeTree (Pavlicek, 1999). Значення подібності були використані для реконструкції філогенетичних зв'язків між аналізованими генотипами за допомогою методу UPGMA з використанням того ж програмного забезпечення. Для оцінки достовірності гілок побудованих дерев проведено бутстреп (bootstrap) аналіз (1000 повторів). Отримані дендрограми були візуалізовані за допомогою програми FigTree.

Очікувані довжини ампліконів першого інтрону для генів β-тубуліну, ідентифікованих у референтному геномі, були визначені за допомогою методики e-PCR у програмному забезпеченні TVtools v1.0971. Для цього повні геномні послідовності ідентифікованих генів β-тубуліну *P. persica* та *P. dulcis* вирівнювали з

послідовностями вироджених праймерів та, залежно від місця посадки праймера, розраховували очікувану довжину ампліфікованої ділянки.

Результати та обговорення. За результатами повногеномного пошуку було ідентифіковано 11-ть генів β-тубуліну у геномі *P. persica* (табл. 1), з яких 3 були псевдогенами, а 8 – функціональними генами. Також виявлено 10-ть генів β-тубуліну у геномі *P. dulcis* (табл. 2), серед яких лише 1 виявився псевдогеном, а усі інші гени кодували повноцінний білковий продукт. Псевдогени *PpTUB1p*, *PpTUB2p*, *PpTUB8p* виявилися експресованими псевдогенами, в той час який єдиний псевдоген мигдалю *PdTUB1p* був неекспресованим. Порівняння кодуючих частин цих псевдогенів не дозволило віднести їх до конкретного ізотипу β-тубуліну, оскільки їх послідовності були надмірно порушені.

Значна частина ідентифікованих генів кодувала суттєво відмінні β-тубуліни від їх гомологів у геномі *A. thaliana*, через що ідентифікація приналежності виявлених генів до конкретного ізотипу була значно ускладненою. Довжина кодованих білків варіювала в межах 444–450 а.з., найчастіше за рахунок амінокислотних замінів у С-кінцевому хвості, який є варіабельною ділянкою β-тубулінів. Ідентифіковані гени *PdTUB8-1* та *PdTUB8-2* визначено як паралоги, через те, що вони не лише кодували ідентичні білкові продукти, а й не виявляли варіації у їхній геномній організації,

Таблиця 1. Гени β-тубуліну, ідентифіковані в геномі *P. persica*

Назва гена	Ізотип (за ортологією з <i>A. thaliana</i>)	ID гена (NCBI)	ID білка (NCBI)	Локалізація на хромосомі (у п.н.)
<i>PpTUB1p</i>	ND	18789245	XP_007224615	G1:2836434-2836838
<i>PpTUB1</i>	TUB1/5	18789474	XP_007222097	G1:33516727-33519805
<i>PpTUB2p</i>	ND	109947300	—	G2:10055372-10056681
<i>PpTUB2</i>	TUB8	18786648	XP_007218003	G2:28644699-28647263
<i>PpTUB3</i>	TUB4/9	18780159	XP_007211629	G4:4791798-4794318
<i>PpTUB4</i>	ND	18776927	XP_007211186	G5:10772762-10775559
<i>PpTUB5</i>	ND	18777417	XP_007209134	G5:17707527-17710219
<i>PpTUB6</i>	TUB7	18771939	XP_020423113	G6:4478696-4499436
<i>PpTUB7</i>	TUB7	18772621	XP_007205196	G6:25583447-25585611
<i>PpTUB8p</i>	ND	109950315	XP_020424458	G7:3784445-3788044
<i>PpTUB8</i>	ND	18769827	XP_020423871	G7:5283478-5287391

й при цьому розташовувалися у спільному локусі на 7-й хромосомі *P. dulcis*. Сімейство генів β-тубуліну в геномах *P. persica* та *P. dulcis* є доволі невеликим та типовим для диплоїдних організмів, наприклад, *A. thaliana* містить у своєму геномі лише 9 таких генів. В той же час у поліплоїдних організмів гени підродини β-тубулінів можуть бути представлені набагато більшим числом копій, через подвоєння чи потроєння в результаті повногеномних дуплікацій або міжвидових схрещувань, що призвели до збільшення плоїдності. Наприклад у льону (*Linum usitatissimum*) їх число сягає 13–14 (Pydiuga et al, 2019; Gavazzi et al, 2017), у верби (*Salix arbutifolia*) – 18 генів (Rao, 2016), тощо.

Також було проаналізовано екзон-інтронну структуру ідентифікованих функціональних генів β-тубуліну *P. persica* та *P. dulcis* (рис. 1). До цього аналізу псевдогени не були залучені. Інтрон-екзонна структура генів β-тубуліну є дуже консервативною і, зазвичай, екзони представлені в кількості 3-х, а інтрони, відповідно, – 2-х. Дана особливість цих генів зберігається незалежно від їх приналежності до певного ізотипового класу. Наразі відомо лише два винятки з цього загального правила – це гени курудзи та рису (*ZmTUB1* та *OsTUB2*), в яких є втраченим другий інтрон, і екзони 2 та 3, відповідно, об'єднані (Bardini, 2004; Breviario, 2007). Ідентифіковані гени β-тубуліну *P. persica* та *P. dulcis* не були винятком і, відповідно, усі виявлені гени характеризувалися надзвичайно консервативною екзон-інтронною структу-

рою, маючи по 3 екзони. Варіація довжини генів було обумовлена переважно зміною довжини інтронів, хоча у деяких випадках, як, наприклад, *PdTUB8-1* та *PdTUB8-2*, довжина інтронів взагалі не змінювалася.

На наступному етапі нами було проведено філогенетичний аналіз білкових послідовностей ідентифікованих β-тубулінів персику та мигдалю. Філогенетичне дерево, побудоване за допомогою методу найбільшої правдоподібності (ML), представлено на рис. 2. Загалом до аналізу було залучено 70 білкових послідовностей, у фінальному наборі даних проаналізовано 446 амінокислотних позицій. Початкове дерево для аналізу конструювали за методом Neighborhood Joining. На рис. 2 представлено дерево з найвищою логарифмічною правдоподібністю ($\ln L = -5345,42$).

