Print ISSN 2500-0462
Online ISSN 2500-3259

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

2023 • 27 • 8

PlantGen2023

Генетика растений / Генетическая инженерия растений / Биология развития растений / Иммунитет растений к болезням / Актуальные технологии в генетике и селекции растений / Системная и компьютерная биология

vavilov.elpub.ru
vavilovj-icg.ru
vavilov_journal@bionet.nsc.ru
Индекс издания 42153

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

2023·27·8

2023 • 27 • 8

Print ISSN 2500-0462
Online ISSN 2500-3259

Сетевое издание

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.
Периодичность 8 выпусков в год
DOI 10.18699/VJGB-23-106

Учредители

Сибирское отделение Российской академии наук

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Главный редактор

А.В. Кочетов – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Заместители главного редактора

Н.А. Колчанов – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Россия)
И.Н. Леонова – д-р биол. наук (Россия)
Н.Б. Рубцов – д-р биол. наук, профессор (Россия)
В.К. Шумный – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Россия)

Ответственный секретарь

Г.В. Орлова – канд. биол. наук (Россия)

Редакционная коллегия

Е.Е. Андронов – канд. биол. наук (Россия)
Ю.С. Аульченко – д-р биол. наук (Россия)
О.С. Афанасенко – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
Д.А. Афонников – канд. биол. наук, доцент (Россия)
Л.И. Афтанас – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
Л.А. Беспалова – академик РАН, д-р с.-х. наук (Россия)
А. Бёрнер – д-р наук (Германия)
Н.П. Бондарь – канд. биол. наук (Россия)
С.А. Боринская – д-р биол. наук (Россия)
П.М. Бородин – д-р биол. наук, проф. (Россия)
А.В. Васильев – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
М.И. Воевода – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
Т.А. Гавриленко – д-р биол. наук (Россия)
И. Гроссе – д-р наук, проф. (Германия)
Н.Е. Грунтенко – д-р биол. наук (Россия)
С.А. Демаков – д-р биол. наук (Россия)
И.К. Захаров – д-р биол. наук, проф. (Россия)
И.А. Захаров-Гезехус – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
С.Г. Инге-Вечтомов – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
А.В. Кильчевский – чл.-кор. НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)
С.В. Костров – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)
А.М. Кудрявцев – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
И.Н. Лаврик – д-р биол. наук (Германия)
Д.М. Ларкин – канд. биол. наук (Великобритания)
Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция)
И.Н. Лебедев – д-р биол. наук, проф. (Россия)
Л.А. Лутова – д-р биол. наук, проф. (Россия)
Б. Люгтенберг – д-р наук, проф. (Нидерланды)
В.Ю. Макеев – чл.-кор. РАН, д-р физ.-мат. наук (Россия)
В.И. Молодин – академик РАН, д-р ист. наук (Россия)
М.П. Мошкин – д-р биол. наук, проф. (Россия)
С.Р. Мурсалимов – канд. биол. наук (Россия)
Л.Ю. Новикова – д-р с.-х. наук (Россия)
Е.К. Потокина – д-р биол. наук (Россия)
В.П. Пузырев – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
Д.В. Пышный – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)
И.Б. Рогозин – канд. биол. наук (США)
А.О. Рувинский – д-р биол. наук, проф. (Австралия)
Е.Ю. Рыкова – д-р биол. наук (Россия)
Е.А. Салина – д-р биол. наук, проф. (Россия)
В.А. Степанов – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
И.А. Тихонович – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
Е.К. Хлесткина – д-р биол. наук, проф. РАН (Россия)
Э.К. Хуснутдинова – д-р биол. наук, проф. (Россия)
М. Чен – д-р биол. наук (Китайская Народная Республика)
Ю.Н. Шавруков – д-р биол. наук (Австралия)
Р.И. Шейко – чл.-кор. НАНБ, д-р с.-х. наук (Беларусь)
С.В. Шестаков – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
Н.К. Янковский – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

2023 • 27 • 8

Print ISSN 2500-0462
Online ISSN 2500-3259

Online edition

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

VAVILOVSKII ZHURNAL GENETIKI I SELEKTSII

Founded in 1997
Published 8 times annually
DOI 10.18699/VJGB-23-106

Founders

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

The Vavilov Society of Geneticists and Breeders

Editor-in-Chief

A.V. Kochetov, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

Deputy Editor-in-Chief

N.A. Kolchanov, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.N. Leonova, Dr. Sci. (Biology), Russia
N.B. Rubtsov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
V.K. Shumny, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

Executive Secretary

G.V. Orlova, Cand. Sci. (Biology), Russia

Editorial board

O.S. Afanasenko, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
D.A. Afonnikov, Associate Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia
L.I. Aftanas, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
E.E. Andronov, Cand. Sci. (Biology), Russia
Yu.S. Aulchenko, Dr. Sci. (Biology), Russia
L.A. Bespalova, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Agricul.), Russia
N.P. Bondar, Cand. Sci. (Biology), Russia
S.A. Borinskaya, Dr. Sci. (Biology), Russia
P.M. Borodin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
A. Börner, Dr. Sci., Germany
M. Chen, Dr. Sci. (Biology), People's Republic of China
S.A. Demakov, Dr. Sci. (Biology), Russia
T.A. Gavrilenko, Dr. Sci. (Biology), Russia
I. Grosse, Professor, Dr. Sci., Germany
N.E. Gruntenko, Dr. Sci. (Biology), Russia
S.G. Inge-Vechtomov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
E.K. Khlestkina, Professor of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
E.K. Khusnutdinova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
A.V. Kilchevsky, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus
S.V. Kostrov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia
A.M. Kudryavtsev, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
D.M. Larkin, Cand. Sci. (Biology), Great Britain
I.N. Lavrik, Dr. Sci. (Biology), Germany
J. Le Gouis, Dr. Sci., France
I.N. Lebedev, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
B. Lugtenberg, Professor, Dr. Sci., Netherlands
L.A. Lutova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
V.Yu. Makeev, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Physics and Mathem.), Russia
V.I. Molodin, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (History), Russia
M.P. Moshkin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
S.R. Mursalimov, Cand. Sci. (Biology), Russia
L.Yu. Novikova, Dr. Sci. (Agricul.), Russia
E.K. Potokina, Dr. Sci. (Biology), Russia
V.P. Puzyrev, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
D.V. Pyshnyi, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia
I.B. Rogozin, Cand. Sci. (Biology), United States
A.O. Ruvinsky, Professor, Dr. Sci. (Biology), Australia
E.Y. Rykova, Dr. Sci. (Biology), Russia
E.A. Salina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
Y.N. Shavrukov, Dr. Sci. (Biology), Australia
R.I. Sheiko, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Agricul.), Belarus
S.V. Shestakov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
V.A. Stepanov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.A. Tikhonovich, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
A.V. Vasiliev, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
M.I. Voevoda, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
N.K. Yankovsky, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.K. Zakharov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.A. Zakharov-Gezekhus, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

