

DOI 10.18699/vjgb-24-68

Влияние хромосом 1A и 1D *T. aestivum* на фертильность аллоплазматических рекомбинантных линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum* в зависимости от цитоядерной совместимости

Л.А. Першина ^{1,2} , Н.В. Трубачеева ^{1,2}, В.К. Шумный ¹

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

 pershina@bionet.nsc.ru

Аннотация. Изучено влияние хромосом 1A и 1D *T. aestivum* L. на фертильность рекомбинантных аллолиний мягкой пшеницы одного происхождения, имеющих цитоплазму ячменя *H. vulgare* L. и разный уровень цитоядерной совместимости. Аллолиния Л-56 включает преимущественно полностью стерильные (ПС) и частично стерильные (ЧС) растения; аллолиния Л-57 – частично фертильные (ЧФ) растения, а линия Л-58 – фертильные (Ф) растения. Результаты анализа морфобиологических признаков и окраски пыльцы указывают на проявление полной или частичной мужской стерильности у растений аллолиний Л-56 и Л-57. Для разделения генотипов с цитоядерной коадаптацией и генотипов, у которых цитоядерная совместимость нарушена, выполнен ПЦР-анализ 18S/5S митохондриального (мт) повтора. Показано, что ПС, ЧС, ЧФ и часть Ф растений характеризуются гетероплазмией (наличием копий мтДНК ячменя и пшеницы), что ассоциировано с нарушением цитоядерной совместимости. У основной части фертильных растений выявлена гомоплазмия (гм) пшеничного типа, что ассоциировано с цитоядерной коадаптацией. Растения аллолиний, использованные в качестве материнских генотипов, были скрещены с пшенично-ржаными замещенными линиями 1R(1A) и 1R(1D). В F₁ все растения комбинаций ЧФ×1R(1A) и ЧФ×1R(1D) были фертильными, а в F₂ наблюдали расщепление, близкое к 3 (фертильные) : 1 (стерильные). Эти результаты впервые показали, что в хромосомах 1A и 1D локализовано по одному доминантному гену *Rf*, контролирующему восстановление мужской фертильности мягкой пшеницы, несущей цитоплазму *H. vulgare*. Все растения F₁ комбинаций ПС×1R(1A), ПС×1R(1D), ЧС×1R(1A), ЧС×1R(1D) стерильные, что указывает на то, что одной дозы генов, локализованных в хромосомах пшеницы 1A или 1D, недостаточно для восстановления мужской фертильности у ПС и ЧС растений. Все растения гибридных комбинаций Ф_{гм}×1R(1A) и Ф_{гм}×1R(1D) и в F₁ и в F₂ были фертильными, т.е. у аллолиний с цитоядерной коадаптацией нет зависимости проявления фертильности от влияния хромосом пшеницы 1A и 1D.
Ключевые слова: аллолинии (*H. vulgare*)-*T. aestivum*; хромосомы 1A и 1D; мтДНК; нарушение цитоядерной совместимости; цитоядерная коадаптация; гены *Rf*.

Для цитирования: Першина Л.А., Трубачеева Н.В., Шумный В.К. Влияние хромосом 1A и 1D *T. aestivum* на фертильность аллоплазматических рекомбинантных линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum* в зависимости от цитоядерной совместимости. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(6):610-618. DOI 10.18699/vjgb-24-68

Финансирование. Исследование выполнено в рамках бюджетного проекта FWNR-2022-0017.

Благодарности. Авторы благодарны д.б.н. А.И. Щаповой за предоставленные для работы пшенично-ржанные замещенные линии.

The effect of *T. aestivum* chromosomes 1A and 1D on fertility of alloplasmic recombinant (*H. vulgare*)-*T. aestivum* lines depending on cytonuclear compatibility

Л.А. Pershina ^{1,2} , N.V. Trubacheeva ^{1,2}, V.K. Shumny ¹

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

 pershina@bionet.nsc.ru

Abstract. The effect of *T. aestivum* L. chromosomes 1A and 1D on fertility of recombinant bread wheat allolines of the same origin carrying the cytoplasm of barley *H. vulgare* L. and different levels of cytonuclear compatibility was studied. Alloline L-56 included mainly fully sterile (FS) and partially sterile (PS) plants, alloline L-57 included partially fertile (PF) plants and line L-58 included fertile (F) ones. Analysis of morphobiological traits and pollen paint-

ing indicated complete or partial male sterility in plants of allolines L-56 and L-57. To differentiate genotypes with cytonuclear coadaptation and genotypes with cytonuclear incompatibility, PCR analysis of the 18S/5S mitochondrial (mt) repeat was performed. Heteroplasmy (simultaneous presence of barley and wheat mtDNA copies) was found in FS, PS, PF and some F plants, which was associated with a violation of cytonuclear compatibility. Wheat-type homoplasmy (hm) was detected in the majority of the fertile plants, which was associated with cytonuclear coadaptation. The allolines used as maternal genotypes were crossed with wheat-rye substitution lines 1R(1A) and 1R(1D). In F₁, all plants of PF×1R(1A) and PF×1R(1D) combinations were fertile, and in F₂, a segregation close to 3 (fertile) : 1 (sterile) was observed. These results showed for the first time that chromosomes 1A and 1D carry one dominant *Rf* gene, which controls the restoration of male fertility of bread wheat carrying the cytoplasm of *H. vulgare*. All plants of F₁ combinations FS×1R(1A), FS×1R(1D), PS×1R(1A), PS×1R(1D) were sterile, which indicates that a single dose of genes localized on wheat chromosomes 1A or 1D is not enough to restore male fertility in FS and PS plants. All plants of hybrid combinations F(hm)×1R(1A) and F(hm)×1R(1D) in both F₁ and F₂ were fertile, that is, fertility of allolines with cytonuclear coadaptation does not depend on wheat chromosomes 1A and 1D.

Key words: allolines (*H. vulgare*)-*T. aestivum*; chromosomes 1A and 1D; mtDNA; violation of cytonuclear compatibility; cytonuclear coadaptation; *Rf* genes.