З побудованого дерева чітко видно, що деякі з білків *P. persica* та *P. dulcis* розташувалися зі своїми гомологами (або ж потенційними ортологами) своїх ізотипів з *A. thaliana*. Зокрема, білки PpTUB7 та PdTUB7 утворили спільну кладу з AtTUB7 з високою достовірністю такою топології, в той час як PpTUB6 та PdTUB6 були розташовані у сестринській кладі до даної групи. Подібний розподіл свідчить на користь приналежності ідентифікованих білків до ізотипу TUB7 та вказує на можливе спільне еволюційне походження генів цих білків. Аналогічно, білки PpTUB2 та PdTUB2 утворюють спільну кладу з AtTUB8 та одним з тубулінів *M. truncatula*. Так само, білки Pd-

Таблиця 2. Гени β-тубуліну, ідентифіковані в геномі *P. dulcis*

Назва гена	Ізотип (за ортологією з <i>A. thaliana</i>)	ID гена (NCBI)	ID білка (NCBI)	Локалізація на хромосомі (у п.н.)
<i>PdTUB1</i>	TUB1/5	117616554	XP_034201794	1:30045924-30049014
<i>PdTUB1p</i>	ND	117618042	—	2:7964265-7964804
<i>PdTUB2</i>	TUB8	117617609	XP_034202945	2:24445078-24447728
<i>PdTUB3</i>	TUB4/9	117624182	XP_034211216	4:5004454-5006633
<i>PdTUB4</i>	ND	117626892	XP_034214576	5:17513631-17516066
<i>PdTUB5</i>	ND	117626995	XP_034214748	5:9801156-9803721
<i>PdTUB6</i>	TUB7	117629810	XP_034218316	6:4593686-4596090
<i>PdTUB7</i>	TUB7	117629989	XP_034218571	6:24405126-24407295
<i>PdTUB8-1</i>	ND	117634628	XP_034224702	7:4568272-4572167
<i>PdTUB8-2</i>	ND	117634642	XP_034224716	7:4590353-4594205

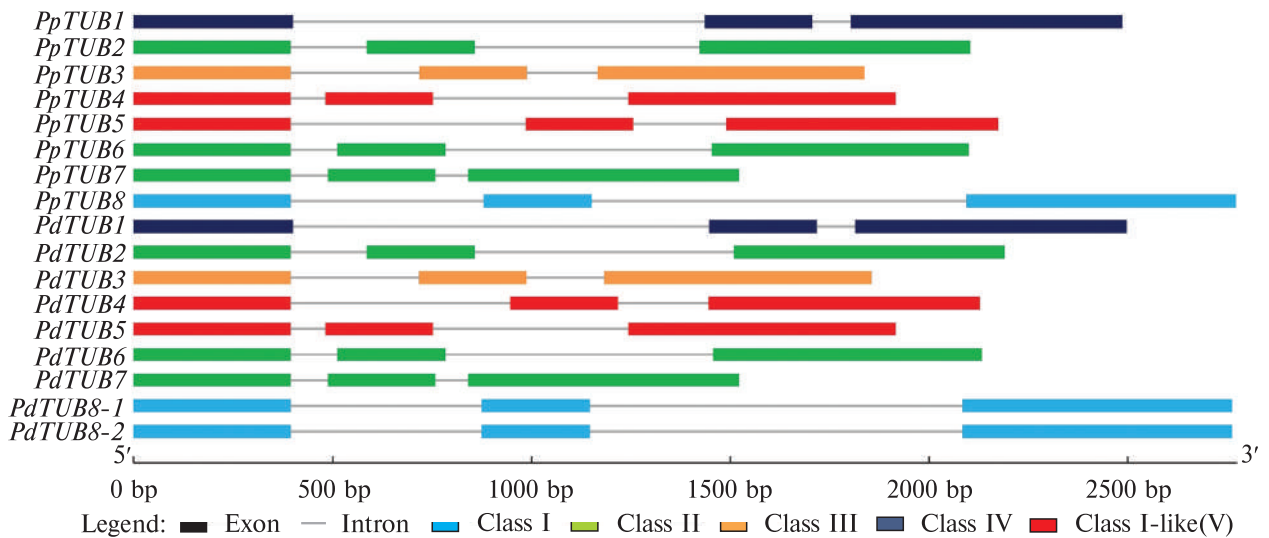


Рис. 1. Екзон-інтронна структура ідентифікованих генів β -тубуліну *P. persica* та *P. dulcis*

TUB8-1, PdTUB8-2 та PpTUB8 формують окрему кладу, до якої базальним виявився білок AtTUB6, однак значення бутстреп-підтримки було недостатнім для підтвердження описаної топології гілок. Гілки інших тубулінів були розташовані більш віддалено у порівнянні зі своїми гомологами з геному *A. thaliana*. Варто також зазначити, що білок ATUB *A. lyrata*, для якого не встановлено ізотип та не виявлено ортолога у геномі *A. thaliana*, віднесений до класу III в якості базального представника для AtTUB4/9.

У випадку PpTUB4 та PdTUB5, а також PpTUB5 та PdTUB4, дані білки сформували окрему гілку, до якої не входило жодного ізотипу β -тубулінів *A. thaliana*, через що їх ізотипову приналежність було неможливо встановити. Дані білки віднесені до окремої групи, яка часто обговорюється як гілка спеціалізованих представників класу I (клас I-подібні) (Rao, 2016, Gavazzi, 2017) або ж виділяється як окремий тип β -тубулінових ізотипів – клас V (Radchuk, 2008). Дану групу часто розглядають як спеціалізований тип β -тубулінів, характерний для деревних рослин та луб'яних культур. У ряді досліджень було показано, що представники цієї групи є високоспеціалізованими ізотипами, які переважно експресуються у механічних тканинах рослин (Rao, 2016). Зокрема до цієї групи відноситься представлений на рис.

2 β -тубулін евкаліпту – EgTUB1 (Spokevicius, 2007) та не залучені до аналізу LusTUB2 та ряд білків бавовника (Oakley et al, 2007, Radchuk, 2008, Gavazzi, 2017). До цього класу також входять β -тубуліни деревних видів *Populus* (Oakley et al, 2007) та *Salix* (Rao et al, 2016), які не були включені до даного філогенетичного дерева. Як і в попередніх дослідженнях інших авторів (Gavazzi, 2017) нами було також підтверджено приналежність двох β -тубулінів *M. truncatula* (XP_003631111.1, XP_003630513.1) до даної групи. Філогенетичне положення та еволюційна історія даних β -тубулінів є наразі невідомими і потребує подальшого вивчення із залученням інших підходів.

