

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Сравнительная оценка копийности сателлитных повторов в геноме видов Triticeae

П.Ю. Крупин , А.И. Юркина, А.А. Кочешкова, Д.С. Ульянов, Г.И. Карлов, М.Г. Дивашук

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

 [pavel-krupin@yandex.ru](mailto:pavel-krupin@yandex.ru)

**Аннотация.** Сателлитные повторы составляют значительную часть генома Пшеницевых, играя важную роль в видообразовании, что делает их ценным инструментом для изучения этих процессов. Особое место среди злаков занимают виды *Pseudoroegneria* – наиболее вероятные доноры St-генома у многих полиплоидов. Цель настоящего исследования состояла в сравнительной оценке копийности сателлитных повторов в геномах Triticeae. С помощью количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени была установлена копийность 22 сателлитных повторов, выявленных в полногеномных нуклеотидных последовательностях видов *Pseudoroegneria*, и одного ранее опубликованного повтора, обнаруженного в геноме *Aegilops crassa*. Объектами анализа стали семь видов *Pseudoroegneria*, три вида *Thinopyrum*, *Elymus pendulinus*, *Ae. tauschii*, *Secale cereale* и *Triticum aestivum*. По уровню копийности и коэффициентам вариации нами выделено три группы повторов: с низким уровнем вариативности между видами (среднекопийный CL82), средним уровнем вариативности (низко- и среднекопийные CL67, CL3, CL185, CL119, CL192, CL89, CL115, CL95, CL168) и с высокими значениями коэффициента вариации (CL190, CL184, CL300, CL128, CL207, CL69, CL220, CL101, CL262, CL186, CL134, CL251, CL244). Повтор CL69 показал специфическую высокую копийность для всех видов *Pseudoroegneria*, CL101 – у *Pseudoroegneria* и *Th. junceum*, CL244 – у *Th. bessarabicum*, CL184 – у *P. cognata* и *S. cereale*. У *P. cognata* более высокую копийность, по сравнению с остальными видами, проявили повторы CL95, CL128, CL168, CL186, CL207, CL300; у *P. kosaninii* – CL3, CL95, CL115, CL119, CL190, CL220, CL207 и CL300; у *P. libanotica* – CL89; у *P. geniculata* – CL134. Проведенные нами оценка копийности сателлитных повторов, найденных в St-геноме, и анализ специфичности их амплификации между видами могут пополнить арсенал молекулярно-генетических и цитогенетических маркеров, используемых для эволюционных, филогенетических и популяционных исследований представителей трибы Пшеницевых.

Ключевые слова: Triticeae; сателлитные повторы; qPCR; полногеномное секвенирование.

**Для цитирования:** Крупин П.Ю., Юркина А.И., Кочешкова А.А., Ульянов Д.С., Карлов Г.И., Дивашук М.Г. Сравнительная оценка копийности сателлитных повторов в геноме видов Triticeae. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(8):947-957. DOI 10.18699/VJGB-23-109

## Comparative assessment of the copy number of satellite repeats in the genome of Triticeae species

P.Yu. Kroupin , A.I. Yurkina, A.A. Kocheshkova, D.S. Ulyanov, G.I. Karlov, M.G. Divashuk

All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia

 [pavel-krupin@yandex.ru](mailto:pavel-krupin@yandex.ru)

**Abstract.** Satellite repeats are a significant component of the genome of Triticeae and play a crucial role in the speciation. They are a valuable tool for studying these processes. *Pseudoroegneria* species play a special role among grasses, as they are considered putative donors of the St-genome in many polyploid species. The aim of this study was to compare the copy number of satellite repeats in the genomes of Triticeae species. Quantitative real-time PCR was applied to determine the copy numbers of 22 newly discovered satellite repeats revealed in the whole-genome sequences of *Pseudoroegneria* species and one additional repeat previously identified in the genome of *Aegilops crassa*. The study focused on seven species of *Pseudoroegneria*, three species of *Thinopyrum*, *Elymus pendulinus*, *Ae. tauschii*, *Secale cereale*, and *Triticum aestivum*. Based on the copy number level and coefficients of variation, we identified three groups of repeats: those with low variability between species (medium-copy CL82), those with medium variability (low- and medium-copy CL67, CL3, CL185, CL119, CL192, CL89, CL115, CL95, CL168), and those with high coefficients of variation (CL190, CL184, CL300, CL128, CL207, CL69, CL220, CL101, CL262, CL186, CL134, CL251, CL244). CL69 exhibited a specific high copy number in all *Pseudoroegneria* species, while CL101 was found in both *Pseudoroegneria* and *Th. junceum*, CL244 in *Th. bessarabicum*, CL184 in *P. cognata* and *S. cereale*. CL95, CL128, CL168, CL186, CL207, and CL300 exhibited higher copy numbers in *P. cognata* compared to other species; CL3, CL95, CL115, CL119, CL190, CL220, CL207, and CL300 in *P. kosaninii*; CL89 in *P. libanotica*; CL134 in *P. geniculata*. Our assessment of

the copy number of new satellite repeats in the St-genome and the analysis of their amplification specificity between species can contribute to the molecular-genetic and chromosome markers used for evolutionary, phylogenetic, and population studies of Triticeae species.

Key words: Triticeae; satellite repeats; qPCR; whole-genome sequencing.

**For citation:** Kroupin P.Yu., Yurkina A.I., Kocheshkova A.A., Ulyanov D.S., Karlov G.I., Divashuk M.G. Comparative assessment of the copy number of satellite repeats in the genome of Triticeae species. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(8):947-957. DOI 10.18699/VJGB-23-109

## Введение

Triticeae – экономически важная триба семейства Poaceae, включает около 500 видов однолетних и многолетних травянистых растений (база NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>), среди которых пшеница, рожь, ячмень и кормовые травы играют значимую продовольственную роль для человечества, а также стали неотъемлемой частью рациона животных (Hodkinson, 2018).

Интерес к изучению филогенетических отношений внутри трибы Triticeae в значительной степени объясняется возможностью диких видов, относящихся к Пшеницевым, быть потенциальными источниками хозяйственно ценных генов для улучшения культурных злаков. К примеру, пырей (*Thinopyrum*) и дазипирум (*Dasypyrum*) служат донорами генов устойчивости к различным болезням (Yang et al., 2005; Luo P.G. et al., 2009; Salina et al., 2015; Wang S. et al., 2019; Li L.F. et al., 2022; Guo et al., 2023), в результате скрещивания пшеницы и житняка (*Agropyron*) можно повысить продуктивность колоса (Zhang J. et al., 2016); представители псевдорогнерии (*Pseudoroegneria*) отличаются засухоустойчивостью и используются в качестве пастбищных трав (Wu et al., 2023b).

Триба Triticeae насчитывает около 100 однолетних и 400 многолетних видов, несущих один (у диплоидов) или несколько (у полиплоидов) из 13 геномов (Wang, Lu, 2014). Представители *Pseudoroegneria* несут St-геном, и считается, что именно этот род был донором St-генома для элимусов (*Elymus*) и некоторых видов *Thinopyrum* (Mahelka et al., 2011; Добрякова, 2017; Linc et al., 2017; Lei et al., 2018; Chen N. et al., 2020; Agafonov et al., 2021). Растения рода *Agropyron* всех уровней ploидности ( $2n = 2x/4x/6x$ ) отличаются наличием P-генома (Zhang Y. et al., 2015). Геном J (=E) в качестве основного несут диплоиды *Thinopyrum bessarabicum* (геном J = J<sup>b</sup>) и *Th. elongatum* (геном E = J<sup>c</sup>). Геном J эволюционно близок D-субгеному мягкой пшеницы, наиболее вероятным донором которого служит *Aegilops tauschii* (Baker et al., 2020). Этим можно объяснить, почему в интрогрессивных линиях мягкой пшеницы, созданных с целью ее улучшения путем гибридизации с *Thinopyrum*, наибольшая частота интрогрессий со стороны J-генома наблюдается именно в хромосомы D-субгенома (Chen Q. et al., 2001; Liu Z. et al., 2007; Cui et al., 2018).

На сегодняшний день происхождение, взаимосвязи и близость геномов внутри трибы Triticeae остаются дискуссионными темами и несут в себе много неопределенностей. Трудности исследования геномов злаков связаны с тем, что субгеном полиплоида может значительно отличаться от предкового генома диплоидного родительского организма из-за его модификаций, через которые он проходит в ходе эволюции, а сам диплоидный предок

донора к настоящему времени мог вымереть или еще не найден (Jakob, Blattner, 2010; Liu Q.-L. et al., 2020; Sha et al., 2022). У многолетних полиплоидных видов, например *Th. intermedium* и *Th. ponticum*, могут наблюдаться несбалансированный геном или хромосомные транслокации (Kruppa, Molnar-Lang, 2016; Liu Y. et al., 2023), что может быть связано с переходом к вегетативному размножению без полового процесса для образования семян, требующего стабильности мейоза (Comai, 2005; Husband et al., 2013). Для этих же видов характерны рекомбинантные субгеномы, происхождение которых до сих пор остается загадкой (Wang R.R.C. et al., 2015; Liu Y. et al., 2023). Продолжаются дискуссии о возможных донорах субгеномов Y у *Elymus* и *Roegneria* (Yan et al., 2011; Liu Q.-L. et al., 2020; Wu et al., 2021) и материнской форме при возникновении полиплоидов *Thinopyrum*, *Roegneria*, *Elymus*, *Kengyilia* и др. (Mahelka et al., 2011; Luo X. et al., 2012; Zeng et al., 2012; Lei et al., 2018; Chen N. et al., 2020).