СОДЕРЖАНИЕ • 2023 • 27 • 8

Генетика растений

921 ОБЗОР
Использование подходов Н.И. Вавилова к филогении и эволюции культурных видов рода *Avena* L. *И.Г. Лоскутов, А.А. Гнутиков, Е.В. Блинова, А.В. Родионов*

933 ОБЗОР
Аллельное разнообразие генов *Vrn* и контроль типа и скорости развития у пшениц. *С.Э. Смоленская, Н.П. Гончаров*

947 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
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*

958 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Молекулярно-генетический и цитогенетический анализ интрогрессии хромосом хлопчатника *Gossypium barbadense* L. в геном *G. hirsutum* L. у гибридов BC_2F_1. *М.Ф. Санамьян, Ш.У. Бобохужаев, Ш.С. Абдукаримов, О.Г. Силкова*

Генетическая инженерия растений

971 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Инактивация компонентов комплекса TIM приводит к снижению уровня импорта ДНК в митохондрии арабидопсиса. *Т.А. Тарасенко, К.Д. Елизова, В.И. Тарасенко, М.В. Кулинченко, Ю.М. Константинов*

Биология развития растений

980 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Фотохимическая активность формирующихся семядолей гороха (*Pisum sativum* L.) зависит от светопропускания покровных тканей и спектрального состава света. *Г.Н. Смоликова, Н.В. Степанова, А.М. Камионская, С.С. Медведев*

Иммунитет растений к болезням

988 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Изучение устойчивости к бурой ржавчине, урожайности и качества зерна у образцов коллекции мягкой пшеницы в экологических условиях Новосибирской области. *Л.П. Сочалова, В.А. Апарина, Н.И. Бойко, Е.В. Зуев, Е.В. Морозова, К.К. Мусинов, Н.А. Виниченко, И.Н. Леонова, В.В. Пискарев*

1000 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Влияние салициловой и жасмоновой кислот на активность генов *SnAGO* гриба *Stagonospora nodorum* Berk. в культуре и при инфицировании растений пшеницы. *М.Ю. Шеин, Г.Ф. Бурханова, И.В. Максимов*

Актуальные технологии в генетике и селекции растений

1010 ОБЗОР
Хитозан и его производные как перспективные средства защиты растений. *А.Б. Щербань*

1022 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Изучение потенциала исходного селекционного материала пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в андрогенезе *in vitro*. *Н.В. Петраш, Т.Н. Капко, В.В. Советов*

Системная и компьютерная биология

1031 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Реконструкция и анализ регуляторной генной сети функционирования клеточной стенки листьев *Arabidopsis thaliana* L. при ответе на водный дефицит. *А.Р. Волянская, Е.А. Антропова, У.С. Зубаирова, П.С. Деменков, А.С. Вензель, Ю.Л. Орлов, А.А. Макарова, Т.В. Иванисенко, Т.А. Горшкова, А.Р. Агълямова, Н.А. Колчанов, М. Чен, В.А. Иванисенко (на англ. языке)*

1042 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
InterTransViewer: сравнительное описание профилей дифференциальной экспрессии генов из разных экспериментов. *А.В. Тяпкин, В.В. Лавреха, Е.В. Убогоева, Д.Ю. Ощепков, Н.А. Омельянчук, Е.В. Землянская*

1053 Алфавитный указатель авторов статей, опубликованных в журнале в 2023 г.

© Сибирское отделение Российской академии наук, 2023
© Институт цитологии и генетики СО РАН, 2023
Вавиловский журнал генетики и селекции, 2023

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

CONTENTS • 2023 • 27 • 8

Plant genetics

921 REVIEW
The application of Vavilov's approaches to the phylogeny and evolution of cultivated species of the genus *Avena* L.
I.G. Loskutov, A.A. Gnutikov, E.V. Blinova, A.V. Rodionov

933 REVIEW
Allelic diversity of the *Vrn* genes and the control of growth habit and earliness in wheat. *S.E. Smolenskaya, N.P. Goncharov*

947 ORIGINAL ARTICLE
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*

958 ORIGINAL ARTICLE
Molecular-genetic and cytogenetic analyses of cotton chromosome introgression from *Gossypium barbadense* L. into the genome of *G. hirsutum* L. in BC_2F_1 hybrids. *M.F. Sanamyan, Sh.U. Bobokhujayev, Sh.S. Abdukarimov, O.G. Silkova*

Genetic engineering of plants

971 ORIGINAL ARTICLE
Inactivation of the TIM complex components leads to a decrease in the level of DNA import into *Arabidopsis* mitochondria. *T.A. Tarasenko, K.D. Elizova, V.I. Tarasenko, M.V. Koulintchenko, Yu.M. Konstantinov*

Developmental biology of plants

980 ORIGINAL ARTICLE
Photochemical activity in developing pea (*Pisum sativum* L.) cotyledons depends on the light transmittance of covering tissues and the spectral composition of light.
G.N. Smolikova, N.V. Stepanova, A.M. Kamionskaya, S.S. Medvedev

Plant immunity

988 ORIGINAL ARTICLE
Studying a collection of common-wheat varieties for leaf rust resistance, crop yield and grain quality in the environmental conditions of Novosibirsk region.
L.P. Sochalova, V.A. Aparina, N.I. Boyko, E.V. Zuev, E.V. Morozova, K.K. Musinov, N.A. Vinichenko, I.N. Leonova, V.V. Piskarev