For citation: Pershina L.A., Trubacheeva N.V., Shumny V.K. The effect of *T. aestivum* chromosomes 1A and 1D on fertility of alloplasmic recombinant (*H. vulgare*)-*T. aestivum* lines depending on cytonuclear compatibility. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(6):610-618. DOI 10.18699/vjgb-24-68

Введение

Аллоплазматические линии (аллолинии) образуются в результате повторяющихся скрещиваний отдаленных гибридов F₁ с пыльцевым родителем и сочетают цитоплазму материнского вида с ядерным геномом отцовского генотипа (Tsunewaki, 1996). Замещение цитоплазмы приводит к нарушениям регуляции ядерно-митохондриальных и ядерно-хлоропластных взаимодействий (Yang et al., 2008; Crosatti et al., 2013; Soltani et al., 2016), что может вызывать изменения в развитии растений (Бадаева и др., 2006), их устойчивости к стрессовым факторам (Булойчик и др., 2002; Talukder et al., 2015; Takenaka et al., 2019), в проявлении морфологических и агрономических признаков (Liu C.G. et al., 2002; Atienza et al., 2008; Tao et al., 2011; Климушина и др., 2013). Наиболее характерным выражением цитоядерного конфликта, в том числе у аллолиний, является цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) (Tsunewaki, 1996), связанная с мутациями генов митохондриального генома, оказывающих негативное влияние на развитие органов цветка и пыльцы (Yang et al., 2008).

У ряда экономически важных культур ЦМС-линии в сочетании с линиями, поддерживающими ЦМС, и линиями-носителями гена (генов) восстановления мужской фертильности (*Rf*, *restorer-of-fertility*) используют в гибридной селекции (Islam et al., 2014; Bohra et al., 2016; Gupta et al., 2019). В этой технологии ключевая роль принадлежит источникам ЦМС и генов *Rf*. Кроме того, замещение цитоплазмы способствует увеличению цитоплазматического разнообразия растений, что считают возможным и необходимым для таких культур, как рис (Liu Y. et al., 2016), сахарный тростник (Rafee et al., 2010), мягкая пшеница (Liu C.G. et al., 2002; Климушина и др., 2013; Першина и др., 2018).

В связи с этим изучение особенностей образования аллолиний и генетического контроля восстановления их фертильности считается важной задачей как для поиска новых генетических систем ЦМС-*Rf* в гибридной селекции, так и для получения новых генотипов для традиционных селекционных программ. У мягкой пшеницы внимание уделено восстановлению мужской фертильности геноти-

пов, несущих цитоплазму *T. timopheevii* (Sinha et al., 2013), *H. chilense* (Martin et al., 2010), видов *Aegilops* (Tsunewaki, 2015; Hohn, Lukaszewski, 2016), а в наших работах – генотипов с цитоплазмой культурного ячменя *H. vulgare* (Першина и др., 2012; Trubacheeva et al., 2021). Основная часть генов *Rf* у пшеницы организована в кластеры на хромосомах 1, 2 и 6-й гомеологичных групп, а самой насыщенной является хромосома 1 (Gupta et al., 2019).

В предыдущем исследовании мы впервые установили, что в коротком плече хромосомы 1В мягкой пшеницы локализован доминантный ген, контролирующей восстановление мужской фертильности пшеницы на цитоплазме *H. vulgare* (Trubacheeva et al., 2021). В настоящей работе мы продолжили исследовать роль первой гомеологичной группы в восстановлении фертильности у аллолиний мягкой пшеницы с цитоплазмой *H. vulgare*. Была поставлена задача изучить влияние хромосом 1A и 1D *T. aestivum* на проявление мужской фертильности рекомбинантных аллолиний мягкой пшеницы, носителей цитоплазмы культурного ячменя, в зависимости от уровня их фертильности и цитоядерной совместимости. Такой подход дал возможность выявить аллолинии (*H. vulgare*)-*T. aestivum* – модели для определения локализации генов *Rf* в хромосомах 1A и 1D.

Материалы и методы

Растительный материал и особенности его получения. Изучены три рекомбинантные аллолинии (*H. vulgare*)-*T. aestivum*, сформированные от отдельных растений беккроссных (BC) поколений ячменно-пшеничного гибрида *H. vulgare* (Неполегающий) × *T. aestivum* (Саратовская 29), последовательно опыленного сортами пшеницы Саратовская 29, Мироновская 808, Пиротрикс 28, Саратовская 29, Пиротрикс 28 (рис. 1). В предыдущих работах было установлено, что Саратовская 29 является закрепителем стерильности у беккроссных потомков ячменно-пшеничных гибридов (Першина и др., 2012), а Мироновская 808 и Пиротрикс 28 – восстановителями мужской фертильности аллолиний пшеницы с цитоплазмой культурного ячменя (Pershina et al., 1998; Першина и др., 2012). BC₁–BC₄-поколения, как и ячменно-пше-

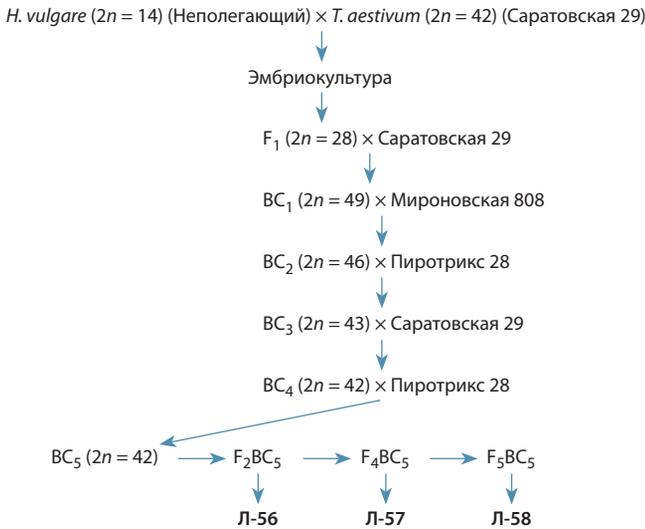


Рис. 1. Схема получения аллоплазматических рекомбинантных линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum* Л-56, Л-57, Л-58.

нический гибрид, характеризовались мужской стерильностью, но женской фертильностью, а в поколении BC₅ были выделены отдельные 42-хромосомные растения с частично восстановленной мужской фертильностью. От этих растений получены самоопыленные поколения F₂BC₅–F₅BC₅, источники изученных аллолиний. Аллолиния Л-56 выделена из F₂BC₅ поколения, а аллолинии Л-57 и Л-58 – из F₄BC₅ и F₅BC₅ поколений соответственно. Начиная с F₃BC₅ для формирования каждого следующего самоопыленного поколения использовали растения с максимальной продуктивностью.

Методы изучения морфобиологических характеристик аллоплазматических рекомбинантных линий. Растения линий охарактеризованы по уровню фертильности: ПС – полностью стерильные (нет зерен); ЧС – частично стерильные (1–9 зерен); ЧФ – частично фертильные (10–19); Ф – фертильные (более 19 зерен в главном колосе). Оценивали не менее 20 растений каждой линии, выращенных в гидропонной теплице.