В усіх випадках β -тубуліни дводольних групуються в окремі гілки від білків однодольних. В ряді випадків β -тубуліни дводольних (наприклад, в межах класу II) були представлені як поліфілетична група. Усі класи β -тубулінів були визначені як монофілетичні групи. Варто зазначити, що цей клас найбільш широко представлений різними ізотипами, а також має велику кількість високоподібних білків, що могло вплинути на топологію отриманого дерева. Частина гілок мала низькі значення бутстреп-підтримки, через що не можна однозначно стверджувати про остаточність топології таких гілок. При цьому, варто зазначити, що через високу консервативність білкових

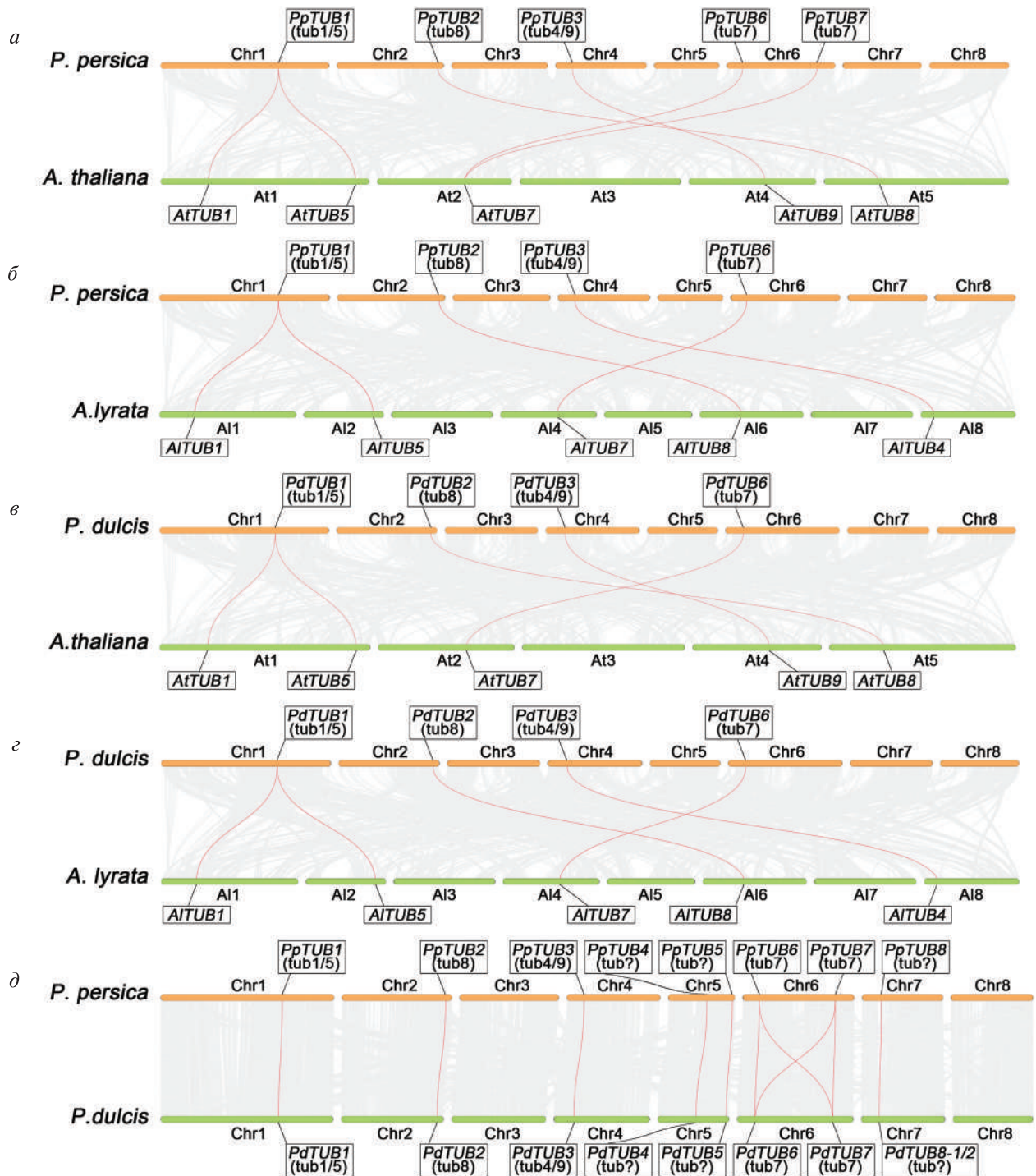


Рис. 3. Синтенія між геномами різних видів: (а) – *P. persica* та *A. thaliana*; (б) – *P. persica* та *A. lyrata*; (в) – *P. dulcis* та *A. thaliana*; (г) – *P. dulcis* та *A. lyrata*; (д) – *P. persica* та *P. dulcis*. Червоними нитками відображені зв'язки між ортологічними генами β-тубуліну

послідовностей тубулінів доволі важко здійснювати філогенетичний аналіз з точним розділенням ізотипів на класи (Radchuk, 2008, Gavazzi, 2017), особливо за допомогою методу ML. Зокрема проаналізована панель тубулінів вирізнялася високим відсотком еволюційно неваріабельних сайтів (I) – 35,2 %, що добре корелює з високою консервативністю цих білків. Достовірним можна вважати розподіл гілок β -тубулінових ізотипів, котрі належать до класу I та класу II. Виокремлення гілки білків класу III підтверджувалося лише в 43 % реконструйованих дерев, в той час як гілки класу IV та класу I-подібних (V) білків мали набагато нижчі значення бутстреп-підтримки (25 та 28 %). Іншими авторами також було відзначено подібну проблему з нижчою достовірністю гілок цих класів (Gavazzi, 2017). Зокрема, при аналізі подібного набору білкових послідовностей (звісно, без послідовностей *P. persica* та *P. dulcis*), але з включенням до вибірки β -тубулінів ячменю та ряду поліплоїдних видів (*Populus trichocarpa* та *Gossypium hirsutum*) спостерігалось виділення класу I-подібних (V) білків з 3 % бутстреп-підтримкою, а класу III – з 34 %, однак у цьому випадку гілка класу IV мала достовірність у 91 % (Gavazzi, 2017). В ряді інших робіт дерева були сконструйовані іншими методами, без відображення значень бутстреп-підтримки, через що неможливо встановити достовірність їх окремих гілок (Radchuk, 2008, Rao, 2016).