1000 ORIGINAL ARTICLE
The effect of salicylic and jasmonic acids on the activity of *SnAGO* genes in the fungus *Stagonospora nodorum* Berk. in *in vitro* culture and during infection of wheat plants. *M.Yu. Shein, G.F. Burkhanova, I.V. Maksimov*

Mainstream technologies in plant genetics and breeding

1010 REVIEW
Chitosan and its derivatives as promising plant protection tools. *A.B. Shcherban*

1022 ORIGINAL ARTICLE
Study of wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding material potential for *in vitro* androgenesis. *N.V. Petrash, T.N. Kapko, V.V. Sovetov*

Systems and computational biology

1031 ORIGINAL ARTICLE
Reconstruction and analysis of the gene regulatory network for cell wall function in *Arabidopsis thaliana* L. leaves in response to water deficit. *A.R. Volyanskaya, E.A. Antropova, U.S. Zubairova, P.S. Demenkov, A.S. Venzel, Y.L. Orlov, A.A. Makarova, T.V. Ivanisenko, T.A. Gorshkova, A.R. Aglyamova, N.A. Kolchanov, M. Chen, V.A. Ivanisenko*

1042 ORIGINAL ARTICLE
InterTransViewer: a comparative description of differential gene expression profiles from different experiments.
A.V. Tyapkin, V.V. Lavrekha, E.V. Ubogoeva, D.Yu. Oshchepkov, N.A. Omelyanchuk, E.V. Zemlyanskaya

1053 Alphabetical author index for the list of papers published in the journal in 2023

© Siberian Branch RAS, 2023
© Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, 2023
Vavilov Journal of Genetics and Breeding, 2023

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023;27(8):921-932
DOI 10.18699/VJGB-23-107

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

Использование подходов Н.И. Вавилова к филогении и эволюции культурных видов рода *Avena* L.

И.Г. Лоскутов[1, 2] ✉, А.А. Гнутиков[1], Е.В. Блинова[1], А.В. Родионов[2, 3]

[1] Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия
[2] Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
[3] Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия
✉ i.loskutov@vir.nw.ru

Аннотация. Центральной проблемой, которую исследовал Н.И. Вавилов, было учение о мировом генофонде культурных растений. Теоретическую основу этого учения составили: закон гомологических рядов в наследственной изменчивости, разработка проблемы вида как системы, ботанико-географические основы селекции и теория центров происхождения культурных растений. Собранная Н.И. Вавиловым и его соратниками со всех уголков мира коллекция генетических ресурсов растений ВИР, представляющая всю полноту ботанического, морфологического и генетического разнообразия, позволяет проводить исторические, эволюционные, филогенетические и прикладные селекционные исследования, направленные на раскрытие потенциала всего коллекционного материала. Положения Н.И. Вавилова по комплексному анализу всего видового и внутривидового разнообразия культурных и диких видов дают возможность сделать верные выводы при изучении сложных экологически дифференцированных видовых систем, связанных в своем формировании с определенной средой и воздействием отбора. Все разнообразие видов культурного овса, как было доказано Н.И. Вавиловым, имеет сорно-полевое происхождение. Этот процесс можно наглядно проследить в Испании – на примере культурного диплоидного вида *Avena strigosa*, в Эфиопии – *A. abyssinica*, в Турции и Иране – *A. byzantina* и на сорно-полевых формах *A. sativa*. Изучение комплекса морфологических признаков не дает полного представления об эволюционном и систематическом положении некоторых видов и форм овса. Для исследования полиморфизма, филогении и эволюции овса перспективны активно разрабатываемые в настоящее время методы и подходы с использованием ДНК-маркеров и геномных технологий. Появился ряд работ, затрагивающих молекулярные аспекты эволюции и филогении рода *Avena*. В исследованиях используют различные маркеры генов, участков генов, межгенных спейсеров (внутренних и внешних), как ядерных, так и хлоропластных и митохондриальных, геномные подходы и другие современные методы. На основе комплексного изучения полного внутривидового разнообразия из разных зон ареала культурных видов овса и анализа данных по географическому распределению ареалов форм и видов установлено, что процесс формирования гексаплоидных видов шел также в западной части Средиземноморья, и затем при продвижении на восток эти формы стали занимать значительные пространства в районе Юго-Западного Азиатского центра, образуя большое внутривидовое разнообразие диких и переходных сорных форм к культурным видам гексаплоидного овса. В результате анализа внутривидового разнообразия староместных сортов были уточнены центры формообразования всех культурных видов овса. Осуществленный с помощью метода секвенирования следующего поколения (NGS) филогенетический анализ представительного внутривидового разнообразия культурных и диких видов рода *Avena* показал, что диплоидные виды с вариантами генома A в действительности являются не первичными диплоидами, а своеобразным средиземноморским интрогрессивно-гибридизационным комплексом видов, спорадически вступающих в межвидовые скрещивания. Установлено, что тетраплоидный культурный вид *A. abyssinica*, вероятнее всего, происходит от дикого вида *A. vaviloviana*. Анализ путей одомашнивания культурных видов овса *A. sativa* и *A. byzantina* показал, что наиболее массовый риботип гексаплоида *A. sativa* унаследован от *A. ludoviciana*, а второй по массовости – от *A. magna*, в то же время *A. byzantina* обладает двумя уникальными семействами риботипов, скорее всего, унаследованными от вымершего вида овса или криптовида, до сегодняшнего дня не обнаруженного.
Ключевые слова: виды овса; центры происхождения; внутривидовое разнообразие; закон гомологических рядов; NGS секвенирование; мировая коллекция ВИР.

Для цитирования: Лоскутов И.Г., Гнутиков А.А., Блинова Е.В., Родионов А.В. Использование подходов Н.И. Вавилова к филогении и эволюции культурных видов рода *Avena* L. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(8):921-932. DOI 10.18699/VJGB-23-107

The application of Vavilov's approaches to the phylogeny and evolution of cultivated species of the genus *Avena* L.