У растений с разным уровнем фертильности проанализирована фертильность пыльцы, которая используется в качестве основного критерия оценки мужской фертильности/стерильности. Для этой цели из пыльников, вычленившихся во время цветения из трех разных цветков одного колоса, на предметном стекле готовили давленные препараты в растворе Люголя (1 % раствор йода в водном растворе йодида калия). У растений каждой аллолинии определяли высоту, число колосьев, длину главного колоса, число колосков в главном колосе, число зерен в главном колосе и растении, массу 1000 зерен. Различия между средними значениями изученных признаков у аллолинии Л-56 по сравнению с линией Л-57, а у аллолинии Л-57 по сравнению с аллолинией Л-58 оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента. Данные анализировали с помощью Statistica v.7.0.61.0.

ПЦР-анализ 18S/5S митохондриального повтора. В качестве ПЦР-маркеров митохондриального (мт) генома были использованы праймеры к 18S/5S повтору. Их

структура и условия ПЦР описаны в работе (Coulthart et al., 1993). Разделение продуктов ПЦР проводилось в 1.5 % агарозном геле, содержащем бромистый этидий; визуализацию осуществляли с помощью системы геледокументирования Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США). Тотальная ДНК была выделена из зеленых листьев, срезанных до колошения, согласно ранее опубликованному протоколу (Current Protocols..., 1987). Анализировали от одного до восьми образцов от отдельных генотипов. В этой части работы контролем при изучении рекомбинантных аллолиний служили линия ячменя сорта Неполегающий, источник цитоплазмы аллолиний, и сорт мягкой пшеницы Пиротрикс 28, источник цитоплазмы пшеницы (один из рекуррентных генотипов).

Оценка фертильности гибридов между аллоплазматическими линиями и пшенично-ржаными замещенными линиями 1A(1R) и 1D(1R) в F₁ и F₂. Для оценки влияния хромосом пшеницы 1A и 1D на фертильность аллолиний (*H. vulgare*)-*T. aestivum* в зависимости от уровня их цитоядерной совместимости растения этих линий как материнские генотипы скрещивали с пшенично-ржаными замещенными линиями 1A(1R) и 1D(1R), чтобы заместить в F₁ по одной хромосоме 1A и 1D аллолиний на хромосому ржи 1R. Использованные в работе линии 1A(1R) и 1D(1R) получены в результате замещения соответствующих хромосом пшеницы сорта Саратовская 29 на хромосому ржи 1R сорта Онохойская (Shchapova, Kravtsova, 1982). В гибридизацию были включены ПС и ЧС растения аллолинии Л-56, ЧФ растения аллолинии Л-57 и отдельные Ф растения аллолинии Л-58. До цветения колосья материнских растений, а также растений F₁ и F₂, выращиваемых в гидропонной теплице, помещали под пергаментные изоляторы. У индивидуальных растений F₁ и F₂ оценивали завязываемость семян в главном колосе. Разделение на стерильные и фертильные растения в F₂ проводили согласно рекомендациям (Sinha et al., 2013): полностью стерильные растения и растения, завязавшие не более четырех зерен в главном колосе, относили к стерильным; растения, завязавшие в главном колосе от пяти зерен и более, – к фертильным. Для оценки соответствия между наблюдаемым и теоретически ожидаемым расщеплением в F₂ на фертильные и стерильные растения использовали критерий Пирсона (Хи-квадрат) ($\alpha = 0.05$).

Результаты

Характеристика рекомбинантных аллолиний

Аллолиния Л-56 представлена в основном частично стерильными (60 %) и полностью стерильными растениями (35 %); частота частично фертильных растений составила 5 % (табл. 1).

Большинство растений у аллолинии Л-57 – частично фертильные (85 %), остальные – частично стерильные (5 %) и фертильные (10 %). Аллолинию Л-58 составили фертильные (92 %) и частично фертильные растения (8 %). Образцы колосьев растений с разным уровнем фертильности представлены на рис. 2.

У полностью стерильных растений рыльца нормально развиты, но пыльники отсутствуют. У частично стерильных и частично фертильных растений пыльники по срав-

Таблица 1. Уровень фертильности растений рекомбинантных аллолиний (*H. vulgare*)-*T. aestivum* Л-56, Л-57, Л-58

Аллолиния	Количество изученных растений	Число и частота (%) растений			
		ПС (0)	ЧС (1–9) [#]	ЧФ (10–19) [#]	Ф (>19) [#]
Л-56	20	7 (35 %)	12 (60 %)	1 (5 %)	0
Л-57	20	0	1 (5 %)	17 (85 %)	2 (10 %)
Л-58	25	0	0	2 (8 %)	23 (92 %)

Примечание. ПС – полная стерильность; ЧС – частичная стерильность; ЧФ – частичная фертильность; Ф – фертильность. [#] – число зерен в главном колосе.

нению с фертильными растениями недостаточно развиты и не все пыльцевые зерна окрашены (рис. 3).

Сравнение средних значений показателей изученных признаков у аллолинии Л-56, представленной стерильными и частично стерильными растениями, по сравнению с Л-57, состоящей в основном из частично фертильных растений, показало, что аллолиния Л-56 превосходит Л-57 только по числу колосьев на растение. Значение остальных показателей признаков (высота растений, длина главного колоса, число колосков в главном колосе, число зерен в главном колосе и в растении) у Л-56 достоверно ниже, чем у Л-57 (табл. 2).

У аллолинии Л-57 длина главного колоса, число колосков в главном колосе, число зерен в главном колосе и число зерен в растении достоверно ниже по сравнению с аллолинией Л-58, представленной преимущественно фертильными растениями. По массе 1000 зерен различий между изученными аллолиниями не обнаружено.



Рис. 2. Колосья растений: 1, 2 – фертильных; 3 – частично фертильного; 4 – частично стерильного; 5 – полностью стерильного.