Кількість локусів генів тубуліну є різною серед різних видів квіткових рослин, тому дуже важко точно виявити ортологічні зв'язки між ними. Зокрема, результати ряду останніх досліджень дозволили охарактеризувати різноманіття генів тубуліну у льону (Pydiura et al, 2019, Gavazzi et al, 2017), маніоку (Li et al, 2021), бавовни (Chen et al, 2021), верби (Rao et al, 2016). Вважається, що ізоформи β -тубуліну, котрі походять зі спільного класу, виникли в результаті повногеномної або локальної дуплікації, а отже мають паралогічну або онологічну природу, однак наразі це не підтверджено остаточно (Gavazzi et al, 2017). Цікавим є те, що один з базальних представників царства Рослин – *C. reinhardtii* має у своєму геномі лише 2 ізоформи α - та 2 ізоформи β -тубуліну, що значною мірою може свідчити, що наявне різноманіття ізо-

типів тубулінів у квіткових рослин стало результатом дуплікаційних процесів, які відбувалися неодноразово та призводили до розширення набору генів тубуліну та їх подальшої специфікації (Gavazzi et al, 2017, Findeisen, 2014). Подібність послідовностей β -тубуліну та їх функціональних властивостей не дозволяють зробити остаточних висновків щодо конкретної функції їх окремих ізотипів (Breviario, 2013). В той же час для β -тубулінів існує більше відомостей щодо їх функціональної ролі, що, зокрема, дозволяє ширше використовувати їх гени як мішені або маркери у молекулярно-генетичних дослідженнях (Yemets et al, 2008). Показано участь β -тубулінів у регуляції розвитку пилку та у виникненні цитоплазматичної стерильності (Zhang, 2009), а також продемонстровано роль у формуванні бар'єру для міжродового схрещування *Pyrus-Malus* (Morimoto et al, 2020). Послідовності β -тубулінів *P. dulcis* (syn=*Prunus amygdalus*) раніше були частково охарактеризовані (Stöcker et al, 1993).

На наступному етапі було досліджено синтени зв'язки між геномами *P. persica* та *P. dulcis* і *A. thaliana* та *A. lyrata* (рис. 3). Всі ідентифіковані гени в геномах *P. persica* та *P. dulcis* майже не мають більше одного поєднання з потенційними ортологами у геномах *A. thaliana* та *A. lyrata*, що може свідчити про практичну відсутність дуплікацій більшості генів β -тубуліну у представників *Prunus*, у порівнянні з геномами згаданих вище Хрестоцвітих. Винятком є гени *PpTUB6* та *PpTUB7*, для яких ортологічним слід вважати ген *AtTUB7*. Однак, для геному *P. dulcis* таке поєднання має лише ген *PdTUB6*. Це вказує на те, що *PdTUB7* зазнав певних еволюційних змін, котрі не дозволяють ідентифікувати його як ортолога для *AtTUB7*.

При повногеномному порівнянні також виявлено поєднання генів *PpTUB1* та *PdTUB1* з генами *AtTUB1* та *AtTUB5*, а також з *AITUB1* та *AITUB5*. Окрім ортологічних зв'язків, таке поєднання може вказувати на те, що відносно спільного предка гени *AtTUB1* та *AtTUB5* (та *AITUB1* та *AITUB5*) зазнали дуплікації, котра призвела до виникнення двох окремих ізотипів у арабідопсису, однак така дуплікація не мала місця при еволюції представників *Prunus*. Відповідно, гени *PpTUB1* та *PdTUB1* є ортологічними до попередника ізоформу tub1/5 (за номенклату-

рою генів у *A. thaliana*. Так само, гени *PpTUB3* та *PdTUB3* у різних випадках утворювали синтенні пари з генами *AtTUB9* та *AtTUB4*, що вказує на приналежність ідентифікованих генів до таких, котрі кодують ізотип tub4/9. Гени *PpTUB2* та *PdTUB2* виявилися ортологічними до генів *AtTUB8* та *AtTUB8* і були віднесені до ізотипу tub8. Для інших ідентифікованих генів β -тубуліну встановити ортологи у геномах *A. thaliana* та *A. lyrata* виявилось неможливим. Аналіз синтенії підтвердив паралогічну природу *PdTUB8-1* та *PdTUB8-2*, а також виявив поєднання між усіма чотирма генами *PpTUB6*, *PpTUB7* та *PdTUB6*, *PdTUB7*, що свідчить про виникнення цих генів у результаті дуплікаційного процесу або локального, або повногеномного характеру та, відповідно, ці гени слід вважати паралогами або онологами в межах своїх геномів.

Також було здійснено обрахунок потенційних довжин ампліконів 1-го інтрону ідентифікованих генів β -тубуліну (табл. 3). Очікувані довжини ампліконів генів *PpTUB2*, *PpTUB6*, *PpTUB7*, *PpTUB4* та *PdTUB2*, *PdTUB6*, *PdTUB7*, *PdTUB5* є ідентичними в обох видів та становлять 378, 353 та 347 п.н. Відповідно амплікони 1-го інтрону цих генів не можуть бути використані при розрізненні двох аналізованих видів або їх гібридів, оскільки не мають достатньої дискримінаційної здатності. Амплікони генів *PpTUB3* та *PdTUB3* (583 та 582 п.н., відповідно), мають незначні відмінності у довжині, які може бути важко ідентифікувати. В той же час фрагменти, ампліфіковані з генів *PpTUB8* та *PdTUB8-1/2*, мають довжину 746 та 741 п.н. та можуть бути використані при аналізі *P. persica* та *P. dulcis* і їх гібридів. Амплікони *PpTUB5* та *PdTUB4* мали довжину 851 та 812 п.н., а амплікони *PpTUB1* та *PdTUB1* – 1295 та 1306 п.н. Саме ці фрагменти характеризуються найбільш чіткою різницею у довжині та можуть бути ефективно використані для генотипування.

Загалом, результати ТВР-аналізу зразків ДНК рослин роду *Prunus* L. вказують на те, що всі досліджені зразки є досить спорідненими, що свідчить про наявність спільних для всіх зразків ампліфікованих фрагментів ДНК (рис. 4). Результати електрофоретичного розділення отриманих в ході ПЛР фрагментів ДНК (тобто ділянок 1-го інтрону β -тубуліну) свід-