I.G. Loskutov[1, 2] ✉, A.A. Gnutikov[1], E.V. Blinova[1], A.V. Rodionov[2, 3]

[1] Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia
[2] Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia
[3] Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia
✉ i.loskutov@vir.nw.ru

© Лоскутов И.Г., Гнутиков А.А., Блинова Е.В., Родионов А.В., 2023
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

Abstract. The central problem that Vavilov was investigating was the overall concept of global plant genetic resources. The theoretical basis of this concept consisted of the law of homologous series in variation, research on the problem of species as a system, botanical and geographical bases of plant breeding, and the key theory of the centers of origin of cultivated plants. The VIR global collection of plant genetic resources collected by Vavilov and his associates from all over the world reflects the fullness of botanical, morphological and genetic diversity, and can be used for historical, evolutionary, phylogenetic and applied breeding research aimed at unlocking the potential of all the collection material. The whole diversity of cultivated oats, as was proved by Vavilov, had originated from segetal weeds. This process can be clearly traced in Spain on the example of the cultivated diploid species *A. strigosa*, *A. abyssinica* in Ethiopia, *A. byzantina* in Turkey and Iran, and on segetal forms of *A. sativa*. The studies of the morphological features as a whole do not yield a complete picture of the evolutionary and systematic status of some oat species and forms. The methods and approaches that use DNA markers and genomic technologies, and are promising for the study of oat polymorphism and phylogeny have been actively researched recently. A number of works devoted to the molecular aspects of the evolution and phylogeny of the genus *Avena* have recently appeared. The research uses various markers of genes, gene regions, intergenic spacers (internal and external), both nuclear and chloroplast and mitochondrial, genomic approaches and other modern methods. On the basis of a comprehensive study of the complete intraspecific diversity from different zones of the distribution range of cultivated oat species as well as on the basis of an analysis of data on the geography of forms and species distribution ranges, it was established that the process of hexaploid species formation also took place in the western part of the Mediterranean, and subsequently, when moving eastward, these forms started occupying all the vast spaces in the region of the Southwest Asian center, forming a large intraspecific diversity of wild forms and weedy ones in transit to cultivated hexaploid oat species. An analysis of the intraspecific diversity of landraces has specified the centers of morphogenesis of all cultivated oat species. The phylogenetic analysis of the representative intraspecific diversity of cultivated and wild *Avena* species carried out using next generation sequencing (NGS) showed that diploid species with A-genome variants are in fact not primary diploids, but a peculiar Mediterranean introgressive hybridization complex of species that sporadically enter into interspecific hybridization. It was established that the tetraploid cultivated species *A. abyssinica* had most likely originated from the wild *A. vaviloviana*. An analysis of the ways of *A. sativa* and *A. byzantina* domestication showed that the most widespread ribotype of the *A. sativa* hexaploid was inherited from *A. ludoviciana*, and the second most widespread one, from *A. magna*, while *A. byzantina* has two unique ribotype families, most likely inherited from an extinct oat species or a still undiscovered cryptospecies.
Key words: *Avena* species; center of origin; itraspecific diversity; law of homologous series; NGS methods; sequences; VIR global collection.

For citation: Loskutov I.G., Gnutikov A.A., Blinova E.V., Rodionov A.V. The application of Vavilov's approaches to the phylogeny and evolution of cultivated species of the genus *Avena* L. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(8):921-932. DOI 10.18699/VJGB-23-107

Введение

При рассмотрении научного наследия Николая Ивановича Вавилова отмечается то, как переплетены и дополняют друг друга его исследования как растениевода, селекционера, ботаника и этнографа. Невозможно провести границы между его трудами селекционного, растениеводческого и генетического характера. Эта особенность имеет большое научное значение, она знаменует собой комплексный поворот в теории и методах исследования. Он всегда шел новыми путями и пытался взглянуть на исследуемый им мир растений с еще неизвестной точки зрения.

Центральной проблемой, которую Н.И. Вавилов разрабатывал всю жизнь, было учение о мировом генофонде культурных растений. Оно включает в себя ряд крупных теоретических обобщений, определивших новые пути в теории интродукции и прикладной ботанике, принесших Н.И. Вавилову мировую славу и сыгравших видную роль в развитии генетики и селекции сельскохозяйственных культур во всем мире. Теоретическую основу этого учения составили: закон гомологических рядов в наследственной изменчивости, разработка проблемы вида как системы, ботанико-географические основы селекции и теория центров происхождения культурных растений (Loskutov, 1999; Лоскутов, 2009).

Главные идеи в работах Н.И. Вавилова – эволюция растительного мира, основанная на ботанической географии, и последовательность этапов изменчивости в пространстве и во времени, свойственная культурным и диким видам растений (Vavilov, 1997).

Истоки особого подхода Н.И. Вавилова к изучению обширного растительного материала лежат в творчестве таких великих предшественников, как Альфонс Декандоль (Alphonse De Candolle) и Чарльз Дарвин (Charles Darwin). Примечательно, что книгу «Центры происхождения растений» (1926) Н.И Вавилов начинает словами: «Посвящается памяти Альфонса Декандоля, автора "Géographie botanique raisonnée", 1855, "La phytographie ou l'art de décrire les végétaux considérés sous différents points de vue", 1880, "Origine des plantes cultivées", 1882».

В статье «Учение о происхождении культурных растений после Дарвина» (1940) Н.И. Вавилов отмечал, что, подходя к изменчивости и эволюции культурных растений, Ч. Дарвин опирался прежде всего на труды А. Декандоля, но Дарвина интересовали эволюция видов, наследственные изменения, которым подвергся вид, взятый в культуру, а Декандоля – установление родины культурных растений. В отличие от А. Декандоля, Н.И. Вавилов, как и Ч. Дарвин, уделил большое внимание как основным областям возникновения видов, так и эволюционным этапам, пройденным видами при их расселении под действием культуры, условий среды и под влиянием естественного и искусственного отбора. Исходя из основных положений теорий Ч. Дарвина и А. Декандоля, Н.И. Вавилов сформулировал задачи исследований, рассчитанные на боль-

шой отрезок времени. Он задумал планомерное исследование генетического разнообразия и происхождения важнейших культур с охватом всех эволюционных этапов, от первичных областей, где можно еще проследить связи их с дикими формами и могут быть установлены филогенетические взаимоотношения различных диких видов с культурными формами, с прослеживанием дальнейшего исторического расселения видов, до конечных звеньев современной селекции (Vavilov, 1992).