Кроме того, существует проблема соотносительности между видовой идентификацией конкретного образца на основе ботанических признаков (часто подверженных влиянию среды) и таковой на основе молекулярно-генетической и цитогенетической характеристики (Wang, Lu, 2014; Al-Saghir, 2016; Родионов, 2022), как, например, у *Elymus* (Lucia et al., 2019; Rodionov et al., 2019; Tan et al., 2021). Другим примером могут служить отношения между пыреем удлинненным *Th. elongatum* и пыреем бессарабским *Th. bessarabicum*, несущим довольно близкие, но различающиеся по ботаническим характеристикам геномы (Grewal et al., 2018; Dai et al., 2021; Chen C. et al., 2023). Проблема усугубляется тем, что нередко встречаются естественные спонтанные гибриды (Chen C. et al., 2022; Luo Y.C. et al., 2022; Wu et al., 2023a). Изучение филогенетических взаимоотношений углубляет наше понимание филогенетических процессов у растений и процессов видообразования, помогает совершенствовать биосистематику. Полученные знания позволят повысить эффективность использования генетических ресурсов дикорастущих видов благодаря пониманию их близости к геномам возделываемых культур и возможности получения ценных интрогрессий.

Геном злаков отличается большим размером, что усложняет его полноразмерное глубокое секвенирование и затрудняет сборку (Rabanus-Wallace, Stein, 2019). Значительную часть генома Triticeae составляет повторяющаяся ДНК, или репитом, включающий в себя мобильные элементы, кластеры генов (в частности, гены 5S и 45S рРНК) и сателлитные повторы (Dvořák, 2009; Shcherban, 2015; Gao et al., 2023; Vershinin et al., 2023).

Сателлитные повторы – tandemно повторяющиеся некодирующие последовательности, присутствующие в

виде массивов различной длины в генетически молчащих гетерохроматиновых областях (Бадаева, Салина, 2013). Сателлитные повторы считаются наиболее вариативными и быстро эволюционирующими компонентами, они могут быть видоспецифичными или общими для близкородственных видов (Belyayev et al., 2019; Garrido-Ramos, 2021; Thakur et al., 2021). Сравнительный анализ их копийности, нуклеотидных последовательностей и локализации на хромосомах служит инструментом для проведения фундаментальных филогенетических и эволюционных исследований растений, в том числе злаков (Ananthawat-Jónsson, Heslop-Harrison, 1993; Vershinin et al., 1994; Kishii et al., 1999; Ananthawat-Jónsson et al., 2009; Han et al., 2017; Linc et al., 2017; Ruban, Badaeva, 2018; Said et al., 2018; Salina, Adonina, 2019; Dai et al., 2021; Wu et al., 2021; Chen C. et al., 2022; Kroupin et al., 2023; Shi et al., 2023). Сателлитные повторы нашли практическое использование в качестве ПЦР-маркеров и хромосомных маркеров для идентификации интрогрессий чужеродного генетического материала, содержащего ценные хозяйственные признаки, в геном возделываемых злаков (Li G. et al., 2016; Han et al., 2017; Liu L. et al., 2018; Chen J. et al., 2019).

Ощутимый прогресс в изучении геномов злаков был достигнут благодаря изобретению методов полногеномного секвенирования и биоинформатических алгоритмов для анализа получаемых данных (Rabanus-Wallace, Stein, 2019; Gao et al., 2023). Стремительный рост объема информации о полногеномных последовательностях злаков существенно ускорил и упростил поиск повторяющейся ДНК, пригодной для использования в качестве хромосомных маркеров (Du et al., 2017; Said et al., 2018; Tang et al., 2018; Chen J. et al., 2019; Kroupin et al., 2019a, 2022; Lang et al., 2019a; Liu Q.-L. et al., 2020; Wu et al., 2021, 2022). Благодаря тому что повторяющаяся ДНК составляет значительную часть генома злаков, данные о сателлитных повторах могут быть получены даже в результате секвенирования с небольшим покрытием, что во многом облегчает поиск повторяющихся последовательностей (Navajas-Perez, Paterson, 2009; Kroupin et al., 2019b; Šatović-Vukšić, Plohl, 2023).

Хорошо зарекомендовавшим себя методом установления копийности повторяющейся ДНК, в том числе сателлитных повторов, является количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени (qPCR) (Harpke, Peterson, 2007; Navajas-Pérez et al., 2009; Baruch, Kashkush, 2012; Feliciello et al., 2015; Divashuk et al., 2016, 2019, 2022; Pereira et al., 2018; Shams, Raskina, 2018). По сравнению с Саузерн-блот- или дот-блот-гибридизацией на мембране или флуоресцентной гибридизацией *in situ* на хромосомах, qPCR является более простым в применении, точным и эффективным методом оценки копийности целевой последовательности, что позволяет обнаружить количество копий сателлитных повторов в геноме и его вариативность между геномами (Kalendar et al., 2020; Pös et al., 2021).

В настоящей работе в результате полногеномного секвенирования *Pseudoroegneria spicata*, *P. libanotica*, *P. tauri*, *P. geniculata*, *P. cognata* и *P. kosaninii* нами обнаружено 22 сателлитных повтора. Для понимания потенциала их применения в качестве инструмента эволюционно-филогенетических исследований дикорастущих представите-

лей трибы Triticeae и изучения отдаленных гибридов методами молекулярной биологии и цитогенетики необходимо предварительно определить копийность сателлитных повторов в геномах носителей St-генома, в связи с чем в качестве объекта нами выбраны виды *Pseudoroegneria* различной плоидности.

Для оценки специфичности сателлитных повторов для St-генома нами включены в эксперимент виды *Thinopyrum*, содержащие распространенный среди злаков J-геном. Также нами выбран *Th. intermedium* с геномной формулой J<sup>J</sup>vsSt как носитель St-субгенома и St-специфичных повторов в рекомбинантном геноме J<sup>vs</sup>. Для установления возможности использования выявленных сателлитных повторов для характеристики отдаленных гибридов пшеницы и ржи в исследование были добавлены образцы *Triticum aestivum* и *Secale cereale*, кроме того, ввиду эволюционной близости J- и D-геномов нами включен образец *Ae. tauschii*. Был также использован *E. pendulinus*, несущий как St-субгеном, целевой для нашей работы, так и Y-субгеном с неизвестным происхождением, распространенный среди видов *Elymus sensu lato*. В эксперимент был взят и сателлитный повтор CL244, полученный нами в результате анализа полногеномной нуклеотидной последовательности носителя разновидности D-генома *Ae. crassa* (D<sup>1</sup>X<sup>cr</sup>) (Kroupin et al., 2022). Несмотря на это, CL244 не был найден у *Ae. tauschii*, показал небольшое число сайтов гибридизации на хромосомах мягкой пшеницы и *Ae. crassa*, при этом на хромосомах J<sup>b</sup>-генома *Th. bessarabicum* наблюдались яркие сигналы, свидетельствующие о высоком уровне его копийности.

## Материалы и методы

Материалом для исследования послужили виды Triticeae различного геномного состава (см. таблицу).

Молодые листья растений были заморожены в жидком азоте. Затем геномная ДНК была выделена по протоколу СТАВ (Rogers, Bendich, 1985). Эта ДНК использовали для последующего секвенирования и количественной полимеразной цепной реакции. Концентрацию и чистоту выделенной ДНК проверяли с применением Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США) и электрофореза в 0.8 % агарозном геле.

Библиотеки shotgun-секвенирования были синтезированы с использованием набора Swift 2S Turbo DNA Library Kit (Swift Bioscience, США) в соответствии с протоколом производителя. Для проверки качества библиотек был выполнен тестовый прогон на приборе MiSeq (Illumina, Inc., США). Затем библиотеки были преобразованы и секвенированы на DNBSEQ-G400 на одной дорожке. Исходное количество ДНК составляло 25 нг, фрагменты имели длину около 350 п. н. и были проиндексированы по обоим концам с помощью набора Swift 2S Turbo Unique Dual Indexing Kit (Swift Bioscience). Секвенирование выполняли на Illumina NextSeq (Illumina, Inc.) с применением набора NextSeq 500/550 Mid Output Kit v.2.5 (Illumina, Inc.).