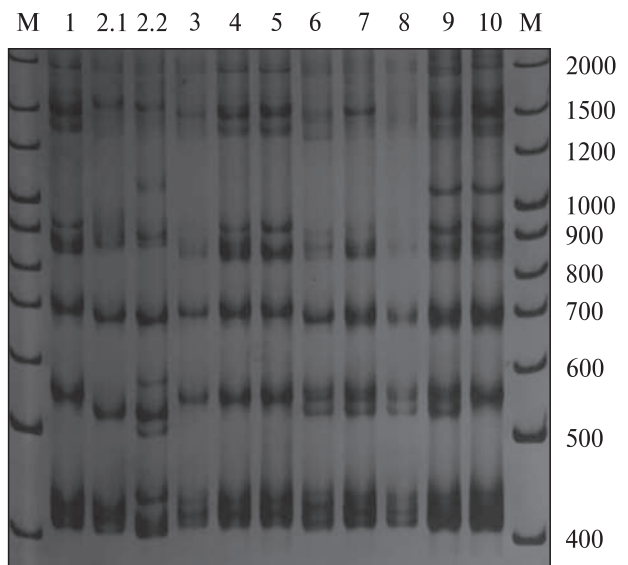


Рис. 4. Електрофореграма ампліфікованих ділянок ДНК, отриманих за допомогою методу ТВР для *P. persica* та *P. dulcis* та їх міжвидових гібридів, де 1–10 – номери зразків: 1 – вихідний генотип *P. persica*; 2.1 та 2.2 – вихідний генотип *P. dulcis*; 3 – Форма F_2 1-1-1; 4 – Форма 1-2-5; 5 – Форма 2-02-4; 6 – Форма F_2 1-1-30; 7 – Форма F_4 1-4-8; 8 – Форма F_3 1-4-6; 9 – Форма F_3 1-4-11; 10 – Форма F_2 1-1-4; М – ДНК-маркер

чать про наявність 15 чітких і відтворюваних фрагментів різних довжин в діапазоні від 400 до 1500 п.н. Всі фрагменти ДНК, детектовані на

Таблиця 3. Очікувані довжини ампліконів 1-го інтрону ідентифікованих ортологічних генів β -тубуліну *P. persica* та *P. dulcis*

Довжина амплікону (п.н.)	Вихідний ген	Довжина амплікону (п.н.)	Вихідний ген
<i>P. persica</i>		<i>P. dulcis</i>	
1295	<i>PpTUB1</i>	1306	<i>PdTUB1</i>
851	<i>PpTUB5</i>	812	<i>PdTUB4</i>
746	<i>PpTUB8</i>	741	<i>PdTUB8-1</i>
–	–	741	<i>PdTUB8-2</i>
583	<i>PpTUB3</i>	582	<i>PdTUB3</i>
452	<i>PpTUB2</i>	452	<i>PdTUB2</i>
378	<i>PpTUB6</i>	378	<i>PdTUB6</i>
353	<i>PpTUB7</i>	353	<i>PdTUB7</i>
347	<i>PpTUB4</i>	347	<i>PdTUB5</i>

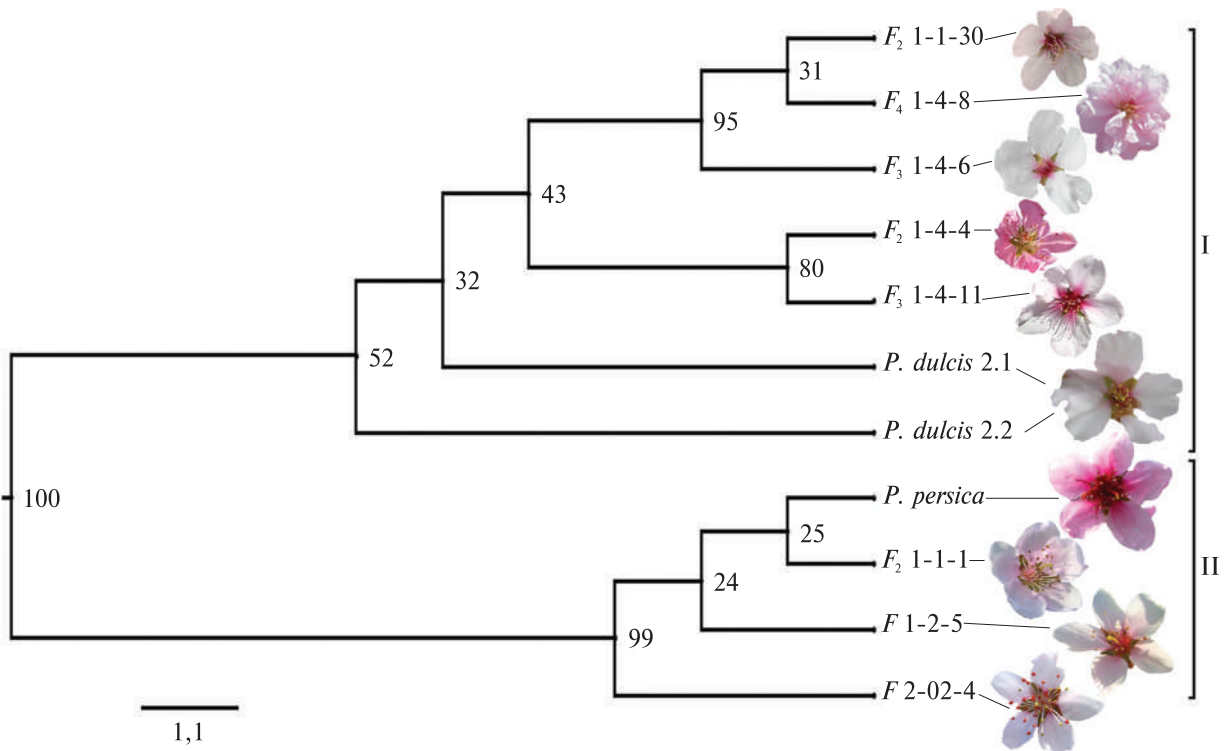


Рис. 5. Дендрограма UPGMA, на основі коефіцієнтів подібності Нея та Лі ТВР-профілів зразків *P. persica* та *P. dulcis* та їх міжвидових гібридних форм. Цифри в основі внутрішніх вузлів відповідають значенням бутстреп-підтримки

електрофореграми, були відтворюваними, тому в подальшому були використані для диференціації зразків. Зразки диференціювали завдяки наявності у них унікальних фрагментів ДНК, характерних для того чи іншого виду. Серед усіх зразків найбільш виокремлюються ДНК-профілі мигдалю (№ 2.1 та № 2.2). До того ж, ці два зразки мигдалю мають схожі, однак не ідентичні ДНК-профілі, що свідчить про те, що вони скоріш за все належать до двох відомих різновидів мигдалю (*P. dulcis* var. *amara* та *P. dulcis* var. *dulcis*).

На основі отриманих даних ТВР-аналізу було обраховано значення коефіцієнтів подібності Нея та Лі, які були використані для реконструкції філогенетичних зв'язків аналізованих генотипів за допомогою методу UPGMA (рис. 5).