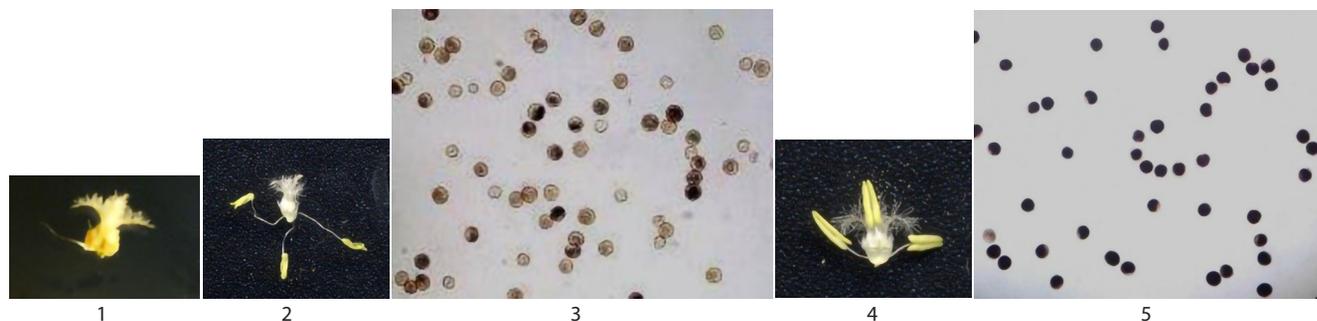


Рис. 3. Рыльце (1) полностью стерильного растения; рыльце и пыльники (2), пыльцевые зерна (3) частично фертильного растения; рыльце и пыльники (4) и пыльцевые зерна (5) фертильного растения.

Таблица 2. Характеристика рекомбинантных аллолиний (*H. vulgare*)-*T. aestivum* по морфобиологическим признакам

Признак растений	Л-56	Л-57	Л-58
Высота растений, см	76.38 ± 2.66 ^(**)	87.81 ± 1.97	89.55 ± 2.0
Число колосьев в растении	4.78 ± 0.32 [*]	3.92 ± 0.24	3.85 ± 0.22
Длина главного колоса, см	6.07 ± 0.41 ^(***)	8.12 ± 0.34 ^(*/)	9.14 ± 0.23
Число колосков в главном колосе	13.21 ± 0.67 ^(***)	16.50 ± 0.25 ^(*/)	18.15 ± 0.65
Число зерен в главном колосе	3.76 ± 1.98 ^(***)	16.35 ± 1.66 ^(***/)	33.10 ± 2.56
Число зерен в растении	15.57 ± 6.35 ^(***)	52.50 ± 7.84 ^(***/)	115.74 ± 13.67
Масса 1000 зерен, г	35.32 ± 1.18	34.25 ± 1.12	35.67 ± 1.31

Примечание. Разница по сравнению с Л-57 достоверно больше при ^{*} $p < 0.05$; достоверно меньше при ^(**) $p < 0.01$ и ^(***) $p < 0.001$; по сравнению с Л-58 – достоверно меньше при ^(*/) $p < 0.05$ и ^(***/) $p < 0.001$.

Результаты анализа последовательности 18S/5S мтДНК у рекомбинантных аллолиний

У всех изученных образцов аллолинии Л-56, включая полностью стерильные, частично стерильные растения и одно частично фертильное, обнаружена гетероплазмия (наличие копий 18S/5S мтДНК ячменя и пшеницы) (рис. 4, табл. 3). У аллолинии Л-57 у образцов шести изученных частично фертильных растений и двух растений, отнесенных к группе фертильных, также выявлена гетероплазмия. У аллолинии Л-58 образцы двух частично фертильных и двух фертильных растений показали гетероплазмю, а шести фертильных растений – гомоплазмю пшеничного типа. Результаты выполненного анализа, согласно данным (Аксыонова et al., 2005; Trubacheeva et al., 2021), послужили для разделения аллоплазматических генотипов на категории с разным уровнем цитоядерной несовместимости (см. табл. 3). У растений с гетероплазмией цитоядерная совместимость нарушена, у растений с гомоплазмией – не нарушена.

Анализ гибридов, полученных между рекомбинантными аллолиниями и пшенично-ржаными замещенными линиями 1R(1A) и 1R(1D)

Отдельные полностью стерильные и частично стерильные растения аллолинии Л-56 были опылены пылью пшенично-ржаных замещенных линий 1R(1A) и 1R(1D). Семена завязались во всех комбинациях скрещивания, что определилось проявлением женской фертильности у ПС и ЧС растений. Из завязавшихся семян было выращено 18 растений F₁ комбинации Л-56(ПС) × 1R(1A), 20 растений комбинации Л-56(ПС) × 1R(1D), 15 растений комбинации Л-56(ЧС) × 1R(1A) и 17 растений комбинации Л-56(ЧС) × 1R(1D). Все растения F₁ этих гибридных комбинаций не завязали семян от самоопыления (табл. 4).

Полная стерильность гибридов F₁, гетерозиготных по хромосомам пшеницы 1A и 1D, указывает на то, что фертильность частично стерильных (ЧС) растений зависит от влияния хромосомы 1A и хромосомы 1D. Однако одной дозы гена, локализованного на каждой из этих хромосом,

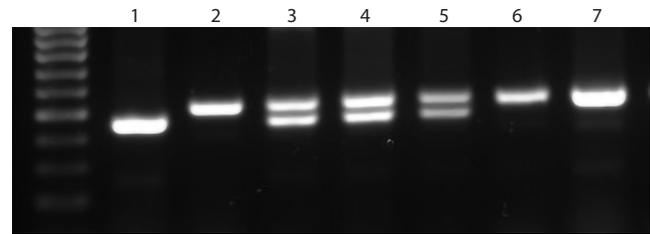


Рис. 4. Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных с использованием маркера мтДНК 18S/5S.

1 – ячмень *H. vulgare* сорт Неполегающий; 2 – пшеница *T. aestivum* сорт Пиротрикс 28; 3 – полностью стерильное растение аллолинии Л-56; 4 – частично стерильное растение аллолинии Л-56; 5 – частично фертильное растение аллолинии Л-57; 6, 7 – фертильные растения аллолинии Л-58.

недостаточно для восстановления мужской фертильности растений.

Из аллолинии Л-57 в гибридизацию с пшенично-ржаными замещенными линиями были включены частично фертильные растения. Из семян гибридной комбинации Л-57(ЧФ) × 1R(1A) было выращено 15, а комбинации Л-57(ЧФ) × 1R(1D) – 12 растений F₁. Все растения F₁ были фертильными, что говорит о том, что восстановление фертильности у этих аллолиний является доминантным признаком. Анализ завязывания семян в главном колосе 74 растений популяции F₂ гибридной комбинации Л-57(ЧФ) × 1R(1A) выявил 51 растение из группы фертильных и 23 растения из группы стерильных. Наблюдаемое соотношение при расщеплении на фертильные и стерильные растения в F₂ соответствует теоретически ожидаемому 3 (фертильные) : 1 (стерильные) со значением $\chi^2_{\text{факт}} = 1.46$, что ниже статистического значения $\chi^2_{0.05} = 3.84$.