Н.И. Вавилов подчеркивал, что эволюция шла в пространстве и во времени, а значит, только подойдя вплотную к географическим центрам формообразования, установив все звенья, связующие виды, можно искать пути овладения синтезом линнеевских видов, понимая последние как системы форм, обладающие огромным внутривидовым разнообразием аллелей. Сама проблема видообразования рассматривалась им не как проблема образования отдельных рас, которые, по представлению Дарвина, обособлялись в особые виды, а как процесс происхождения сложных генетически и фенотипически разнообразных популяций, каковыми являлись настоящие линнеевские виды, для каждого из которых и для каждой родственной группы характерен свой спектр морфологической и физиологической изменчивости (Vavilov, 1992).

Значение открытия центров происхождения культурных растений Н.И. Вавиловым в 1926 г. состоит в возможности нахождения в этих областях ценного генофонда форм растений, наиболее адаптивных к разнообразным условиям среды, представленных гетерогенными популяциями (Vavilov, 1992).

В первичных центрах параллельно и независимо друг от друга могут проходить разнообразные, а иногда разнонаправленные генетические процессы, приводящие к несовпадению центров происхождения растений и наибольшему внутреннему генетическому разнообразию. В этих центрах сосредоточено большинство доминантных аллелей генов. Зоны сосредоточения рецессивных форм – это районы интенсивного мутационного формообразования, находящиеся на периферии центров происхождения. На основе анализа соотношения доминантных и рецессивных форм в пределах видов в определенной географической зоне могут быть установлены уровень формообразовательных процессов, темп и стадия эволюции видов (Vavilov, 1992).

Подводя итог своей плодотворной работы по видообразованию, Н.И. Вавилов опубликовал работу «Линнеевский вид как система», основные положения которой были доложены в 1930 г. на V Международном ботаническом конгрессе в Кембридже (Великобритания) (Vavilov, 1931). Здесь концепция линнеевского вида как закономерной системы в определенных пределах фенотипически, физиологически, генетически вариабельных форм представляется весьма существенной как для практических целей изучения культурных растений, так и для изучения основных вопросов эволюционного процесса. Подойти вплотную к исследованию этого процесса можно было, только понимая линнеевский вид в его разнообразии, а не как монотипный вид, описанный по немногим экземплярам. Поэтому решение основных вопросов эволюции не могло быть принято без учета вида как сложной системы форм (генотипов). Генетика отдельных видов дает представление о наследственной природе вида только тогда, когда она базируется не на случайных нескольких образцах или сортах, а на определенном, тщательно подобранном, хотя бы выборочно, материале (Vavilov, 1992).

Собранная Н.И. Вавиловым и его соратниками со всех уголков мира коллекция генетических ресурсов растений, отражающая всю полноту ботанического, морфологического и генетического разнообразия и сохраненная сотрудниками ВИР в тяжелейшие периоды истории, позволяет проводить исторические, эволюционные, филогенетические и прикладные селекционные исследования, направленные на раскрытие потенциала всего коллекционного материала (Лоскутов, 2009).

По Н.И. Вавилову, вид – это сложная, подвижная, обособленная морфофизиологическая система, связанная в своем генезисе с определенной средой и ареалом, подчиняющаяся действию закона гомологических рядов в наследственной изменчивости (Vavilov, 1992). Для определения системы вида необходимы проведение исследования полного внутривидового разнообразия из разных зон ареала и установление размаха изменчивости признаков в разных условиях среды. Эти положения являются теоретической основой, которая дает возможность строить прогноз нахождения различных форм растений и объясняет, как система наследственных форм вида эволюционирует соответственно условиям произрастания. Закон гомологических рядов помогает установить твердые основы систематики культурных растений, дает представление о месте каждой систематической единицы в огромном богатстве растительного мира. И поэтому реальная внутривидовая классификация должна базироваться на комплексном подходе к понятию ранга разновидности как объективной единицы сложных полиморфных видовых систем. Н.И. Вавилов особо подчеркивал сложность системы вида как целого, состоящего из связанных и взаимно проникающих друг в друга частей, форм и генотипов, указывая на факты, связанные с родом *Avena* L. (Vavilov, 1951).

Н.И. Вавилов об эволюции и филогении рода *Avena*

В своих работах Н.И. Вавилов большое внимание уделял эволюции и филогении всего рода *Avena* L. В 1927 г. он говорил о четырех связанных происхождением основных генетических группах культурного овса: *A. sativa* L. – *A. fatua* L.; *A. byzantina* K. Koch – *A. sterilis* L.; *A. strigosa* Schreb. – *A. barbata* Pott ex Link; *A. abyssinica* Hochst. Особенно сложной была первая, чрезвычайно полиморфная группа *A. sativa*, происхождение которой связано с Азией (Vavilov, 1992). Эта точка зрения стала доминировать во всех исследованиях, в противоположность мнению о европейском происхождении культурного овса (Ladizinsky, 1989).

Овес (*Avena* L.) с генетической точки зрения по сравнению с другими зерновыми культурами и до настоящего времени изучен недостаточно. Планомерное исследование сортового разнообразия и отдельных видов рода в целом дает информацию о локализации центров их формооб-

разования, эволюции и доместикации (Loskutov, 2007). Виды рода *Avena* отличаются большим морфологическим и эколого-географическим разнообразием, а местные сорта – высокой адаптивностью. В мировой литературе с начала XX в. накоплено значительное число данных о многочисленных формах и видах всего рода, центрах их наибольшего разнообразия и происхождения (Мальцев, 1930; Baum, 1977; Vavilov, 1992; Родионова и др., 1994; Loskutov, Rines, 2011; Ladizinsky, 2012).