Биоинформатический анализ по обработке и сборке прочтенных нуклеотидных последовательностей, поиску последовательностей сателлитных тандемных повторов и оценке их на уникальность по сравнению с ранее опубликованными осуществляли согласно методике, описанной

## Растительный материал

Вид	Образец	Источник образца (генбанк)	Число хромосом (2n)	Геномная формула	Цель (секвенирование /qPCR)
<i>P. spicata</i>	PI 578855	GRIN <sup>1</sup>	14	StSt	Секвенирование, qPCR
<i>P. spicata</i>	PI 236671	GRIN	28	StStStSt	Секвенирование, qPCR
<i>P. libanotica</i>	PI 228389	GRIN	14	StSt	qPCR
<i>P. libanotica</i>	PI 330690	GRIN	14	StSt	Секвенирование
<i>P. tauri</i>	PI 380652	GRIN	14	StSt	Секвенирование, qPCR
<i>P. geniculata</i>	PI 670437	GRIN	28	StStStSt	Секвенирование, qPCR
<i>P. cognata</i>	PI 670361	GRIN	28	StStStSt	Секвенирование, qPCR
<i>P. kosaninii</i>	PI 237636	GRIN	56	StStStSt StStStSt	Секвенирование, qPCR
<i>Th. intermedium</i>	PI 401200	GRIN	42	J <sup>v</sup> J <sup>v</sup> J <sup>v</sup> J <sup>v</sup> StSt	qPCR
<i>Th. bessarabicum</i>	PI 531711	GRIN	14	J <sup>b</sup> J <sup>b</sup>	qPCR
<i>Th. junceum</i>	PI 119604	GRIN	42	J <sup>b</sup> J <sup>b</sup> J <sup>b</sup> J <sup>b</sup> J <sup>e</sup> J <sup>e</sup>	qPCR
<i>E. pendulinus</i>	PI 639804	GRIN	28	StStYY	qPCR
<i>Ae. tauschii</i>	K-608	ВИР <sup>2</sup>	14	DD	qPCR
<i>S. cereale</i>	Сорт Берегиня	НЦЗ <sup>3</sup>	14	RR	qPCR
<i>T. aestivum</i>	Сорт Chinese Spring	–	42	BBAADD	qPCR

<sup>1</sup> GRIN – информационная сеть по ресурсам зародышевой плазмы Службы сельскохозяйственных исследований Министерства сельского хозяйства США (USDA-ARS Germplasm Resources Information Network).

<sup>2</sup> ВИР – Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова.

<sup>3</sup> НЦЗ – Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко.

в работе (Kroupin et al., 2022). Последовательности праймеров на выявленные мономеры сателлитных повторов приведены в Приложении 1<sup>1</sup>.

Количественную ПЦР в реальном времени осуществляли с использованием в качестве матриц ДНК видов, представленных в таблице, в трехкратной повторности. Амплификацию выполняли с помощью системы амплификатора в реальном времени CFX (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) и реакционной смеси Real-Time PCR Mix с флуорофором Eva Green (ООО «Синтол», Россия) в соответствии с протоколом производителя. В качестве эталонного гена был выбран однокопийный ген *VRN1*. Концентрация праймера в смеси составляла 10 нг/мкл, концентрация ДНК – 0.4 нг/мкл. Амплификацию осуществляли согласно следующей программе: преинкубация – 10 мин при 95 °С; далее 40 циклов: денатурация – 10 с при 95 °С; отжиг праймера – 30 с при 60 °С.

Статистический анализ, включая расчет средних значений *Sq*, стандартного отклонения и соответствующего количества копий относительно эталонного гена *VRN1*, выполнен с применением Bio-Rad CFX и программного обеспечения Manager 3.1. Для определения сходства копийности между повторами нами введено понятие «паттерн копийности повтора» – набор значений копийности конкретного повтора среди изучаемого набора видов. Для определения сходства копийности между изучаемыми видами нами введено понятие «паттерн копийности вида» – набор значений копийности изучаемых сателлитных повторов для конкретного вида.

Коэффициенты корреляции *r* Пирсона ( $p < 0.05$ ) между паттернами копийности повтора и паттернами копийности вида рассчитывали на основе полученных значений копийности посредством программного обеспечения Statistica 12 (StatSoft, США). Диаграммы методом анализа главных компонент строили для сателлитных повторов и для изучаемых видов на основе полученных данных о копийности сателлитных повторов с использованием программного обеспечения Statistica 12. Коэффициент вариации значений копийности сателлитных повторов между видами рассчитывали с помощью Microsoft Excel (США).

## Результаты

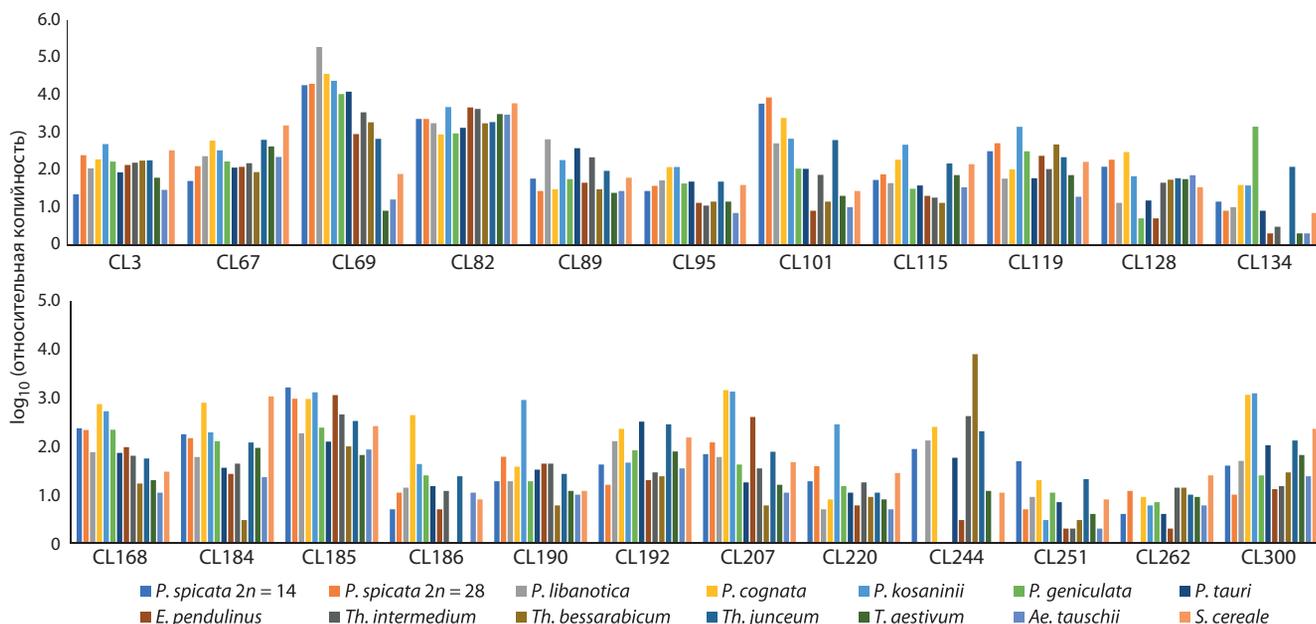
### Характеристика выявленных сателлитных повторов

В рамках данного исследования найдено 22 сателлитных повтора в отдельных сборках. В результате анализа нуклеотидной последовательности генома диплоидного образца *P. spicata* ( $2n = 14$ ) идентифицировано 10 повторов (CL69, CL82, CL101, CL119, CL128, CL168, CL184, CL207, CL251 и CL262); по четыре – в нуклеотидной последовательности геномов *P. tauri* (CL67, CL89, CL185 и CL192) и *P. kosaninii* (CL3, CL115, CL220 и CL300); по одному – в геномах *P. libanotica* (CL95); *P. geniculata* (CL134), *P. cognata* (CL186) и тетраплоидного образца *P. spicata* (CL190).

Характеристика выявленных сателлитных повторов, а именно: длина и наиболее сходные последовательности в базе NCBI, представлены в Приложении 1. В результате сравнения нуклеотидных последовательностей обнаруженных нами 22 повторов с опубликованным ранее в

<sup>1</sup> Приложения 1 и 2 см. адресу:

<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2023-27/appx30.xlsx>



Относительная копийность изучаемых сателлитных повторов у анализируемых видов трибы Triticeae, выраженная через десятичный логарифм.

базе данных NCBI для девяти из них (CL69, CL89, CL95, CL168, CL185, CL207, CL251, CL262, CL300) не найдено каких-либо гомологов. Для остальных 13 повторов уровень идентичности среди сходных опубликованных последовательностей находился в пределах 70–98 %, что позволяет говорить о них как об отличающихся от ранее опубликованных (см. Приложение 1).

Два сателлитных повтора показали сходство с повторами мягкой пшеницы: CL119 оказался сходен с клоном рТа-465 (77 % идентичности), а CL101 – со Spelt1-подобным субтеломерным повтором (80 % идентичности). У трех повторов обнаружено сходство со следующими известными сателлитами: у CL220 – с CL219, выявленным в геноме *Ae. crassa* (82 %), у CL134 – с CL97 из генома *Th. bessarabicum* (71 %) и у CL186 – с ACRI\_TR\_CL80 из генома *A. cristatum* (70 %). У других трех повторов показано сходство с микросателлитами: у CL128 – с L15, идентифицированным в геноме *P. stipifolia* (84 %), у CL190 – с P523 из генома *Ae. tauschii* (81 %) и у CL82 – с рТа-451 из генома мягкой пшеницы (88 %). Четыре найденных нами повтора проявили сходство со следующими мобильными элементами: CL184 – с ретроинвертированным *Cassandra* из генома ржи (98 %), CL67 и CL115 – с ретроинвертированными из генома ячменя *Cereba* (91 %) и *Sandra5* (78 %) соответственно, CL192 – с транспозоном XJ из генома *Ae. tauschii* (70 %). Повтор CL3 более всего был сходен с Е-геном-специфичным маркером *Th. elongatum* 51-6 (79 %).