Аналогичный результат получен и для гибридной комбинации Л-57(ЧФ) × 1R(1D). Из 61 изученного растения F₂ данной комбинации 45 растений отнесены к группе фертильных, а 16 растений – к группе стерильных: значение $\chi^2_{\text{факт}} = 0.05$ (см. табл. 4). Эти результаты указывают на зависимость фертильности аллолинии Л-57 от влияния хромосом 1A и 1D пшеницы. Соотношение фертильных

Таблица 3. Результаты изучения 18S/5S мтДНК у рекомбинантных аллолиний (*H. vulgare*)-*T. aestivum*

Линия	Уровень фертильности	Число изученных растений	18S/5S мтДНК	Цитоядерная совместимость
Л-56	ПС	5	Я + П	Нарушена
	ЧС	8		
	ЧФ	1		
Л-57	ЧФ	6	Я + П	Нарушена
	Ф	2		
Л-58	ЧФ	2	Я + П	Нарушена
	Ф	2		
	Ф	6	П	
Неполегающий	Ф	2	Я	Не нарушена
Пиротрикс 28	Ф	2	П	Не нарушена

Примечание. Я – ячмень; П – пшеница; Неполегающий – сорт ячменя; Пиротрикс 28 – сорт мягкой пшеницы.

Таблица 4. Завязываемость семян у гибридов F₁ и расщепление по завязыванию семян у гибридов F₂, полученных от скрещивания рекомбинантных аллолиний (*H. vulgare*)-*T. aestivum* с пшенично-ржаными замещенными линиями 1R(1A) и 1R(1D) сорта пшеницы Саратовская 29

Гибридная комбинация	Поколение	Растений			Ожидаемое расщепление в F ₂	$\chi^2_{\text{факт}}$	p-value
		всего	фертильных	стерильных			
Л-56(ПС) × 1R(1A)	F ₁	18	0	18	–		
Л-56(ПС) × 1R(1D)	F ₁	20	0	20	–		
Л-56(ЧС) × 1R(1A)	F ₁	15	0	15	–		
Л-56(ЧС) × 1R(1D)	F ₁	17	0	17	–		
Л-57(ЧФ) × 1R(1A)	F ₁	15	15	–			
	F ₂	74	51	23	3:1	1.46	0.227
Л-57(ЧФ) × 1R(1D)	F ₁	12	12	–			
	F ₂	61	45	16	3:1	0.05	0.824
Л-58(Ф _{гм}) × 1R(1A)	F ₁	14	14	–			
	F ₂	75	75	–			
Л-58(Ф _{гм}) × 1R(1D)	F ₁	15	15	–			
	F ₂	86	86	–			

и стерильных растений в F₂ популяциях комбинации Л-57(ЧФ) × 1R(1A) и Л-57(ЧФ) × 1R(1D) показывает, что восстановление мужской фертильности у ЧФ растений аллолинии Л-57 в каждом случае контролируется одним доминантным геном. Один из таких генов локализован в хромосоме 1A, а другой – в хромосоме 1D мягкой пшеницы.

Иной результат получен при скрещивании полностью фертильных растений аллолинии Л-58, у которых выявлена гомоплазмия пшеничного типа, с пшенично-ржаными замещенными линиями. Все растения F₁ и F₂ комбинации Л-58(Ф) × 1R(1A) и комбинации Л-58(Ф) × 1R(1D) были фертильными (см. табл. 4). Из этого следует, что фертильность включенных в скрещивания с пшенично-ржаными замещенными линиями растений рекомбинантной аллолинии Л-58 не зависит от влияния хромосом мягкой пшеницы 1A и 1D.

Обсуждение

Между культурным ячменем *H. vulgare* и мягкой пшеницей *T. aestivum* сильно выражена межгеномная несовместимость, препятствующая как скрещиванию между ними, так и восстановлению фертильности гибридов. Однако благодаря использованию методов преодоления несовместимости и подбору родительских генотипов оказалось возможным получить жизнеспособные ячменно-пшеничные гибриды F₁ с женской фертильностью (Pershina et al., 1998). Это позволило включить гибриды в возвратные скрещивания с разными сортами мягкой пшеницы, что привело к вытеснению хромосом ячменя, образованию рекомбинантного ядерного генома пшеницы и замещению цитоплазмы пшеницы на цитоплазму ячменя у формирующихся аллоплазматических генотипов (Aksyonova et al., 2005; Першина и др., 2012).

Изученные в настоящей работе рекомбинантные аллолинии (*H. vulgare*)-*T. aestivum* Л-56, Л-57 и Л-58 имеют

одинаковое происхождение, но характеризуются разной выраженностью морфобиологических признаков и разным уровнем фертильности. Рекомбинантный ядерный геном этих линий сформирован с участием сортов мягкой пшеницы Саратовская 29, Мироновская 808 и Пиротрикс 28. Проявление морфобиологических признаков у линии Л-56 относительно аллолинии Л-57, представленной частично фертильными растениями, подавлено. Аллолиния Л-56 расщепляется на полностью стерильные растения и растения с низким уровнем фертильности. По-видимому, у аллолинии Л-56 в ядерном геноме преобладает генетический материал сорта пшеницы Саратовская 29, который служит закрепителем стерильности мягкой пшеницы на цитоплазме культурного ячменя (Першина и др., 2012).

Отсутствие пыльников у полностью стерильных растений и неполное окрашивание пыльцевых зерен у частично фертильных растений обусловлено ЦМС, которая есть результат нарушения ядерно-митохондриальных взаимодействий (Yang et al., 2008). ПЦП-анализ 18S/5S мт-повтора у аллолиний Л-56 и Л-57 обнаружил гетероплазмю – наличие двух вариантов мтДНК, ячменных и пшеничных. Гетероплазмия мтДНК у ячменно-пшеничных гибридов и полученных на их основе аллолиний является следствием двуродительской передачи мтДНК начиная с F₁ (Aksyonova et al., 2005). Аналогичные данные приведены и для гибридов (*Ae. crassa* × пшеница сорта Chinese Spring) (Kawaura et al., 2011) и аллолиний (*Ae. longissima*)-*T. turgidum* (Noyszewski et al., 2014). Наследование цитоплазматических геномов со стороны обоих родителей по сравнению со строго материнским дает большее разнообразие вариантов мт- и хлДНК у гибридов. Считают, что наследование хлоропластов от двух родителей у покрытосеменных может служить спасением видов с дефектными пластидами (Zhang, Sodmergen, 2010), а также механизмом, который смягчает негативное влияние цитоядерной несовместимости на развитие гибридов F₁

(Barnard-Kubow et al., 2016). Можно предположить, что у изучаемых в нашей работе аллолиний Л-56 и Л-57 наличие пшеничных копий мтДНК, наряду с ячменными, также приводит к нейтрализации цитоядерного конфликта между цитоплазмой ячменя и ядерным геномом пшеницы, обеспечивающим развитие жизнеспособных аллолиний, хотя и с пониженной фертильностью.