З отриманої дендрограми видно, що досліджувані зразки рослин *P. persica* та *P. dulcis* та їх міжвидових гібридних форм розділяються на дві великі групи (I та II). Розділення на дві

групи мало 100 % бутстреп-підтримку. Група I включає зразки мигдалю (2.1 та 2.2) та декількох гібридних форм: гібрид F_2 1-1-30, F_4 1-4-8, F_3 1-4-6, F_2 1-1-4 та F_3 1-4-11. Для даних гібридів однією з батьківських форм є аналізовані зразки *P. dulcis*. Зразки мигдалю 2.1 та 2.2 були розташовані як базальні гілки до гібридних представників Групи I. У випадку реконструкції філогенетичних зв'язків між аналізованими зразками на основі коефіцієнтів Нея та Лі (дані не представлені), генотип мигдалю 2.2 виділявся як базальний до усієї Групи I, генотип 2.1 був базальним представником гілки, котра включала гібриди F_2 1-1-30, F_4 1-4-8, F_3 1-4-6. Однак, такий розподіл мав меншу достовірність, ніж представлений на рис. 5. Усі представники Групи I є міжвидовими гібридами *P. persica* × *dulcis*.

Результати ТВР-аналізу добре корелюють з селекційною історією згаданих міжвидових гібридів. Так, гібриди F_2 1-1-30, F_4 1-4-8, F_3 1-4-6, які мають спільне походження від форми F_1

631-89, виділялися в окрему гілку з 95 % бутстреп-підтримкою. При цьому, варто зазначити, що лінія F_4 1-4-8 два рази була зворотно схрещена на батьківські генотипи, спочатку *P. dulcis*, а в наступному поколінні – з вихідним генотипом персика 244-81. Наряду з цим, генотипи F_2 1-1-4 та F_3 1-4-11, які мають спільну селекційну історію, також виокремлені в незалежну гілку (з 80 % підтримкою) в межах Групи I. Форма F_3 1-4-11 селекційно отримана від генотипу F_2 1-1-4, що було додатково підтверджено за результатами ТВР-аналізу.

Група II, в свою чергу, включала вихідний генотип персика (сорт Red Heaven) та гібридні форми: гібрид 1-2-5, гібрид 2-02-4, та гібрид F_2 1-1-1, які походять від батьківських рослин, що належить до різних підвидів *P. persica*. Виділення даної групи в окрему гілку мало 99 % бутстреп-підтримку. Найбільш близьким до батьківського генотипу виявився гібрид F_2 1-1-1, отриманий в результаті схрещування двох вихідних генотипів *P. persica* subsp. *nectarina* \times *P. kansuensis* (syn = *P. persica*). В свою чергу генотипи 1-2-5 та 2-02-4 мають спільне походження від форми F_1 1004-88, яка була отримана від схрещування трьох різних таксонів – (*P. persica* subsp. *nectarina* \times *P. davidiana* (syn = *P. persica*)) \times *P. persica* subsp. *erythrocarpa*. Низькі значення бутстрепа в деяких вузлах обох груп пояснюються високою подібністю ТВР-профілів між окремими зразками.

Гібриди з групи II, яка має найбільшу генетичну спорідненість з персиком сорту Red Heaven, відзначаються високим рівнем стійкості до патогенів. Зокрема, у попередніх дослідженнях (Khromykh et al, 2020) встановлено достатньо низьку чутливість до клястероспоріозу у гібриду F_2 1-1-1 (перший клас ураженості), гібриду 1-2-5 (перший клас ураженості) та гібриду 2-02-4 (другий клас ураженості) при оцінюванні за п'ятибальною шкалою. Крім того, вказані гібриди здатні плодоносити за нестабільних погодних умов упродовж періоду вегетації та формувати значну плодову масу. Середня вага плодів ($x \pm SD$) становить: $55,5 \pm 4,1$ г (гібрид F_2 1-1-1), $64,1 \pm 3,3$ г (гібрид 1-2-5) та $50,4 \pm 3$ г (гібрид 2-02-4). Отже, гібриди цієї групи можуть бути рекомендовані для використання у селекційній роботі, спрямованій на створення десертних сортів персику і нектарину з ком-

плексною стійкістю до поширених патогенів та здатністю до плодоношення за несприятливих умов степової зони. Наявність даних генотипування згаданих зразків може бути також використане як потужний допоміжний інструмент у подальшій селекції (Thurrow et al, 2017). Раніше також було показано, що гібридні форми (за результатами генетичного профілювання віднесені до Групи I: F_2 1-1-30, F_4 1-4-8, F_3 1-4-6, F_2 1-1-4 та F_3 1-4-11), відзначаються значною посухостійкістю, помірною чутливістю до поширених патогенів та високою декоративністю, особливо у період цвітіння (Khromykh et al, 2020).

Таким чином, встановлено, що у геномі *P. persica* наявні 11 генів β -тубуліну, з яких 3 є псевдогенами, а також виявлено, що у геномі *P. dulcis* міститься 10 генів β -тубуліну, один з яких є неекспресованим псевдогеном. Подальший філогенетичний аналіз та синтенія дозволили виявити у геномах *P. persica* та *P. dulcis* ортологічні гени, до генів *A. thaliana* та *A. lyrata*. Ці гени кодуєть білки, що належать до ізотипів tub1/5 (клас IV), tub4/9 (клас III), tub7 та tub8 (клас II). Для ряду білків з класу I-подібних (V) β -тубулінів (по 2 для *P. persica* та *P. dulcis*) ізотипову приналежність встановити було неможливо. Ідентифікація генів β -тубуліну дозволила предбачити довжини ампліконів 1-го інтрону, характерні для кожного з видів. Використання методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну (ТВР-методу) дало можливість отримати профілі ДНК 11 зразків персику (одного генотипу персику, двох генотипів мигдалю та 8 генотипів гібридних форм персику). Зазначені ТВР-профілі дозволили встановити генетичний зв'язок між дослідженими гібридними формами та їх батьківськими генотипами. Результати аналізу філогенетичних зв'язків аналізованих генотипів добре корелювали з відомою селекційною історією гібридних форм, що додатково підтвердило ефективність використаного методу генетичного профілювання. Також, з'ясовано, що зразки в межах кожної окремої підгрупи (залежно від походження) характеризуються низьким рівнем генетичного різноманіття, обумовленого використанням в селекційному процесі генетично близьких або ідентичних батьківських форм.

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

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Роботу виконано за темою «Біологічно активні речовини малопоширених плодових рослин як ефективні засоби підвищення якості продукції та цінності сировини для функціонального харчування» (№ держреєстрації 0121U109772, 2021–2022 рр.) та «Біоінформаційні та молекулярно-клітинні дослідження структури та функцій цитоскелету рослин» (№ держреєстрації 0120U100937, 2020–2024 рр.).