#### Оценка копийности сателлитных повторов с помощью qPCR

Полученные данные относительной копийности 23 сателлитных повторов у 14 видов, рассчитанные относительно референсного однокопийного гена *VRN1*, отображены в Приложении 2.1. Все исследуемые нами повторы разли-

чались по уровню копийности и коэффициентам вариации между видами. Так как порядок полученных значений копийности значительно варьировался, для удобства сравнения количества копий повторов результаты были представлены в виде десятичного логарифма (см. рисунок и Приложение 2.2). В дальнейшем десятичный логарифм относительной копийности мы будем обозначать просто как «копийность». Так как копийность изменялась от 0 до 5, то повторы были условно классифицированы на следующие группы: с низкой ( $\leq 2$ ), средней ( $> 2, < 4$ ) и высокой копийностью ( $\geq 4$ ). Поскольку коэффициент вариации изменялся в пределах от 0 до 0.6, мы приняли, что вариативность низкая – при его значении меньше 0.1, средняя – от 0.1 до 0.25, высокая – больше 0.25.

Наименее вариативным повтором оказался CL82: уровень его копийности был средним, ближе к высокому, и находился в пределах 2.9–3.8.

Средний уровень вариативности копийности сателлитных повторов у всех изучаемых образцов (коэффициент вариации принимал значения в пределах 0.16–0.25) был характерен для следующих девяти повторов: CL67, CL3, CL185, CL119, CL192, CL89, CL115, CL95, CL168 (указаны по возрастанию коэффициента вариации). Средние значения их копийности у видов *Pseudoroegneria* по сравнению с таковыми у всей изучаемой коллекции были выше на 2–11 %, кроме CL67, показавшего максимальную копийность в геноме ржи (3.2): повтор CL89 продемонстрировал максимальное значение у *P. libanotica* (2.8), CL3, CL119 и CL115 – у *P. kosaninii* (2.7, 3.1 и 2.7 соответственно), CL95 – у *P. cognata* и *P. kosaninii* (2.1), а CL168 – у *P. cognata* (2.9). Остальные повторы этой группы в целом характеризовались низким и средним уровнем копийности между всеми образцами: минимальная наблюдалась у CL192, а максимальная – у CL185, находясь в пределах 1.2–2.5 и 1.8–3.2 соответственно.

Высокий уровень вариативности отмечен у следующих 13 повторов: CL190, CL184, CL300, CL128, CL207, CL69, CL220, CL101, CL262, CL186, CL134, CL251, CL244: коэффициент вариации находился в пределах 0.27–0.43. В этой группе можно выделить повторы: CL69 – высокая копияность у видов *Pseudoroegneria* (4.0–5.3), средняя – у *Thinopyrum* и *E. pendulinus* (2.8–3.0), низкая – у остальных; CL101 – средняя копияность у *Pseudoroegneria* (2.0–3.9) и *Th. junceum* (2.8), низкая – у остальных; CL244 – близкая к высокой у *Th. bessarabicum* (3.9), значительно варьирующая у видов *Pseudoroegneria* (0–2.4), средняя и низкая – у остальных; CL184 – самая высокая у *P. cognata* (2.9) и *S. cereale* (3.0) по сравнению с остальными (0.5–2.3). Отдельные повторы показали наибольшую копияность у некоторых видов *Pseudoroegneria*: CL128 и CL186 – у *P. cognata* (2.5 и 2.6 соответственно), CL190 и CL220 – у *P. kosaninii* (2.5 и 3.0 соответственно), CL134 – у *P. geniculata* (3.1), CL207 и CL300 – у *P. cognata* и *P. kosaninii* (в пределах 3.1–3.2). Повторы CL251 и CL262 характеризовались общей низкой копияностью, варьирующей в пределах 0.3–1.7 и 0–1.4 соответственно.

Корреляционный анализ (см. Приложение 2.3) и анализ методом главных компонент (см. Приложение 2.4) между паттернами копияности повторов позволили выделить следующие группы с близкими паттернами копияности у изучаемых видов: 1) CL3, CL115, CL119, CL190 и CL220 ( $r \geq 0.77$ ); 2) CL95, CL207 и CL300 ( $r \geq 0.87$ ); 3) CL128, CL168 и CL186 ( $r \geq 0.72$ ). Корреляционный анализ (см. Приложение 2.5) и анализ методом главных компонент (см. Приложение 2.6) между паттернами копияности видов показали высокий уровень сходства копияности изучаемых повторов в следующих группах: 1) между образцами *Pseudoroegneria* ( $r > 0.9$ ); 2) между *E. pendulinus*, *Th. intermedium* и *Th. junceum* ( $r > 0.8$ ); 3), между рожью, мягкой пшеницей, *E. pendulinus*, *Th. junceum* и *Ae. tauschii* ( $r \geq 0.89$ ). Средний уровень сходства паттернов копияности наблюдался между *Th. intermedium* и *Pseudoroegneria* ( $r > 0.6$ ). Паттерн копияности *Th. bessarabicum* в среднем показал наименьшее сходство с другими видами.

## Обсуждение

Сателлитные повторы составляют значительную часть генома Пшеницевых, играя важную роль в образовании и эволюции новых видов, что делает их ценным инструментом для анализа этих процессов (Shcherban, 2015; Salina, Adonina, 2019; Vershinin et al., 2023). Поиск новых сателлитных повторов необходим для понимания филогенетических отношений и эволюции такой значимой для человека трибы, как Пшеницевые. Одним из первых шагов для определения пригодности найденных сателлитных повторов в качестве инструментов для таких исследований является сравнительная оценка их копияности у родственных видов.

Часть обнаруженных нами в St-геноме сателлитных повторов показала сходную копияность между изучаемыми видами. Для них были найдены гомологи в геноме пшеницы и ячменя, которые, возможно, имеют общее с ними происхождение: CL82 и CL119 характеризуются сходством с pTa-451 и pTa-465 соответственно, идентифицированными у *T. aestivum* (Komuro et al., 2013); CL67

имел сходство с прицентромерным ретротранспозоном *Cereba* (Hudakova et al., 2001) и консервативным для Пшеницевых (Dvořák, 2009). Хотя CL3 на 79 % идентичен E-специфичному повтору 51-6, какой-либо специфичности для видов *Thinopyrum* в нашем исследовании он не проявил, в связи с чем можно предположить, что нами найдена его более древняя и менее геном-специфичная форма.

Специфической высокой копияностью у образцов *Pseudoroegneria* и средней копияностью у видов *Thinopyrum* и *E. pendulinus* отличался CL69, что может говорить о его возникновении до расхождения St- и J-геномов. Повтор CL101 со средней копияностью у видов *Pseudoroegneria* и *Th. junceum* также мог возникнуть у общего предка St- и J-геномов. Так как CL101 идентичен на 80 % субтеломерному Spelt1-подобному повтору, вероятно, он может иметь общее происхождение со Spelt-1, распространенным у *Triticum* и *Aegilops* и отличающимся значительной вариативностью по копияности между видами (Pestsova et al., 1998; Ruban, Badaeva, 2018). Копияность повторов CL69 и CL101 у отдельных образцов принимает довольно высокие значения (до 3.9 и 5.3 соответственно), что делает их подходящими кандидатами на роль хромосомных маркеров для процедуры FISH. Дальнейшие эксперименты с использованием метода FISH покажут, могут ли эти повторы стать хромосомными маркерами для идентификации St-субгенома в полиплоидных видах, в том числе у *E. pendulinus*, изучения рекомбинантных геномов  $J^{vs}$  у пырея среднего и определения хромосомных перестроек в отдаленных гибридах пшеницы.

Наибольшее значение копияности у *P. cognata* и *S. cereale* продемонстрировал повтор CL184, обладающий сходством с ретротранспозоном *Cassandra* из генома ржи. *Cassandra* встречается в геноме многих видов растений и характеризуется существенными различиями по копияности между ними (Kalendar et al., 2020). Так как одним из способов распространения сателлитных повторов по геному является перемещение по нему ретроэлементов (Garrido-Ramos, 2021; Šatović-Vukšić, Plohl, 2023), возможно, нами найден повтор, оставшийся в результате распространения *Cassandra* по общему для St- и R-геномов предку.

Ранее идентифицированный нами в геноме *Ae. crassa* повтор CL244 характеризовался более высокой копияностью у *Th. bessarabicum*, чем у мягкой пшеницы, *Ae. crassa* и *Ae. tauschii* (Kroupin et al., 2022). В настоящем исследовании эти результаты подтвердились. Но при этом показана значительная вариативность копияности между видами *Pseudoroegneria*, что может быть связано с элиминацией или накоплением CL244 в ходе видообразования и последующей эволюции. Повтор CL244 имеет терминальную локализацию на хромосомах *Th. bessarabicum* (Kroupin et al., 2022), и, предположительно, может накапливаться или элиминировать в различных видах, подобно терминальным повторам Spelt-1 и Spelt-52 у *Aegilops* и *Triticum* (Raskina et al., 2011; Ruban, Badaeva, 2018) или pSc200 и pSc250 у ржи (Evtushenko et al., 2016).

Повтор CL220, специфичный для *P. kosaninii*, показал сходство с CL219, найденным нами ранее в геноме *Ae. crassa* (Kroupin et al., 2022), а CL186, специфичный для

*P. cognata*, сходен с ACRI\_CL80, идентифицированным у *A. cristatum* (P-геном) (Said et al., 2018). Вероятно, оба повтора возникли еще до расхождения геномов Пшеницевых от общего предка и в определенные периоды накапливаются в отдельных видах. Так как CL219 и ACRI\_CL80 были локализованы на единичных хромосомах, можно предположить, что CL220 и CL186 также покажут хромосом-специфичную локализацию на хромосомах *P. kosaninii* и *P. cognata* соответственно.