При беккроссировании отцовским видом (пшеницей) гибридов *H. vulgare* × *T. aestivum*, для которых характерна гетероплазмия мтДНК, наблюдается изменчивость не только ядерного генома, но и митохондриального (Аксьюнова et al., 2005; Trubacheeva et al., 2012, 2021). При восстановлении фертильности аллолиний происходит увеличение числа копий мтДНК пшеничного (отцовского) типа, и первичное аллоплазматическое состояние утрачивается (Аксьюнова et al., 2005; Trubacheeva et al., 2021). Такую же закономерность наблюдали и при образовании аллолиний пшеницы, несущих цитоплазму определенных видов *Aegilops* (Tsukamoto et al., 2000; Hattori et al., 2002). Аллолиния Л-58 с полным восстановлением фертильности и отсутствием признаков ЦМС выделена при отборе растений с максимальной фертильностью в F₅BC₅ поколении ячменно-пшеничного гибрида (см. рис. 1). Можно предположить, что у Л-58 рекомбинантный ядерный геном, из которого хромосомы ячменя элиминированы, представлен в основном генетическим материалом сортов пшеницы Мироновская 808 и Пиротрикс 28, которые относятся к восстановителям фертильности мягкой пшеницы на цитоплазме культурного ячменя (Першина и др., 2012, 2018). В процессе отбора по фертильности, так же как и при беккроссировании, изменчивость мтДНК от гетеро- к гомоплазмии пшеничного типа коррелирует с изменчивостью хлоропластной ДНК от гомоплазмии ячменного типа к гомоплазмии пшеничного типа (Аксьюнова et al., 2005; Trubacheeva et al., 2021).

Как следует из данных, полученных в настоящем исследовании и ранее опубликованных (Аксьюнова et al., 2005; Trubacheeva et al., 2012, 2021), гетеро- и гомоплазмия пшеничного типа 18S/5S мтДНК, обнаруженные у аллолиний (*H. vulgare*)-*T. aestivum*, могут служить маркерами для разделения аллолиний с нарушением цитоядерной совместимости и аллолиний с цитоядерной коадаптацией, поскольку не во всех случаях уровень фертильности может быть надежным признаком для такого разделения. Например, и в настоящей, и в более ранней работе (Trubacheeva et al., 2021) у части растений, отнесенных к фертильным, обнаружена гетероплазмия мтДНК, т.е. имелось нарушение цитоядерной совместимости.

Четкие различия между аллолиниями с нарушением цитоядерной совместимости и аллолиниями с цитоядерной коадаптацией обнаружены по результатам изучения влияния хромосом 1A и 1D на фертильность этих линий. У аллолиний Л-56 и Л-57 (с нарушенной цитоядерной совместимостью) мужская фертильность зависит от влияния этих хромосом пшеницы, а у аллолиний Л-58 (без нарушения цитоядерной совместимости) не зависит. Это можно объяснить тем, что у аллолиний Л-56 и Л-57 с гетероплазмией для нейтрализации стерилизующего эффекта цитоплазмы необходимо влияние генов-восстановителей *Rf*, расположенных в хромосомах 1A и 1D. Линия Л-58

(с цитоядерной коадаптацией) имеет вновь сформированную цитоплазму пшеничного типа, поэтому развитие мужскофертильных растений не зависит от наличия генов *Rf* на данных хромосомах.

Аналогичные различия мы наблюдали и в предыдущем исследовании (Trubacheeva et al., 2021): короткое плечо хромосомы 1B оказывает влияние на фертильность аллолиний с нарушением цитоядерной совместимости, но не влияет на фертильность аллолиний, у которых цитоядерная совместимость не нарушена.

Заключение

Для выполнения настоящей работы среди беккроссных потомков ячменно-пшеничного гибрида *H. vulgare* × *T. aestivum*, последовательно опыленного разными сортами мягкой пшеницы, были выделены три аллолинии мягкой пшеницы, носители цитоплазмы культурного ячменя. Эти аллолинии – одного происхождения, но с разной фертильностью и разным уровнем цитоядерной совместимости – послужили в качестве адекватных моделей для определения локализации генов, контролирующих восстановление фертильности мягкой пшеницы, несущей цитоплазму культурного ячменя.

Основываясь на результатах расщепления в F₂ гибридов, полученных от скрещивания аллолинии, у которой нарушена цитоядерная совместимость, с пшенично-ржаными замещенными линиями 1R(1A) и 1R(1D), мы впервые сделали заключение, что хромосомы 1A и 1D несут по одному доминантному гену *Rf*, контролирующему восстановление мужской фертильности мягкой пшеницы на цитоплазме культурного ячменя. Показано, что одной дозы этих генов недостаточно для восстановления фертильности частично стерильных растений. Данные наших исследований дополнили информацию о локализации генов *Rf* в хромосомах первой гомеологической группы, соответственно 1A, 1D (в настоящей работе) и 1BS (Trubacheeva et al., 2021).

Получен важный результат, демонстрирующий независимость проявления фертильности линий с цитоядерной совместимостью от влияния хромосом, в которых локализованы гены *Rf*. Это объясняет тот факт, что интрогрессия чужеродного генетического материала у таких линий, в том числе замещение короткого плеча хромосомы пшеницы 1B на короткое плечо хромосомы ржи 1R, не нарушает цитоядерную совместимость и аллолинии сохраняют фертильность (Першина и др., 2018; Pershina et al., 2020). Более того, на основе интрогрессивных аллолиний (*H. vulgare*)-*T. aestivum* получены дигаплоидные линии (Белан и др., 2021), использованные в качестве материнских генотипов при создании коммерческих высокоурожайных сортов яровой мягкой пшеницы Сигма, Уралосибирская 2, Сигма 5.