Староместные сорта, в том числе средиземноморские, собранные экспедициями Н.И. Вавилова и его соратников, изучались в 1930–1950-е гг. и в настоящее время детально не исследованы (Мордвинкина, 1960). До сих пор многие проблемы остаются до конца нерешенными: нет единого мнения о происхождении, систематическом положении, родственных связях и путях вхождения в культуру видов овса. Сравнительное изучение (староместных и сорно-полевых) сортов и диких видов овса в эволюционном (процесс одомашнивания), таксономическом и селекционном отношении вызвано большим интересом селекционеров к их практическому использованию.

Для определения областей происхождения и формообразования видов овса используется дифференциальный ботанико-географический метод, разработанный и широко использованный Н.И. Вавиловым. Сущность этого метода состоит в определении большого внутривидового разнообразия в анализе дифференциации какого-либо вида растений на разновидности и генетические группы, в выяснении характера распределения наследственного разнообразия форм вида в пределах ареала с установлением географических центров скопления этого разнообразия и географической локализации формообразовательного процесса (Vavilov, 1992). Анализ коллекционных образцов показал, что все рассматриваемые формы овса, принадлежащие к отдельным видам, характеризовались морфологическими особенностями и определенными ареалами.

По мнению Н.И. Вавилова, свести происхождение видов культурного овса к одному географическому центру не представляется возможным. Виды культурного овса (диплоидные и полиплоидные), бесспорно, полифилетического происхождения. Отдельные виды, по всей вероятности, самостоятельно входили в культуру. Во всяком случае, было бы ошибочно считать культурный овес связанным только с Европой. Наличие в Китае эндемичных пленчатых и голозерных групп *A. sativa*, широкое распространение в диком виде и в качестве сорных растений *A. fatua* и *A. ludoviciana* Durieu в Туркестане, Бухаре, Афганистане, Персии, в Закавказье, Армении, присутствие здесь многих оригинальных групп сорного культурного овса и овсюгов свидетельствуют об участии Азии в формообразовании группы *A. fatua*–*A. ludoviciana*–*A. sativa* пленчатых и голозерных форм (Vavilov, 1992).

Все разнообразие видов культурного овса, как было показано Н.И. Вавиловым (Vavilov, 1992), имеет сорно-полевое происхождение. С распространением видов на север или в высокогорья, в более суровые и влажные условия произрастания, овес со временем замещал основные культуры (среди которых первоначально он был только одним из сортных растений) и сам становился самостоятельно возделываемым растением. Этот процесс можно наглядно проследить в Испании на примере культурного диплоидного вида *A. strigosa*, в Эфиопии – *A. abyssinica*, в Турции и Иране – *A. byzantina* и на сорно-полевых формах *A. sativa* convar. *asiatica* (Vavilov) Rodionova et Soldatov и *A. sativa* convar. *volgensis* (Vavilov) Rodionova et Soldatov (Лоскутов, 2007).

Внутривидовое разнообразие культурных видов овса

Культурный диплоидный вид *A. strigosa*, по классификации Н.А. Родионовой с коллегами (1994), делится на три подвида: *A. strigosa* (Schreb.) subsp. *strigosa*, *A. strigosa* subsp. *brevis* (Roth) Husn. и *A. strigosa* subsp. *nudibrevis* (Vavilov) Kobyl. et Rodionova, которые имеют четкую географическую дифференциацию. Из 15 определенных разновидностей всего вида *A. strigosa* 8 было обнаружено у местных образцов из Испании и 11 – у образцов из Португалии. Всего на Пиренейском п-ове встречается 13 разновидностей, большинство из которых являются эндемичными для этого региона. Наибольшая часть разнообразных форм этого вида имела распространение в Испании, Португалии, Германии и Великобритании, кроме этого, единичные формы происходили из ряда других европейских стран. Таким образом, центр происхождения и разнообразия диплоидного культурного вида *A. strigosa* – Пиренейский п-ов, где широко распространены и его дикие родичи, и вероятные прародители – диплоидные виды *A. hirtula* Lag. и *A. wiestii* Steud. (Loskutov, Rines, 2011). По археологическим данным, собранным А.И. Мальцевым (1930), *A. strigosa* был первым культурным видом овса, который возделывался в Европе уже в эпоху неолита, т. е. около 1500 лет до н. э.

Тетраплоидный культурный вид *A. abyssinica*, засоряющий поля ячменя и пшеницы, в настоящее время ограниченно возделывается в культуре, хотя имеет культурный тип сочленения зерновок, не осыпающихся при созревании. Кроме этого эндемичного вида, на территории Эфиопии из диких видов произрастают только тетраплоидные – *A. vaviloviana* (Malzew) Mordv. и *A. barbata*. Вид *A. abyssinica* имеет очень много общих черт с *A. vaviloviana* и считается его культурным аналогом.

Все небольшое внутривидовое разнообразие из шести форм в ранге разновидностей *A. abyssinica* встречается только на территории современной Эфиопии (Родионова и др., 1994). По свидетельству А.И. Мальцева (1930), Эфиопский центр разнообразия тетраплоидных видов овса является вторичным, и формы, распространенные в нем, в ранней исторической эпохе имели связи со Средиземноморским центром происхождения. Вторичность происхождения этого центра доказывает и то, что два родственных вида, *A. vaviloviana* и *A. abyssinica*, характеризуются сугубо яровым типом развития, являющимся вторичным относительно озимого типа развития. По всей видимости, два вида, *A. vaviloviana* и *A. abyssinica*, найдя в Эфиопии наиболее благоприятные климатические и почвенные условия для произрастания южнее от Средиземноморского центра и распространившись здесь, не смогли продвинуться дальше из-за более жестких засуш-

ливых климатических условий в сопредельных с Эфиопией странах (Loskutov, Rines, 2011).

Гексаплоидный культурный вид *A. byzantina*, по мнению Н.А. Родионовой с коллегами (1994), насчитывает 15 разновидностей, из которых 9 обнаружено у местных образцов из Алжира, по 8 – из Марокко и Турции, 7 – из Греции, 6 – из Израиля и по 5 – из Испании и Италии; остальные страны, где был распространен этот вид, имели от трех до одной разновидности. Как отмечает Н.И. Вавилов, основной район многообразия этого вида концентрируется на Средиземноморском побережье Северной Африки (Vavilov, 1992). Таким образом, первичным центром формообразования *A. byzantina* являются территории Алжира и Марокко, где сосредоточено его наибольшее местное ботаническое разнообразие, а наличие значительного числа промежуточных форм на территории Турции говорит о том, что этот регион – вторичный центр разнообразия данного вида (Лоскутов, 2007).