CHARACTERIZATION OF β -TUBULIN GENES IN *PRUNUS PERSICA* AND *PRUNUS DULCIS* FOR FINGERPRINTING OF THEIR INTERSPECIFIC HYBRIDS

Y.V. Lykholat, A.M. Rabokon, R.Ya. Blume, N.O. Khromykh, O.O. Didur, V.H. Sakharova, A.M. Kabar, Ya.V. Pirko, Ya.B. Blume

Oles Honchar Dnipro National University, Gagarin Ave., 72, Dnipro, 49010, Ukraine
Institute of Food Biotechnology and Genomics of National Academy of Sciences of Ukraine, Osypovskoho st., 2a, 04123, Kyiv, Ukraine

E-mail: didur@ua.fm, cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net; blume.rostislav@gmail.com

Peach is one of the most important fruit crops, cultivation of which held the third largest areas among all fruit crops, grown in temperate climate zone. Cultivation of this crop under less favourable climate conditions would require the creation of new resistant genotypes via the intra- or interspecific hybridization, including crossing with almond. Efficient breeding of hybrids and their long-term selection will require a rapid and accurate method of genetic barcoding that would be able to distinguish closely-related genotypes or to detect interspecific hybrids. One such approaches is TBP-analysis, which is based on the evaluation of intron length polymorphism of β -tubulin genes. However, the correct interpretation of the results of such an analysis should be based on data on the diversity of β -tubulin genes panel in the genomes of the analyzed species. Thus, here we report on the successful whole-genome identification and on comprehensive analysis of the phylogeny and synteny of the β -tubulin genes of *P. persica* and *P. dulcis*, as well as we demonstrate the possibility to use such data of the genomic search for interpretation of data of TBP genotyping of intra- and interspecific hybrids of peach

and almond species. In general, 11 β -tubulin genes were identified within the *P. persica* genome, and 10 genes, in the *P. dulcis* genome, accounting pseudogenes. Additionally, phylogenetic and synteny analyses of the identified genes made it possible to identify the orthologues in the genomes of *A. thaliana* and *A. lyrata*, as well as to designate identified β -tubulins to specific isoforms. Genotyping via the TBP-method allowed obtaining distinct molecular profiles for 11 investigated accessions, among which 8 were intra- or interspecific hybrids. Based on obtained results of genotyping, a cluster analysis was carried out, the results of which correlated well with the breeding history of the analysed genotypes, what additionally confirmed the effectiveness and accuracy of the genotyping approach used.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Alioto T, Alexiou KG, Bardil A et al (2020) Transposons played a major role in the diversification between the closely related almond and peach genomes: results from the almond genome sequence. *Plant J* 101:455–472. <https://doi.org/10.1111/tpj.14538>.
- Altschul SF (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 25(3):403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Altschul SF (1993) A protein alignment scoring system sensitive at all evolutionary distances. *J Mol Evol* 36(3):290–300. <https://doi.org/10.1007/BF00160485>.
- Aranzana MJ, Garcia-Mas J, Carbo J, Arús P (2002). Development and variation analysis of microsatellite markers in peach. *Plant Breed* 121(1):87–92. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2002.00656.x>.
- Bardini M, Lee D, Donini P et al (2004). Tubulin-based polymorphism (TBP): a new tool, based on functionally relevant sequences, to assess genetic diversity in plant species. *Genome* 47(2):281–291. <https://doi.org/10.1139/g03-132>.
- Benbouza H, Jean-Marie J, Jean-Pierre B (2006) Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol Agron Soc Environ* 10:77–81.
- Blume RY, Rabokon AN, Postovitova AS et al (2020) Evaluating diversity and breeding perspectives of Ukrainian spring camelina genotypes. *Cytol Genet* 54(5):420–436. <https://doi.org/10.3103/S0095452720050084>.
- Blume YaB (2019) A journey through plant cytoskeleton: hot spots in signalling and functioning. *Cell Biol Intl* 43:1–5. <https://doi.org/10.1002/cbin.11210>.
- Braglia L, Gavazzi F, Morello L et al (2020) On the applicability of the Tubulin-Based Polymorphism (TBP) genotyping method: a comprehensive guide

- illustrated through the application on different genetic resources in the legume family. *Plant Methods* 16:86. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00627-z>.
- Braglia L, Lauria M, Appenroth KJ et al (2021) Duckweed species genotyping and interspecific hybrid discovery by tubulin-based polymorphism fingerprinting. *Front Plant Sci* 12:625670.
- Breviario D, Baird WV, Sangoi S et al (2007) High polymorphism and resolution in targeted fingerprinting with combined β -tubulin introns. *Mol Breed* 20(3):249–259. <https://doi.org/10.1007/s11032-007-9087-9>.
- Breviario D, Giani S., Morello L (2013) Multiple tubulins: evolutionary aspects and biological implications. *Plant J* 75:202–218. <https://doi.org/10.1111/tbj.12243>.
- Chen B, Zhao J, Fu G et al (2021) Identification and expression analysis of *Tubulin* gene family in upland cotton. *J Cotton Res* 4:20. <https://doi.org/10.1186/s42397-021-00097-1>.
- Chen C, Chen H, Zhang Y et al (2020) TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Mol Plant* 13(8):1194–1202. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.06.009>.
- Dar RA, Rai AN, Shiekh IA (2017) *Stigmia carpophyla* detected on *Prunus americana* and *Prunus persica* in India. *Australasian Plant Disease Notes*, 12:19. <https://doi.org/10.1007/s13314-017-0245-6>.
- Didur O, Kulbachko Y, Ovchynnykova Y et al (2019) Zoogenic mechanisms of ecological rehabilitation of urban soils of the park zone of megapolis: Earthworms and soil buffer capacity. *Environ Res Engineer Management* 75(1):24–33. <https://doi.org/10.5755/j01.erem.75.1.21121>.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucl Acid Res* 32(5):1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.
- Findeisen P, Muhlhausen S, Dempewolf S et al (2014) Six subgroups and extensive recent duplications characterize the evolution of the eukaryotic tubulin protein family. *Genome Biol Evol* 6(9):2274–2288. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu187>.
- Gasarov E, Jędrychowska J, Kuźnicki J, Korzh V (2021) Evolutionary context can clarify gene names: Teleosts as a case study. *BioEssays* 43:e2000258. <https://doi.org/10.1002/bies.202000258>.
- Gavazzi F, Pigna G, Braglia L et al (2017) Evolutionary characterization and transcript profiling of beta-tubulin genes in flax (*Linum usitatissimum* L.) during plant development. *BMC Plant Biol* 17:237. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1186-0>.
- Gertz EM, Yu YK, Agarwala R et al. (2006) Composition-based statistics and translated nucleotide searches: improving the TBLASTN module of BLAST. *BMC Biol* 4:41. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-4-41>.
- Guadalupi C, Braglia L, Gavazzi F et al (2022) A combinatorial Q-locus and tubulin-based polymorphism (TBP) approach helps in discriminating *Triticum* species. *Genes* 13:633. <https://doi.org/10.3390/genes13040633>.
- Henikoff S, Henikoff JG (1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(22):10915–10919. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.22.10915>.
- Hu B (2015) GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics* 31(8):1296–1297. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu817>.
- Jung S, Main D (2014) Genomics and bioinformatics resources for translational science in Rosaceae. *Plant Biotechnol Repts* 8(2):49–64. <https://doi.org/10.1007/s11816-013-0282-3>.
- Khokhryakova A (2020) Classification and characteristic of soils in urban areas (on the example of Odessa city). *Eureka: Life Sci* 5:3–15. <https://doi.org/10.21303/2504-5695.2020.001404>.
- Khromykh NO, Lykholat YV, Anishchenko AA et al (2020) Cuticular wax composition of mature leaves of species and hybrids of the genus *Prunus* differing in resistance to clasterosporium disease. *Bio-systems Diversity* 28(4):370–375. <https://doi.org/10.15421/012047>.
- Khromykh NO, Lykholat YV, Kovalenko IM et al (2018a) Variability of the antioxidant properties of *Berberis* fruits depending on the plant species and conditions of habitat. *Regulatory Mechanisms in Biosystems* 9(1):56–61. <https://doi.org/10.15421/021807>.
- Khromykh N, Lykholat Y, Shupranova L et al (2018b) Interspecific differences of antioxidant ability of introduced *Chaenomeles* species with respect to adaptation to the steppe zone conditions. *Biosyst Diver* 26(2):132–138. <https://doi.org/10.15421/011821>.
- Kumar S, Stecher G, Li M et al (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Li S, Cao P, Wang C et al (2021) Genome-wide analysis of tubulin gene family in cassava and expression of family member FtsZ2-1 during various stress. *Plants* 10:668. <https://doi.org/10.3390/plants10040668>.
- Lykholat YV, Khromykh NO, Didur OO et al (2021) Features of the fruit epicuticular waxes of *Prunus persica* cultivars and hybrids concerning pathogens susceptibility. *Ukr J Ecol* 11(1):261–266. https://doi.org/10.15421/2021_238.
- Morimoto T, Inaoka M, Banno K, Itai A (2020) Genetic mapping of a locus controlling the intergeneric hybridization barrier between apple and pear. *Tree*