Список литературы / References

- Бадаева Е.Д., Першина Л.А., Бильданова Л.Л. Цитогенетическое исследование нестабильных по проявлению фертильности и жизнеспособности аллоплазматических рекомбинантных линий (*Hordeum vulgare*)-*Triticum aestivum*. *Генетика*. 2006;42(2): 198-209
- [Badaeva E.D., Pershina L.A., Bil'danova L.L. Cytogenetic analysis of alloplasmic recombinant lines (*H. vulgare*)-*T. aestivum* unstable

- in fertility and viability. *Russ. J. Genet.* 2006;42(2):140-149. DOI 10.1134/S1022795406020074]
- Белан И.А., Россеева Л.П., Блохина Н.П., Мухина Я.В., Трубочеева Н.В., Першина Л.А. Использование дигаплоидных линий – ускорение селекционного процесса в создании сортов яровой мягкой пшеницы. В: Сб. тезисов междунар. конф. «Перспективные технологии в аграрном производстве: человек, “цифра”, окружающая среда (AgroProd 2021)». Омск, 2021;128-133 [Belan I.A., Rosseeva L.P., Blokhina N.P., Mukhina Y.V., Trubacheeva N.V., Pershina L.A. The use of double haploid lines is an acceleration of breeding process in creating varieties of spring bread wheat. In: Abstracts from the Int. Conf. “Advanced Technologies in Agricultural Production: People, digital, environment (AgroProd 2021)”. Омск, 2021;128-133 (in Russian)]
- Булойчик А.А., Волуевич Е.А., Михно А.М. Эффекты генома и плазмона на экспрессию преодоленных генов устойчивости пшеницы к бурой ржавчине. *Цитология и генетика.* 2002;36(2):11-19 [Buloychik A.A., Voluevich E.A., Mikhno A.M. Genome and plasmon effects on expression of the defeated genes of resistance to brown rust in wheat. *Tsitologiya i Genetika = Cytology and Genetics.* 2002;36(2):11-19 (in Russian)]
- Климушина М.В., Дивашук М.Г., Мухаммед Т.А.К., Семенов О.Г., Карлов Г.И. Анализ аллельного состава генов, связанных с хлебопекарными качествами, у аллоцитоплазматических гибридов пшеницы. *Генетика.* 2013;49(5):617-625. DOI 10.7868/S0016675813050081 [Klimushina M.V., Divashuk M.G., Mokhammad T.A.K., Semenov O.G., Karlov G.I. Analysis of allelic state of genes responsible for baking properties in alloplasmic wheat hybrids. *Russ. J. Genet.* 2013;49(5):530-538. DOI 10.1134/S1022795413050074]
- Першина Л.А., Девяткина Э.П., Трубочеева Н.В., Кравцова Л.А., Добровольская О.Б. Особенности восстановления фертильности аллоплазматических линий, полученных на основе гибридизации самоопыленного потомка ячменно-пшеничного амфилоида (*Hordeum vulgare* L. × *Triticum aestivum* L.) с сортами мягкой пшеницы Саратовская 29 и Пиротрикс 28. *Генетика.* 2012;48(12):1372-1379 [Pershina L.A., Devyatkina E.P., Trubacheeva N.V., Kravtsova L.A., Dobrovol'skaya O.B. Characterization of fertility restoration in alloplasmic lines derived from hybridization of self-fertilized of spring of barley-wheat (*Hordeum vulgare* L. × *Triticum aestivum* L.) amphiploid with common wheat varieties Saratovskaya 29 and Pyrotrix 28. *Russ. J. Genet.* 2012;48(12):1184-1190. DOI 10.1134/S1022795412120101]
- Першина Л.А., Белова Л.И., Трубочеева Н.В., Осадчая Т.С., Шумный В.К., Белан И.А., Россеева Л.П., Немченко В.В., Абакумов С.Н. Аллоплазматические рекомбинантные линии (*H. vulgare*)-*T. aestivum* с транслокацией 1RS.1BL: исходные генотипы для создания сортов яровой мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2018;22(5):544-552. DOI 10.18699/VJ18.393 [Pershina L.A., Belova L.I., Trubacheeva N.V., Osadchaya T.S., Shumny V.K., Belan I.A., Rosseeva L.P., Nemchenko V.V., Abakumov S.N. Alloplasmic recombinant lines (*H. vulgare*)-*T. aestivum* with 1RS.1BL translocation: initial genotypes for production of common wheat varieties. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2018;22(5):544-552. DOI 10.18699/VJ18.393]
- Аксимова Е., Синыavsкая М., Даниленко Н., Першина Л., Nakamura C., Davydenko O. Heteroplasmy and paternally oriented shift of the organellar DNA composition in barley-wheat hybrids during backcrosses with wheat parents. *Genome.* 2005;48(5):761-769. DOI 10.1139/g05-049
- Atienza S.G., Martin A., Pechioni N., Platani C., Cattivelli L. The nuclear-cytoplasmic interaction controls carotenoid content in wheat. *Euphytica.* 2008;159:325-331. DOI 10.1007/s10681-007-9511-6
- Barnard-Kubow K.B., McCoy M.A., Galloway L.F. Biparental chloroplast inheritance leads to rescue from cytonuclear incompatibility. *New Phytol.* 2016;213(3):1466-1476. DOI 10.1111/nph.14222
- Bohra A., Jha U.C., Adhimoolam P., Bisht D., Sing N.P. Cytoplasmic male sterility (CMS) in hybrid breeding in field crops. *Plant Cell Rep.* 2016;35(5):967-993. DOI 10.1007/s00299-016-1949-3
- Coulthart M.B., Spencer D.F., Gray M.W. Comparative analysis of a recombining-repeat-sequence family in the mitochondrial genomes of wheat (*Triticum aestivum* L.) and rye (*Secale cereale* L.). *Curr. Genet.* 1993;23(3):255-264. DOI 10.1007/BF00351504
- Crosatti C., Quansah L., Maré C., Giusti L., Roncaglia E., Atienz S.G., Cattivelli L., Fait A. Cytoplasmic genome substitution in wheat affects the nuclear-cytoplasmic cross-talk leading to transcript and metabolite alterations. *BMC Genomics.* 2013;14:868-889. DOI 10.1186/1471-2164-14-868
- Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates. N.Y.: Wiley Interscience, 1987
- Gupta P.K., Balyan H.S., Gahlaut V., Saripalli G., Pal B., Basnet B.R., Joshi A.K. Hybrid wheat: past, present and future. *Theor. Appl. Genet.* 2019;132(9):2463-2483. DOI 10.1007/s00122-019-03397-y
- Hattori N., Kitagawa K., Takumi S., Nakamura C. Mitochondrial DNA heteroplasmy in wheat, *Aegilops* and their nucleus-cytoplasm hybrids. *Genetics.* 2002;160(4):1619-1630. DOI 10.1093/genetics/160.4.1619
- Hohn C.E., Lukaszewski A.J. Engineering the 1BS chromosome arm in wheat to remove the *Rf^{multi}* locus restoring male fertility in cytoplasm of *Aegilops kotschyi*, *Ae. uniaristata* and *Ae. mutica*. *Theor. Appl. Genet.* 2016;129(9):1769-1774. DOI 10.1007/s00122-016-2738-7
- Islam M.S., Studer B., Möller I.M., Asp T. Genetics and biology of cytoplasmic male sterility and its applications in forage and turf grass breeding. *Plant Breed.* 2014;133(3):299-312. DOI 10.1111/pbr.12155
- Kawaura K., Saeki A., Masumura T., Morita S., Ogihara Y. Heteroplasmy and expression of mitochondrial genes in alloplasmic and euplasmic wheat. *Genes Genet. Syst.* 2011;86(4):249-255. DOI 10.1266/ggs.86.249
- Liu C.G., Wu Y.W., Hou H., Zhang C., Zhang Y., McIntosh R.A. Value and utilization of alloplasmic common wheats with *Aegilops crassa* cytoplasm. *Plant Breed.* 2002;121(5):407-410. DOI 10.1046/j.1439-0523.2002.755374.x
- Liu Y., Tang L., Xu Q., Ma D., Zha M., Sun J., Chen W. Experimental and genomic evidence for the *indica*-type cytoplasmic effect in *Oryza sativa* L. ssp. *japonica*. *J. Integr. Agric.* 2016;15(10):2183-2191. DOI 10.1016/S2095-3119(15)61190-X
- Martin A.C., Atienza S.G., Ramirez M.C., Barro F., Martin A. Molecular and cytological characterization of an extra acrocentric chromosome that restores male fertility of wheat in the msH1 CMS system. *Theor. Appl. Genet.* 2010;121(6):1093-1101. DOI 10.1007/s00122-010-1374-x
- Noyszewski A.K., Ghavami F., Alnemer L.M., Soltani A., Gu Y.Q., Huo N., Meinhardt S., Penny M.A., Kianian P.M.A., Kianian S.F. Accelerated evolution of the mitochondrial genome in an alloplasmic line of durum wheat. *BMC Genomics.* 2014;15(1):67. DOI 1471-2164/15/67
- Pershina L.A., Numerova O.M., Belova L.I., Devyatkina E.P. Biotechnological and cytogenetic aspects of producing new wheat genotypes using hybrids. *Euphytica.* 1998;100(1-3):239-244. DOI 10.1023/A:1018312408312
- Pershina L., Trubacheeva N., Badaeva E., Belan I., Rosseeva L. Study of androgenic plant families of alloplasmic introgression lines (*H. vulgare*)-*T. aestivum* and the use of sister DH lines in breeding. *Plants.* 2020;9(6):764-816. DOI 10.3390/plants9060764
- Rafee V.V., Lalitha R., Remadevi A.K., Lekshmi M., Premachandran M.N. Substitution of cytoplasm of sugarcane with that of the wild grass *Erianthus arundinaceus*. *Gregor Mendel Found. J.* 2010; 1(1&2):16-22