Изучение внутривидового разнообразия коллекции пленчатых форм гексаплоидного культурного вида *A. sativa* L. показало, что сорно-полевые группы разновидностей, насчитывающие около 130 местных образцов в коллекции ВИР, локализуются на территории Ирана, Грузии и Российской Федерации (Дагестан, Татарстан, Башкортостан и Чувашия). Одна группа форм, засоряющая посевы, характеризовалась примитивными или переходными признаками и имела четкую приуроченность к определенным ареалам. Анализ данных по разновидностному составу местных образцов коллекции показал, что формы *A. sativa* subsp. *sativa* convar. *asiatica* (Родионова и др., 1994) имели наибольшее разнообразие только на территории Ирана и Грузии, где были выделены все три разновидности, характеризующие данную группу, в Российской Федерации (Дагестан) обнаружена только одна разновидность этой группы.

Кроме того, здесь была найдена форма, принадлежащая разновидности из группы *A. sativa* subsp. *sativa* convar. *volgensis* (Родионова и др., 1994), что является связующим звеном двух групп разновидностей между собой. Сама группа, *A. sativa* subsp. *sativa* convar. *volgensis*, имеет четыре разновидности, наибольшее разнообразие которых приурочено к Российской Федерации, все четыре относятся к территории Татарстана, три разновидности были найдены в Башкортостане, Чувашии и Ульяновской области, две – в Удмуртии и лишь по одной – в Кировской, Саратовской областях и Мордовии. В других регионах распространения пленчатого овса эти формы не встречаются. По всей видимости, из Юго-Западного Азиатского центра через Иран и далее в Грузию, Российскую Федерацию (Дагестан, Саратовская область, Ульяновская область, Татарстан, Чувашия, Башкортостан) пленчатые формы *A. sativa* subsp. *sativa*, засоряя посевы, начали входить в культуру и распространяться по всем направлениям (Лоскутов, 2007).

Другой подвид, *A. sativa* subsp. *nudisativa* (Husn.) Rodionova et Soldatov, – или голозерные формы гексаплоидного овса (Родионова и др., 1994), по свидетельству Н.И. Вавилова (Vavilov, 1992), произошли из Китая. По литературным данным известно, что голозерный овес имел распространение в Китае уже в V в. н. э. (Zukovskij, 1962). С удалением от основного центра разнообразия на восток изменились условия произрастания, в результате чего появились голозерные мутации *A. sativa*, которые закрепились на новых местообитаниях. Таким образом, у *A. sativa*, как и у *A. strigosa*, наблюдается цикл перехода форм дикого, культурного пленчатого и голозерного типа. И последний тип, будучи рецессивной мутацией, возникает на удалении от территории основного разнообразия близкородственных пленчатых форм.

Анализ данных по внутривидовому разнообразию голозерных староместных сортов гексаплоидного культурного вида *A. sativa*, насчитывающих свыше 40 образцов, показал, что из четырех разновидностей, определенных в коллекции ВИР (Родионова и др., 1994), все четыре были идентифицированы у образцов из Монголии, три – из Китая и две из сопредельной территории России (Красноярский край) (Loskutov, 1999). Для образцов из других регионов характерны две наиболее распространенные разновидности: *A. sativa* subsp. *nudisativa* var. *inermis* Koern. и *A. sativa* subsp. *nudisativa* var. *chinensis* Doell. Следовательно, центр разнообразия форм голозерного гексаплоидного овса – район Монголии и северо-западного Китая.

Использование ДНК-маркеров и геномных технологий в исследованиях эволюции видов *Avena*

Изучение комплекса морфологических признаков не дает полного представления об эволюционном и систематическом положении некоторых видов и форм овса. Для исследования полиморфизма и филогении овса перспективны активно разрабатываемые в настоящее время методы и подходы с использованием ДНК-маркеров и геномных технологий.

Недавно появился ряд работ, затрагивающих молекулярные аспекты эволюции и филогении рода *Avena* (Fu, 2018; Peng et al., 2018, 2022; Latta et al., 2019; Ahmad et al., 2020; Liu et al., 2020; Fominaya et al., 2021; Jiang et al., 2021; Yan et al., 2021). В многочисленных исследованиях используют различные маркеры, такие как последовательности ITS1-гена 5.8S рРНК-ITS2 (Rodionov et al., 2005; Nikoloudakis et al., 2008; Nikoloudakis, Katsiotis, 2008; Тюпа и др., 2009), внешние транскрибируемые спейсеры (Rodrigues et al., 2017). Эти работы прояснили ряд родственных взаимоотношений между видами *Avena* с разными геномами (см. таблицу).

При изучении родства гексаплоидных *A. sativa*, *A. sterilis* и диплоида *A. strigosa* были использованы ретротранспозоны и ITS-последовательности. Анализ ITS-последовательностей показал очень высокую гомологию у всех трех видов, но при проведении FISH (fluorescent *in situ* hybridization) обнаружены различия в расположении ядрышковых организаторов (содержащих рДНК). По картине полиморфизма ретротранспозонов гексаплоид *A. sativa* оказался ближе к *A. sterilis*, чем к диплоиду *A. strigosa* (Tomas et al., 2016). Диплоидные дикие виды, обладая наибольшим разнообразием форм в западной части Средиземноморья, предположительно, дали начало культурному виду *A. strigosa*, который шире всего распространен на

Система подрода *Avena* рода *Avena* L. (Лоскутов, 2007)

Секция	Виды			Геном	2*n*
	Дикорастущие		Культурные		
	осыпающиеся цветками	осыпающиеся колосками			
Aristulatae (Malzew) Losk. comb. nova	*A. clauda* Durieu	*A. pilosa* M. B.		Cp	14
	A. longiglumis Durieu			Al	
	A. damascena Rajhathy & B.R. Baum			Ad	
	A. prostrata Ladiz.			Ap	
	A. wiestii Steud.	*A. atlantica* B.R. Baum & Fedak		As	
	A. hirtula Lag.		*A. strigosa* Schreb.		
	A. barbata Pott ex Link			AB	28
	A. vaviloviana (Malzew) Mordv.		*A. abyssinica* Hochst.		
Avenae		*A. ventricosa* Balansa		Cv	14
		A. bruhnsiana Gruner			
		A. canariensis B.R. Baum, Rajhathy & D.R. Sampson		Ac	
		A. agadiriana B.R. Baum & Fedak		AB	28
		A. magna H.C. Murphy & Terrell		AC	
		A. murphyi Ladiz.			
		A. insularis Ladiz.		AC?	
	A. fatua L.	*A. sterilis* L.	*A. byzantina* K. Koch	ACD	42
	A. occidentalis Durieu	*A. ludoviciana* Durieu	*A. sativa* L.		