Нами обнаружены повторы, отличающиеся по копийности между видами *Pseudoroegneria* с различным уровнем плоидности. Например, октаплоид *P. kosaninii* отличается более высокой копийностью CL115, CL190 и CL220, тетраплоид *P. geniculata* – CL134. Возможно, наблюдаемые различия в копийности обусловлены процессами полиплоидизации, так как тандемные повторы в прицентромерных и терминальных участках играют важную роль в узнавании и расхождении хромосом при клеточном делении, что особенно актуально для гомеологичных геномов у полиплоидных растений (Mach, 2019; Aguilar, Prieto, 2021). Такие субгеном- и даже хромосом-специфичные повторяющиеся элементы выявлены у полиплоидных злаков – пшеницы, овса и пырея среднего – и, по-видимому, необходимы для дифференциации субгеномов при делении клетки (Shrama, Raina, 2005; Liu Z. et al., 2008; Divashuk et al., 2016; Lang et al., 2019b; Su et al., 2019).

Сравнение паттернов копийности повторов помогло определить, какие из них обладают сходной копийностью среди изучаемых образцов (см. Приложение 2.3 и 2.4). Повторы CL3, CL115, CL119, CL190 и CL220 были объединены в одну группу, потому что отличались максимальным уровнем копийности у *P. kosaninii*; CL95, CL207 и CL300 более специфичны для *P. cognata* и *P. kosaninii*; у CL128, CL168 и CL186 максимальная копийность наблюдалась у *P. cognata*. Сравнение паттернов копийности видов дало возможность понять в целом, какие образцы характеризуются сходной копийностью повторов.

Общая кластеризация видов *Pseudoroegneria* (см. Приложение 2.5 и 2.6) демонстрирует, что в целом они характеризуются сходной и отличной от других видов копийностью выявленных нами повторов. Паттерн копийности *E. pendulinus* ( $2n = 28$ , StStYY) отличался от таковой у *Pseudoroegneria*, это позволяет надеяться, что найденные нами St-специфичные повторы могут быть полезны для анализа St-субгенома *E. pendulinus* и других образцов *Elymus sensu lato*. *Thinopyrum* и мягкая пшеница имели различные паттерны копийности: CL244 и CL69 можно использовать для характеристики пшенично-пырейных гибридов и поиска интрогрессий в геном пшеницы со стороны всех трех изучаемых видов пырея, а CL134 и CL251 – со стороны *Th. junceum*.

L. Wang с коллегами (2017) в геноме *P. libanotica* обнаружил повтор St<sub>2</sub>-80, гибридующийся вдоль всей длины хромосом St-(суб)генома и только в терминальных участках E-, H-, P- и Y-(суб)геномов. Q.-L. Liu с коллегами (2020) на основе мобильных элементов в геноме *P. stipifolia* нашел диспергированные повторы S13, S158 и S21, по степени интенсивности различающиеся между хромосомами St- и Y-субгеномов, и S5 с точечной локали-

зацией, различной у хромосом St- и Y-субгеномов. D. Wu et al. (2022) на основе сателлитных повторов *P. libanotica* создали хромосомные маркеры STlib\_96, STlib\_98 и STlib\_117, однако о возможности их использования для анализа аллополиплоидов с St-геномом не сообщается.

Проведенная нами оценка копийности сателлитных повторов, найденных в St-геноме, и определение специфичности их амплификации между видами могут пополнить арсенал молекулярно-генетических и цитогенетических маркеров, используемых для изучения трибы Пшеницевых. Копийность сателлитных повторов может существенно различаться между видами, между популяциями и внутри них (Wang Q. et al., 2010; Belyayev, Raskina, 2013; Pollak et al., 2018; Tao et al., 2021). Идентифицированные нами сателлитные повторы могут быть полезны в том числе для популяционных исследований *Pseudoroegneria* и родственных ей злаков.

## Заключение

В результате анализа данных полногеномного секвенирования образцов *Pseudoroegneria* нами найдено 22 сателлитных повтора. В геномах 14 представителей трибы Triticeae нами установлен уровень их копийности, а также повтора CL244, ранее обнаруженного в *Ae. crassa*. В результате оценки изучаемые повторы были классифицированы по уровню копийности и вариативности между видами. Выявленные сателлитные повторы могут быть использованы для проведения эволюционных, филогенетических и популяционных исследований злаков в качестве молекулярно-генетических маркеров, а также потенциально могут быть основой для цитогенетических маркеров при *in situ* гибридизации.

## Список литературы / References

- Бадаева Е.Д., Салина Е.А. Структура генома и хромосомный анализ растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013; 17(4/2):1017-1043  
[Badaeva E.D., Salina E.A. Genome structure and chromosome analysis in plants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17(4/2):1017-1043 (in Russian)]
- Добрякова К.С. Аллополиплоидия и происхождение геномов видов *Elymus* L. (обзор). *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 2017;178(4):127-134. DOI 10.30901/2227-8834-2017-4-127-134  
[Dobryakova K.S. Allopolyploidy and origin of genomes in the *Elymus* L. species (a review). *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2017;178(4):127-134. DOI 10.30901/2227-8834-2017-4-127-134 (in Russian)]
- Родионов А.В. Тандемные дубликации генов, эуполиплоидия и вторичная диплоидизация – генетические механизмы видообразования и прогрессивной эволюции в мире растений. *Turczaninowia*. 2022;25(4):87-121. DOI 10.14258/turczaninowia.25.4.12  
[Rodionov A.V. Tandem duplications, eupolyploidy and secondary diploidization – genetic mechanisms of plant speciation and progressive evolution. *Turczaninowia*. 2022;25(4):87-121. DOI 10.14258/turczaninowia.25.4.12 (in Russian)]
- Agafonov A.V., Shabanova E.V., Emtseva M.V., Asbaganov S.V., Dorogina O.V. Phylogenetic relationships among different morphotypes of StY-genomic species *Elymus ciliaris* and *E. amurensis* (Poaceae) as a unified macroevolutional complex. *Botanica Pacifica: a Journal of Plant Science and Conservation*. 2021;10(1):19-28. DOI 10.17581/bp.2021.10101