- Genetics Genomes 16:5. <https://doi.org/10.1007/s11295-019-1397-7>.
- Nei M (1972) Genetic distance between populations. *Am Nat* 106:283–292. <http://dx.doi.org/10.1086/282771>.
- Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:5269–5273. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>.
- Oakley RV, Wang YS, Ramakrishna W et al (2007) Differential expansion and expression of alpha- and beta-tubulin gene families in *Populus*. *Plant Physiol* 145:961–973. <https://doi.org/10.1104/pp.107.107086>.
- Pavlicek A, Hrda S, Flegr J (1999) FreeTree – Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. *Folia Biol* 45:97–99.
- Pirko NN, Demkovich AY, Kalafat LO et al (2016) Intron length polymorphism of β -tubulin genes in different representatives of *Pinaceae* Lindl. family. *Revista Botanică (J. Botany)*, VIII(2/13):5–10.
- Pydiura N, Pirko Y, Galinousky D et al (2019) Genome-wide identification, phylogenetic classification, and exon-intron structure characterization of the tubulin and actin genes in flax (*Linum usitatissimum*). *Cell Biol Int* 43:1010–1019. <https://doi.org/10.1002/cbin.11001>.
- Rabokon AN, Pirko YV, Demkovich AY et al (2018). Comparative analysis of the efficiency of intron-length polymorphism of β -tubulin genes and microsatellite loci for the genotyping of Ukrainian flax varieties. *Cytol Genet* 52(1):3–15. <https://doi.org/10.3103/S0095452718010115>.
- Radchuk VV (2008) The transcriptome of the tubulin gene family in plants. In: *The Plant Cytoskeleton: a Key Tool for Agro-Biotechnology* (YB Blume, WV Baird, AI Yemets, D Breviario, Eds.). NY: Springer Dordrecht, 219–241. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8843-8_11.
- Rao G, Zeng Y, He C, Zhang J (2016) Characterization and putative post-translational regulation of α - and β -tubulin gene families in *Salix arbutifolia*. *Sci Rep* 6:19258. <https://doi.org/10.1038/srep19258>.
- Sambrook J, David WR (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vol. 2. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Spokevicius AV, Southerton SG, MacMillan CP et al (2007) β -Tubulin affects cellulose microfibril orientation in plant secondary fibre cell walls. *Plant J* 51:717–726. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2007.03176.x>.
- Stöcker M, Jordi GM, Arús P et al (1993) A highly conserved α -tubulin sequence from *Prunus amygdalus*. *Plant Mol Biol* 22:913–916. <https://doi.org/10.1007/BF00027377>.
- Swarbreck D, Wilks C, Lamesch P et al (2008) The Arabidopsis Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acid Res* 36(Database issue):1009–1014. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm965>.
- Thurow LB, Raseira MCB, Bonow S et al (2017) Population genetic analysis of brazilian peach breeding germplasm. *Revista Brasileira de Fruticultura* 39(5):166. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452017166>.
- Verde I, Jenkins J, Dondini L et al (2017) The Peach v2.0 release: high-resolution linkage mapping and deep resequencing improve chromosome-scale assembly and contiguity. *BMC Genomics* 18(1):225. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3606-9>.
- Wang Y, Tang H, Debarry JD et al (2012) MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity. *Nucleic Acids Res* 40(7):e49. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1293>.
- Yemets A, Radchuk V, Bayer O et al (2008) Development of transformation vectors based upon a modified plant α -tubulin gene as the selectable marker. *Cell Biol Int* 32(5):566–570. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2007.11.012>.
- Zacchino SA, Butassi E, Liberto MD et al (2017) Plant phenolics and terpenoids as adjuvants of antibacterial and antifungal drugs. *Phytomedicine* 37:27–48. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.10.018>.
- Zhang J, Li Y, Shi G et al (2009) Characterization of α -tubulin gene distinctively presented in a cytoplasmic male sterile and its maintainer line of non-heading Chinese cabbage. *J Sci Food Agric* 89:274–280. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3438>.

Надійшла в редакцію 01.07.22
Після доопрацювання 07.07. 22
Прийнята до друку 18.11.22