- Shchapova A.I., Kravtsova L.A. The production of wheat-rye substitution line by using the Giemsa staining technique. *Cereal Res. Commun.* 1982;10(1):33-39
- Sinha P., Tomar S.M., Vinod, Singh V.K., Balyan H.S. Genetic analysis and molecular mapping of a new fertility restorer gene *Rf8* for *Triticum timopheevi* cytoplasm in wheat (*Triticum aestivum* L.) using SSR markers. *Genetica*. 2013;141(10-12):431-441. DOI 10.1007/s10709-013-9742-5
- Soltani A., Kumar A., Mergoum M., Pirseyedi S.M., Hegstad J.B., Mazaheri M., Kianian S.F. Novel nuclear-cytoplasmic interaction in wheat (*Triticum aestivum*) induces vigorous plants. *Funct. Integr. Genom.* 2016;16(2):171-182. DOI 10.1007/s10142-016-0475-2
- Takenaka S., Yamamoto R., Nakamura C. Differential and interactive effects of cytoplasmic substitution and seed aging on submergence stress response in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biotechnol. Bio-technol. Equip.* 2019;33(1):75-85. DOI 10.1080/13102818.2018.1549960
- Talukder S.K., Vara Prasad P.V., Todd T., Babar M.A., Poland J., Bowden R., Fritz A. Effect of cytoplasmic diversity on post anthesis heat tolerance in wheat. *Euphytica*. 2015;204:383-394. DOI 10.1007/s10681-014-1350-7
- Tao D., Xu P., Zhou J., Deng X., Li J., Deng W., Yang J., Yang G., Li Q., Hu F. Cytoplasm affects grain weight and filled-grain ratio in *indica* rice. *BMC Genet.* 2011;12:53. DOI 10.1186/1471-2156-12-53
- Trubacheeva N.V., Kravtsova L.A., Devyatkina E.P., Efremova T.T., Sinyavskaya M.G., Shumny V.K., Pershina L.A. Heteroplasmic and homoplasmic states of mitochondrial and chloroplast DNA regions in progenies of distant common wheat hybrids of different origins. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2012;2(6):494-500. DOI 10.1134/S2079059712060147
- Trubacheeva N.V., Divashuk M.G., Chernook A.G., Belan I.A., Rosseeva L.P., Pershina L.A. The effect of chromosome arm 1BS on the fertility of alloplasmic recombinant lines in bread wheat with the *Hordeum vulgare* cytoplasm. *Plants*. 2021;10(6):1120. DOI 10.3390/plants10061120
- Tsukamoto N., Asakura N., Hattori N., Takumi S., Mori N., Nakamura C. Identification of paternal mitochondrial DNA sequences in the nucleus-cytoplasm hybrid of tetraploid and hexaploid wheat with D and D2 plasmon from *Aegilops* species. *Curr. Genet.* 2000;38(4):208-217. DOI 10.1007/s002940000153
- Tsunewaki K. Plasmon analysis as the counterpart of genome analysis. In: Jauhar P.P. (Ed.) *Methods of Genome Analysis in Plants*. Boca Raton: CRC Press, 1996;271-299. <http://pi.lib.uchicago.edu/1001/cat/bib/2607056>
- Tsunewaki K. Fine mapping of the first multi-fertility-restoring gene, *Rf^{multi}*, of wheat for three *Aegilops* plasmons, using 1BS-1RS recombinant lines. *Theor. Appl. Genet.* 2015;128(4):723-732. DOI 10.1007/s00122-015-2467-3
- Yang J., Zhang M., Yu J. Mitochondrial retrograde regulation tuning fork in nuclear genes expressions of higher plants. *J. Genet. Genomics.* 2008;35(2):65-71. DOI 10.1016/S1673-8527(08)60010-7
- Zhang Q., Sodmergen. Why does biparental plastid inheritance revive in angiosperms? *J. Plant Res.* 2010;123(2):201-206. DOI 10.1007/s10265-009-0291-z

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 25.03.2024. После доработки 03.05.2024. Принята к публикации 14.05.2024.