- Aguilar M., Prieto P. Telomeres and subtelomeres dynamics in the context of early chromosome interactions during meiosis and their implications in plant breeding. *Front. Plant Sci.* 2021;12:672489. DOI 10.3389/fpls.2021.672489
- Al-Saghir M.G. Taxonomy and phylogeny in Triticeae: a historical review and current status. *Adv. Plants Agr. Res.* 2016;3(5):139-143. DOI 10.15406/apar.2016.03.00108
- Anamthawat-Jónsson K., Heslop-Harrison J.S. Isolation and characterization of genome-specific DNA sequences in Triticeae species. *Mol. Gen. Genet.* 1993;240(2):151-158. DOI 10.1007/BF00277052
- Anamthawat-Jónsson K., Wenke T., Thórsson A.T., Sveinsson S., Zakrzewski F., Schmidt T. Evolutionary diversification of satellite DNA sequences from *Leymus* (Poaceae: Triticeae). *Genome.* 2009; 52(4):381-390. DOI 10.1139/g09-013
- Baker L., Grewal S., Yang C.Y., Hubbart-Edwards S., Scholefield D., Ashling S., Burrige A.J., Przewieslik-Allen A.M., Wilkinson P.A., King I.P., King J. Exploiting the genome of *Thinopyrum elongatum* to expand the gene pool of hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2020;133(7):2213-2226. DOI 10.1007/s00122-020-03591-3
- Baruch O., Kashkush K. Analysis of copy-number variation, insertional polymorphism, and methylation status of the tiniest class I (TRIM) and class II (MITE) transposable element families in various rice strains. *Plant Cell Rep.* 2012;31(5):885-893. DOI 10.1007/s00299-011-1209-5
- Belyayev A., Raskina O. Chromosome evolution in marginal populations of *Aegilops speltoides*: causes and consequences. *Ann. Bot.* 2013;111(4):531-538. DOI 10.1093/aob/mct023
- Belyayev A., Josefiova J., Jandova M., Kalendar R., Krak K., Mandsk B. Natural history of a satellite DNA family: from the ancestral genome component to species-specific sequences, concerted and non-concerted evolution. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(5):1201. DOI 10.3390/ijms20051201
- Chen C., Zheng Z., Wu D., Tan L., Yang C., Liu S., Lu J., Cheng Y., Sha L., Wang Y., Kang H., Fan X., Zhou Y., Zhang C., Zhang H. Morphological, cytological, and molecular evidences for natural hybridization between *Roegneria stricta* and *Roegneria turczaninowii* (Triticeae: Poaceae). *Ecol. Evol.* 2022;12(1):e8517. DOI 10.1002/ee3.8517
- Chen C., Han Y., Xiao H., Zou B., Wu D., Sha L., Yang C., Liu S., Cheng Y., Wang Y., Kang H., Fan X., Zhou Y., Zhang T., Zhang H. Chromosome-specific painting in *Thinopyrum* species using bulked oligonucleotides. *Theor. Appl. Genet.* 2023;136(8):177. DOI 10.1007/s00122-023-04423-w
- Chen J., Tang Y., Yao L., Wu H., Tu X., Zhuang L., Qi Z. Cytological and molecular characterization of *Thinopyrum bessarabicum* chromosomes and structural rearrangements introgressed in wheat. *Mol. Breed.* 2019;39:146. DOI 10.1007/s11032-019-1054-8
- Chen N., Chen W.J., Yan H., Wang Y., Kang H.Y., Zhang H.Q., Zhou Y.H., Sun G.L., Sha L.N., Fan X. Evolutionary patterns of plastome uncover diploid-polyploid maternal relationships in Triticeae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2020;149:106838. DOI 10.1016/j.ympev.2020.106838
- Chen Q., Conner R., Laroche A., Ahmad F. Molecular cytogenetic evidence for a high level of chromosome pairing among different genomes in *Triticum aestivum*-*Thinopyrum intermedium* hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 2001;102:847-852. DOI 10.1007/s001220000496
- Comai L. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat. Rev. Genet.* 2005;6(11):836-846. DOI 10.1038/nrg1711. PMID: 16304599
- Cui Y., Zhang Y., Qi J., Wang H., Wang R.R.C., Bao Y., Li X. Identification of chromosomes in *Thinopyrum intermedium* and wheat *Th. intermedium* amphiploids based on multiplex oligonucleotide probes. *Genome.* 2018;61(7):515-521. DOI 10.1139/gen-2018-0019
- Dai Y., Huang S., Sun G., Li H., Chen S., Gao Y., Chen J. Origins and chromosome differentiation of *Thinopyrum elongatum* revealed by *PepC* and *Pgk1* genes and ND-FISH. *Genome.* 2021;64(10):901-913. DOI 10.1139/gen-2019-0176
- Divashuk M.G., Khuat T.M.L., Kroupin P.Y., Kirov I.V., Romanov D.V., Kiseleva A.V., Khrustaleva L.I., Alexeev D.G., Zelenin A.S., Klimushina M.V., Razumova O.V., Karlov G.I. Variation in copy number of Ty3/Gypsy centromeric retrotransposons in the genomes of *Thinopyrum intermedium* and its diploid progenitors. *PLoS One.* 2016;11:e0154241. DOI 10.1371/journal.pone.0154241
- Divashuk M.G., Karlov G.I., Kroupin P.Y. Copy number variation of transposable elements in *Thinopyrum intermedium* and its diploid relative species. *Plants.* 2019;9(1):15. DOI 10.3390/plants9010015
- Divashuk M.G., Nikitina E.A., Sokolova V.M., Yurkina A.I., Kocheshkova A.A., Razumova O.V., Karlov G.I., Kroupin P.Y. qPCR as a selective tool for cytogenetics. *Plants.* 2022;12(1):80. DOI 10.3390/plants12010080
- Du P., Zhuang L., Wang Y., Yuan L., Wang Q., Wang D., Dawadondup, Tan L., Shen J., Xu H., Zhao H., Chu C., Qi Z. Development of oligonucleotides and multiplex probes for quick and accurate identification of wheat and *Thinopyrum bessarabicum* chromosomes. *Genome.* 2017;60(2):93-103. DOI 10.1139/gen-2016-0095
- Dvořák J. Triticeae genome structure and evolution. In: Muehlbauer G., Feuillet C. (Eds.). *Genetics and Genomics of the Triticeae*. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models. Vol. 7. New York: Springer, 2009;685-711. DOI 10.1007/978-0-387-77489-3\_23
- Evtushenko E.V., Levitsky V.G., Elisafenko E.A., Gunbin K.V., Belousov A.I., Šafář J., Doležel J., Vershinin A.V. The expansion of heterochromatin blocks in rye reflects the co-amplification of tandem repeats and adjacent transposable elements. *BMC Genomics.* 2016;17:337. DOI 10.1186/s12864-016-2667-5
- Feliciello I., Akrap I., Brajković J., Zlatar I., Ugarković D. Satellite DNA as a driver of population divergence in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Genome Biol. Evol.* 2015;7(1):228-239. DOI 10.1093/gbe/evu280
- Gao Z., Bian J., Lu F., Jiao Y., He H. Triticeae crop genome biology: an endless frontier. *Front. Plant Sci.* 2023;14:1222681. DOI 10.3389/fpls.2023.1222681
- Garrido-Ramos M.A. The genomics of plant satellite DNA. In: Ugarković Đ. (Ed.). *Satellite DNAs in Physiology and Evolution. Progress in Molecular and Subcellular Biology*. Vol. 60. Cham: Springer, 2021;103-143. DOI 10.1007/978-3-030-74889-0\_5
- Grewal S., Yang C., Edwards S.H., Scholefield D., Ashling S., Burrige A.J., King I.P., King J. Characterisation of *Thinopyrum bessarabicum* chromosomes through genome-wide introgressions into wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2018;131(2):389-406. DOI 10.1007/s00122-017-3009-y
- Guo X., Shi Q., Liu Y., Su H., Zhang J., Wang M., Wang C., Wang J., Zhang K., Fu S., Hu X., Jing D., Wang Z., Li J., Zhang P., Liu C., Han F. Systemic development of wheat-*Thinopyrum elongatum* translocation lines and their deployment in wheat breeding for *Fusarium* head blight resistance. *Plant J.* 2023;114(6):1475-1489. DOI 10.1111/tpj.16190
- Han H., Liu W., Lu Y., Zhang J., Yang X., Li X., Hu Z., Li L. Isolation and application of P genome-specific DNA sequences of *Agropyron Gaertn.* in Triticeae. *Planta.* 2017;245(2):425-437. DOI 10.1007/s00425-016-2616-1
- Harpke D., Peterson A. Quantitative PCR revealed a minority of ITS copies to be functional in *Mammillaria* (Cactaceae). *Int. J. Plant Sci.* 2007;168(8):1157-1160. DOI 10.1086/520729
- Hodkinson T.R. Evolution and taxonomy of the grasses (Poaceae): A model family for the study of species-rich groups. *Annu. Plant Rev. Online.* 2018;1(1):255-294. DOI 10.1002/9781119312994.apr0622
- Hudakova S., Michalek W., Presting G.G., ten Hoopen R., dos Santos K., Jasencakova Z., Schubert I. Sequence organization of barley centromeres. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(24):5029-5035. DOI 10.1093/nar/29.24.5029
- Husband B.C., Baldwin S.J., Suda J. The Incidence of polyploidy in natural plant populations: major patterns and evolutionary processes

- ses. In: Greilhuber J., Dolezel J., Wendel J. (Eds.). Plant Genome Diversity. Vol. 2. Vienna: Springer, 2013;255-276. DOI 10.1007/978-3-7091-1160-4\_16
- Jakob S.S., Blattner F.R. Two extinct diploid progenitors were involved in allopolyploid formation in the *Hordeum murinum* (Poaceae: Triticeae) taxon complex. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2010;55(2):650-659. DOI 10.1016/j.ympev.2009.10.021
- Kalendar R., Raskina O., Belyayev A., Schulman A.H. Long tandem arrays of *Cassandra* retroelements and their role in genome dynamics in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(8):2931. DOI 10.3390/ijms21082931
- Kishii M., Nagaki K., Tsujimoto H., Sasakuma T. Exclusive localization of tandem repetitive sequences in subtelomeric heterochromatin regions of *Leymus racemosus* (Poaceae, Triticeae). *Chromosome Res.* 1999;7(7):519-529. DOI 10.1023/a:1009285311247
- Komuro S., Endo R., Shikata K., Kato A. Genomic and chromosomal distribution patterns of various repeated DNA sequences in wheat revealed by a fluorescence *in situ* hybridization procedure. *Genome.* 2013;56(3):131-137. DOI 10.1139/gen-2013-0003
- Krupin P.Y., Kuznetsova V.M., Nikitina E.A., Martirosyan Y.T., Karlov G.I., Divashuk M.G. Development of new cytogenetic markers for *Thinopyrum ponticum* (Podp.) Z.-W. Liu & R.-C. Wang. *Comp. Cytogenet.* 2019a;13(3):231-243. DOI 10.3897/CompCytogen.v13i3.36112
- Krupin P., Kuznetsova V., Romanov D., Kocheshkova A., Karlov G., Dang T.X., Khuat T.M.L., Kirov I., Alexandrov O., Polkhovskiy A., Razumova O., Divashuk M. Pipeline for the rapid development of cytogenetic markers using genomic data of related species. *Genes.* 2019b;10(2):113. DOI 10.3390/genes10020113
- Krupin P.Y., Badaeva E.D., Sokolova V.M., Chikida N.N., Belousova M.K., Surzhikov S.A., Nikitina E.A., Kocheshkova A.A., Ulyanov D.S., Ermolaev A.S., Khuat T.M.L., Razumova O.V., Yurkina A.I., Karlov G.I., Divashuk M.G. *Aegilops crassa* Boiss. repeatome characterized using lowcoverage NGS as a source of new FISH markers: application in phylogenetic studies of the Triticeae. *Front. Plant Sci.* 2022;13:980764. DOI 10.3389/fpls.2022.980764
- Krupin P.Y., Ulyanov D.S., Karlov G.I., Divashuk M.G. The launch of satellite: DNA repeats as a cytogenetic tool in discovering the chromosomal universe of wild Triticeae. *Chromosoma.* 2023;132(2):65-88. DOI 10.1007/s00412-023-00789-4
- Kruppa K., Molnar-Lang M. Simultaneous visualization of different genomes (J, J<sup>St</sup> and St) in a *Thinopyrum intermedium* × *Thinopyrum ponticum* synthetic hybrid (Poaceae) and in its parental species by multicolour genomic *in situ* hybridization (mcGISH). *Comp. Cytogenet.* 2016;10(2):283-293. DOI 10.3897/CompCytogen.v10i2.7305
- Lang T., Li G., Wang H., Yu Z., Chen Q., Yang E., Fu S., Tang Z., Yang Z. Physical location of tandem repeats in the wheat genome and application for chromosome identification. *Planta.* 2019a;249(3):663-675. DOI 10.1007/s00425-018-3033-4
- Lang T., Li G., Yu Z., Ma J., Chen Q., Yang E., Yang Z. Genome-wide distribution of novel Ta-3A1 mini-satellite repeats and its use for chromosome identification in wheat and related species. *Agronomy.* 2019b;9(2):60. DOI 10.3390/agronomy9020060
- Lei Y.X., Liu J., Fan X., Sha L.N., Wang Y., Kang H.-Y., Zhou Y.H., Zhang H.Q. Phylogeny and maternal donor of *Roegneria* and its affinitive genera (Poaceae: Triticeae) based on sequence data for two chloroplast DNA regions (*ndhF* and *trnH-psbA*). *J. Syst. Evol.* 2018;56(2):105-119. DOI 10.1111/jse.12291
- Li G., Wang H., Lang T., Li J., La S., Yang E., Yang Z. New molecular markers and cytogenetic probes enable chromosome identification of wheat-*Thinopyrum intermedium* introgression lines for improving protein and gluten contents. *Planta.* 2016;244(4):865-876. DOI 10.1007/s00425-016-2554-y
- Li L.F., Zhang Z.-B., Wang Z.-H., Li N., Sha Y., Wang X.-F., Ding N., Li Y., Zhao J., Wu Y., Gong L., Mafessoni F., Levy A.A., Liu B. 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
- Linc G., Gaál E., Molnár I., Icsó D., Badaeva E., Molnár-Láng M. Molecular cytogenetic (FISH) and genome analysis of diploid wheat-grasses and their phylogenetic relationship. *PLoS One.* 2017;12(3):e0173623. DOI 10.1371/journal.pone.0173623
- Liu L., Luo Q., Teng W., Li B., Li H., Li Y., Li Z., Zheng Q. Development of *Thinopyrum ponticum*-specific molecular markers and FISH probes based on SLAF-seq technology. *Planta.* 2018;247(5):1099-1108. DOI 10.1007/s00425-018-2845-6
- Liu Q.-L., Liu L., Ge S., Fu L.-P., Bai S.-Q., Lv X., Wang Q.-K., Chen W., Wang F.-Y., Wang L.-H., Yan X.-B., Lu B.-R. Endo-allopolyploidy of autopolyploids and recurrent hybridization – A possible mechanism to explain the unresolved Y-genome donor in polyploid *Elymus* species (Triticeae: Poaceae). *J. Syst. Evol.* 2020;60(2):344-360. DOI 10.1111/jse.12659
- Liu Y., Song W., Song A., Wu C., Ding J., Yu X., Song J., Liu M., Yang X., Jiang C., Zhao H., Li X., Cui L., Li H., Zhang Y. Hybridization domestication and molecular cytogenetic characterization of new germplasm of *Thinopyrum intermedium* with smGISH at Northeastern China. *Res. Square.* 2023. DOI 10.21203/rs.3.rs-2795377/v1
- Liu Z., Li D., Zhang X. Genetic relationships among five basic genomes St, E, A, B and D in Triticeae revealed by genomic southern and *in situ* hybridization. *J. Integr. Plant Biol.* 2007;49(7):1080-1086. DOI 10.1111/j.1672-9072.2007.00462.x
- Liu Z., Yue W., Li D., Wang R.R., Kong X., Lu K., Wang G., Dong Y., Jin W., Zhang X. Structure and dynamics of retrotransposons at wheat centromeres and pericentromeres. *Chromosoma.* 2008;117(5):445-456. DOI 10.1007/s00412-008-0161-9
- Lucia V., Martinez-Ortega M.M., Rico E., Anamthawat-Jonsson K. Discovery of the genus *Pseudoroegneria* (Triticeae, Poaceae) in the Western Mediterranean on exploring the generic boundaries of *Elymus*. *J. Syst. Evol.* 2019;57(1):23-41. DOI 10.1111/jse.12426
- Luo P.G., Luo H.Y., Chang Z.J., Zhang H.Y., Zhang M., Ren Z.L. Characterization and chromosomal location of Pm40 in common wheat: a new gene for resistance to powdery mildew derived from *Elytrigia intermedium*. *Theor. Appl. Genet.* 2009;118(6):1059-1064. DOI 10.1007/s00122-009-0962-0
- Luo X., Tinker N.A., Fan X., Zhang H., Sha L., Kang H., Ding C., Liu J., Zhang L., Yang R., Zhou Y. Phylogeny and maternal donor of *Kengyilia* species (Poaceae: Triticeae) based on three cpDNA (*matK*, *rbcL* and *trnH-psbA*) sequences. *Biochem. Syst. Ecol.* 2012;44:61-69. DOI 10.1016/j.bse.2012.04.004
- Luo Y.C., Chen C., Wu D.D., Lu J.L., Sha L.N., Fan X., Cheng Y.R., Kang H.Y., Wang Y., Zhou Y.H., Zhang C.B., Zhang H.Q. Confirmation of natural hybridization between *Kengyilia* (StStYYPP) and *Campeiostrachys* (StStYYHH) (Triticeae: Poaceae) based on morphological and molecular cytogenetic analyses. *Cytogenet. Genome Res.* 2022;162(6):334-344. DOI 10.1159/000527781
- Mach J. Polyploid pairing problems: how centromere repeat divergence helps wheat sort it all out. *Plant Cell.* 2019;31(9):1938-1939. DOI 10.1105/tpc.19.00622
- Mahelka V., Kopecký D., Paštová L. On the genome constitution and evolution of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*: Poaceae, Triticeae). *BMC Evol. Biol.* 2011;11:127. DOI 10.1186/1471-2148-11-127
- Navajas-Perez R., Paterson A.H. Patterns of tandem repetition in plant whole genome assemblies. *Mol. Genet. Genomics.* 2009;281(6):579-590. DOI 10.1007/s00438-009-0433-y
- Navajas-Pérez R., Quesada del Bosque M.E., Garrido-Ramos M.A. Effect of location, organization, and repeat-copy number in satellite-DNA evolution. *Mol. Genet. Genomics.* 2009;282(4):395-406. DOI 10.1007/s00438-009-0472-4
- Pereira C.M., Stoffel T.J.R., Callegari-Jacques S.M., Hua-Van A., Capy P., Loreto E.L.S. The somatic mobilization of transposable element *mariner-Mos1* during the *Drosophila* lifespan and its bio-

- logical consequences. *Gene*. 2018;679:65-72. DOI 10.1016/j.gene.2018.08.079
- Pestsova E., Goncharov N., Salina E. Elimination of a tandem repeat of telomeric heterochromatin during the evolution of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1998;97:1380-1386. DOI 10.1007/s001220051032
- Pollak Y., Zelinger E., Raskina O. Repetitive DNA in the architecture, repatterning, and diversification of the genome of *Aegilops speltoides* Tausch (Poaceae, Triticeae). *Front. Plant Sci.* 2018;9:1779. DOI 10.3389/fpls.2018.01779
- Pös O., Radvanszky J., Styk J., Pös Z., Buglyó G., Kajsik M., Budis J., Nagy B., Szemes T. Copy number variation: methods and clinical applications. *Appl. Sci.* 2021;11(2):819. DOI 10.3390/app11020819
- Rabanus-Wallace M.T., Stein N. Chapter 2 – Progress in sequencing of Triticeae genomes and future uses. In: Miedaner T., Korzun V. (Eds.). *Applications of Genetic and Genomic Research in Cereals*. Woodhead Publishing, 2019;19-47. DOI 10.1016/B978-0-08-102163-7.00002-8
- Raskina O., Brodsky L., Belyayev A. Tandem repeats on an eco-geographical scale: outcomes from the genome of *Aegilops speltoides*. *Chromosome Res.* 2011;19(5):607-623. DOI 10.1007/s10577-011-9220-9
- Rodionov A.V., Dobryakova K.S., Nosov N.N., Gnutikov A.A., Punina E.O., Kriukov A.A., Shneyer V.S. Polymorphism of ITS sequences in 35S rRNA genes in *Elymus dahuricus* aggregate species: two cryptic species? *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(3):287-295. DOI 10.18699/VJ19.493
- Rogers S., Bendich A. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 1985;5(2):69-76. DOI 10.1007/BF00020088
- Ruban A.S., Badaeva E.D. Evolution of the S-genomes in *Triticum-Aegilops* alliance: evidences from chromosome analysis. *Front. Plant Sci.* 2018;9:1756. DOI 10.3389/fpls.2018.01756
- Said M., Hřibová E., Danilova T.V., Karafiátová M., Čížková J., Friebe B., Doležel J., Gill B.S., Vrána J. The *Agropyron cristatum* karyotype, chromosome structure and cross-genome homoeology as revealed by fluorescence *in situ* hybridization with tandem repeats and wheat single-gene probes. *Theor. Appl. Genet.* 2018;131:2213-2227. DOI 10.1007/s00122-018-3148-9
- Salina E.A., Adonina I.G. Cytogenetics in the study of chromosomal rearrangement during wheat evolution and breeding. In: Larramendy M.L., Soloneski S. (Eds.). *Cytogenetics – Past, Present and Further Perspectives*. London: IntechOpen, 2019;1-18. DOI 10.5772/intechopen.80486
- Salina E.A., Adonina I.G., Badaeva E.D., Kroupin P.Y., Stasyuk A.I., Leonova I.N., Shishkina A.A., Divashuk M.G., Starikova E.V., Khuat T.M.L., Syukov V.V., Karlov G.I. A *Thinopyrum intermedium* chromosome in bread wheat cultivars as a source of genes conferring resistance to fungal diseases. *Euphytica*. 2015;204:91-101. DOI 10.1007/s10681-014-1344-5
- Šatović-Vukšić E., Plohl M. Satellite DNAs – from localized to highly dispersed genome components. *Genes*. 2023;14(3):742. DOI 10.3390/genes14030742
- Sha L.-N., Liang X., Tang Y., Xu J.Q., Chen W.J., Cheng Y.R., Wu D.D., Zhang Y., Wang Y., Kang H.Y., Zhang H.Q., Zhou Y.H., Shen Y.H., Fan X. Evolutionary patterns of plastome resolve multiple origins of the Ns-containing polyploid species in Triticeae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2022;175:107591. DOI 10.1016/j.ympev.2022.107591
- Shams I., Raskina O. Intraspecific and intraorganismal copy number dynamics of retrotransposons and tandem repeat in *Aegilops speltoides* Tausch (Poaceae, Triticeae). *Protoplasma*. 2018;255(4):1023-1038. DOI 10.1007/s00709-018-1212-6
- Sharma S., Raina S.N. Organization and evolution of highly repeated satellite DNA sequences in plant chromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 2005;109(1-3):15-26. DOI 10.1159/000082377
- Shcherban A.B. Repetitive DNA sequences in plant genomes. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2015;5:159-167. DOI 10.1134/S2079059715030168
- Shi Q., Guo X., Su H., Zhang Y., Hu Z., Zhang J., Han F. Autopolloid origin and rapid diploidization of the tetraploid *Thinopyrum elongatum* revealed by genome differentiation and chromosome pairing in meiosis. *Plant J.* 2023;113(3):536-545. DOI 10.1111/tjp.16066
- Su H., Liu Y., Liu C., Shi Q., Huang Y., Han F. Centromere satellite repeats have undergone rapid changes in polyploid wheat subgenomes. *Plant Cell*. 2019;31(9):2035-2051. DOI 10.1105/tpc.19.00133
- Tan L., Zhang H.-Q., Chen W.-H., Deng M.-Q., Sha L.-N., Fan X., Kang H.-Y., Wang Y., Wu D.-D., Zhou Y.-H. Genome composition and taxonomic revision of *Elymus purpuraristatus* and *Roegneria calcicola* (Poaceae: Triticeae) based on cytogenetic and phylogenetic analyses. *Biol. J. Linn. Soc.* 2021;196(2):242-255. DOI 10.1093/botlinnean/boaa103
- Tang S., Tang Z., Qiu L., Yang Z., Li G., Lang T., Zhu W., Zhang J., Fu S. Developing new oligo probes to distinguish specific chromosomal segments and the A, B, D genomes of wheat (*Triticum aestivum* L.) using ND-FISH. *Front. Plant Sci.* 2018;9:1104. DOI 10.3389/fpls.2018.01104
- Tao X., Liu B., Dou Q. The *Kengyiliahirsuta* karyotype polymorphisms as revealed by FISH with tandem repeats and single-gene probes. *Comp. Cytogenet.* 2021;15(4):375-392. DOI 10.3897/comp.cytogen.v15.i4.71525
- Thakur J., Packiaraj J., Henikoff S. Sequence, chromatin and evolution of satellite DNA. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(9):4309. DOI 10.3390/ijms22094309
- Vershinin A., Svitashov S., Gummesson P.O., Salomon B., von Bothmer R., Bryngelsson T. Characterization of a family of tandemly repeated DNA sequences in Triticeae. *Theor. Appl. Genet.* 1994;89(2-3):217-225. DOI 10.1007/BF00225145
- Vershinin A.V., Elisafenko E.A., Evtushenko E.V. Genetic redundancy in rye shows in a variety of ways. *Plants*. 2023;12(2):282. DOI 10.3390/plants12020282
- Wang L., Shi Q., Su H., Wang Y., Sha L., Fan X., Kang H., Zhang H., Zhou Y. St<sub>2</sub>-80: a new FISH marker for St genome and genome analysis in Triticeae. *Genome*. 2017;60(7):553-563. DOI 10.1139/gen-2016-0228
- Wang Q., Xiang J., Gao A., Yang X., Liu W., Li X., Li L. Analysis of chromosomal structural polymorphisms in the St, P, and Y genomes of Triticeae (Poaceae). *Genome*. 2010;53(3):241-249. DOI 10.1139/g09-098
- Wang R.R.C., Lu B. Biosystematics and evolutionary relationships of perennial Triticeae species revealed by genetic analyses. *J. Syst. Evol.* 2014;52(6):697-705. DOI 10.1111/jse.12084
- Wang R.R.C., Larson S.R., Jensen K.B., Bushman B.S., DeHaan L.R., Wang S., Yan X. Genome evolution of intermediate wheatgrass as revealed by EST-SSR markers developed from its three progenitor diploid species. *Genome*. 2015;58(2):63-70. DOI 10.1139/gen-2014-0186
- Wang S., Wang C., Wang Y., Wang Y., Chen C., Ji W. Molecular cytogenetic identification of two wheat-*Thinopyrum ponticum* substitution lines conferring stripe rust resistance. *Mol. Breed.* 2019;39(143):1-11. DOI 10.1007/s11032-019-1053-9
- Wu D., Zhu X., Tan L., Zhang H., Sha L., Fan X., Wang Y., Kang H., Lu J., Zhou Y. Characterization of each St and Y genome chromosome of *Roegneria grandis* based on newly developed FISH markers. *Cytogenet. Genome Res.* 2021;161(3-4):213-222. DOI 10.1159/000515623
- Wu D., Yang N., Xiang Q., Zhu M., Fang Z., Zheng W., Lu J., Sha L., Fan X., Cheng Y., Wang Y., Kang H., Zhang H., Zhou Y. *Pseudoroegneria libanotica* intraspecific genetic polymorphism revealed by fluorescence *in situ* hybridization with newly identified tandem repeats and wheat single-copy gene probes. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(23):14818. DOI 10.3390/ijms232314818
- Wu D.-D., Liu X.-Y., Yu Z.-H., Tan L., Lu J.-L., Cheng Y.-R., Sha L.-N., Fan X., Kang H.-Y., Wang Y., Zhou Y.-H., Zhang C.-B., Zhang H.-Q. Recent natural hybridization in *Elymus* and *Campeioctachys* of Tri-

- ticeae: evidence from morphological, cytological and molecular analyses. *Biol. J. Linn. Soc.* 2023a;201(4):428-442. DOI 10.1093/botlinnean/boac057
- Wu D., Zhai X., Chen C., Yang X., Cheng S., Sha L., Cheng Y., Fan X., Kang H., Wang Y., Liu D., Zhou Y., Zhang H. A chromosome level genome assembly of *Pseudoroegneria libanotica* reveals a key *Kcs* gene involves in the cuticular wax elongation for drought resistance. *Authorea*. 2023b. DOI 10.22541/au.168484360.02472399/v1
- Yan C., Sun G., Sun D. Distinct origin of the Y and St genome in *Elymus* species: evidence from the analysis of a large sample of St genome species using two nuclear genes. *PLoS One*. 2011; 6(10):e26853. DOI 10.1371/journal.pone.0026853
- Yang Z.J., Li G.-R., Feng J., Jiang H.R., Ren Z.L. Molecular cytogenetic characterization and disease resistance observation of wheat-*Dasyphyrum breviaristatum* partial amphiploid and its derivatives. *Hereditas*. 2005;142(2005):80-85. DOI 10.1111/j.1601-5223.2005.01918.x
- Zeng J., Fan X., Sha L.N., Kang H.Y., Zhang H.Q., Liu J., Wang X.L., Yang R.W., Zhou Y.H. Nucleotide polymorphism pattern and multiple maternal origin in *Thinopyrum intermedium* inferred by *trnH-psbA* sequences. *Biol. Plant*. 2012;56:254-260. DOI 10.1007/s10535-012-0084-4
- Zhang J., Zhang J., Liu W., Wu X., Yang X., Li X., Lu Y., Li L. An intercalary translocation from *Agropyron cristatum* 6P chromosome into common wheat confers enhanced kernel number per spike. *Planta*. 2016;244(4):853-864. DOI 10.1007/s00425-016-2550-2
- Zhang Y., Zhang J., Huang L., Gao A., Zhang J., Yang X., Liu W., Li X., Li L. A high-density genetic map for P genome of *Agropyron* Gaertn. based on specific-locus amplified fragment sequencing (SLAF-seq). *Planta*. 2015;242(6):1335-1347. DOI 10.1007/s00425-015-2372-7

---

#### ORCID

P.Yu. Kroupin orcid.org/0000-0001-6858-3941  
A.I. Yurkina orcid.org/0000-0002-1527-0658  
A.A. Kocheshkova orcid.org/0000-0003-1924-6708

D.S. Ulyanov orcid.org/0000-0002-5880-5931  
G.I. Karlov orcid.org/0000-0002-9016-103X  
M.G. Divashuk orcid.org/0000-0001-6221-3659

**Благодарности.** Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 21-16-00123.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 31.07.2023. После доработки 24.10.2023. Принята к публикации 25.10.2023.