Пиренейском п-ове. Дикие виды *A. hirtula* и *A. wiestii*, по всей видимости, дали начало автотетраплоидному виду *A. barbata* (Holden, 1979; Thomas, 1995).

Исследование происхождения полиплоидных видов овса путем сравнительного изучения характеристик генома и ДНК-маркеров пока не позволяет сделать однозначных выводов. Так, C. Li с коллегами (2000) изучили встречаемость видоспецифичной сателлитной ДНК ASS49 у 40 микросателлитов и 4 минисателлитов среди диплоидов и полиплоидов для того, чтобы определить вид, который был диплоидным и тетраплоидным предком гексаплоидного овса. Это сравнение показало, что геном Ac диплоида *A. canariensis* B.R. Baum, Rajhathy & D.R. Sampson является вероятным предковым геномом для субгеномов A гексаплоидов скорее, чем *A. strigosa*, обычно рассматриваемая в этом качестве.

Однако изучение других полиморфных маркеров дает иные результаты. Так, паттерны AFLP ди-, тетра- и гексаплоидных видов овса показывают, что не *A. canariensis*, а *A. wiestii* представляется более вероятным донором геномов A гексаплоидов с геномной конституцией ACD (Fu, Williams, 2008).

С помощью проб ДНК изучали порядок последовательностей нуклеотидов у видов с различными хромосомными наборами. Проба pAs102, выделенная из *A. strigosa* (As), при *in situ* гибридизации показала, что последовательности, комплементарные этой пробе, проходят через диплоиды с геномами A и C, тетраплоиды – с геномом AC и гексаплоиды – с геномом ACD. С другой стороны, гомологичные последовательности пробы pAs102 найдены у *A. strigosa*, *A. longiglumis* Durieu и *A. sativa*, не очень точная последовательность присутствует у *A. murphyi* Ladiz. и полностью отсутствует в остальных диплоидных видах с вариантами геномов A и C (Linares et al., 1996, 1998).

Предполагается, что тетраплодный дикий вид *A. vaviloviana* (культурный аналог *A. abyssinica*) по некоторым морфологическим признакам близок к гексаплоидному дикому виду *A. occidentalis* Durieu, первоначально найденному в Алжире. Установлено, что по некоторым морфологическим признакам *A. vaviloviana* и *A. abyssinica* могут быть реликтами древней флоры Африки (Baum, 1971). Кроме того, B. Baum (1972) отмечает, что было найдено морфологическое сходство между тремя видами – *A. vaviloviana*, *A. occidentalis* и сомнительным, с нашей точки зрения, видом *A. septentrionalis*, который А.И. Мальцев (1930) относил к подвиду *A. fatua*, произрастающему в Сибири. Эти виды в настоящее время размещаются на территории в виде разорванных (дизъюнктивных) ареалов реликтового характера и, таким образом, подтверждают точку зрения, согласно которой виды рода *Avena* в недавнем геологическом прошлом занимали сплошные (а не разобщенные) и разнообразные ареалы по сравнению с ареалами современных видов (Baum, 1971; Rajhathy, 1971).

Генетическое единство и интерфертильность *A. barbata* и *A. vaviloviana* с *A. abyssinica* были подтверждены генетическим изучением гибридов. Предполагается, что

сорный вид *A. barbata*, занесенный в Эфиопию с зерном ячменя, дал начало культурному виду *A. abyssinica*, который до настоящего времени засоряет посевы ячменя (Thomas, 1995). На основе материала по изучению и анализу межвидовых скрещиваний, структуры хромосом, морфологических, биохимических признаков и географического распространения видов было сделано заключение, что диплоидные виды с геномом As (*hirtula-wiestii*) были родоначальниками группы тетраплоидных видов с геномом AB (*barbata-vaviloviana-abyssinica*) или AA′. В свою очередь, последняя группа, эволюционно не связанная ни с какой другой группой видов овса, и является боковой ветвью рода *Avena* (Rajhathy, Thomas, 1974).

В соответствии с данными F.A. Coffman (1977), родоначальник разнообразия культурных гексаплоидных форм – вид *A. sterilis*, происходящий с Азиатского континента. От этого вида, по всей видимости, произошел культурный вид *A. byzantina*, а затем появился злостный сорняк, засоряющий культурные посевы, – вид *A. fatua*. Дальнейшее рассмотрение вопросов эволюции гексаплоидных видов показало, что при изучении транслокаций в хромосомах овса и соотношении географического распределения различных форм с использованием кластерного анализа данных отмечена большая степень генетического родства между образцами вида *A. byzantina* и формами *A. sterilis* из северной Месопотамии, с одной стороны, и образцами *A. sativa* и формами *A. sterilis* из восточной Анатолии, с другой (Zhou et al., 1999).

Изучение всех гексаплоидных видов показало, что для вида *A. sativa* характерно наличие транслокаций (97 %), в отличие от вида *A. byzantina* (11 %). В результате было высказано предположение, что два культурных вида, *A. sativa* и *A. byzantina*, независимо друг от друга вошли в культуру. Исследование видов *A. fatua* и *A. occidentalis* выявило, что большинство форм этих видов имеют такие же транслокации, как и *A. sativa*, и, вследствие этого, считаются боковыми ветвями эволюции овса (Jellen, Beard, 2000).

Различия в размере генома между видами с разными уровнями плоидности были существенными и зависели от геномной дупликации, в то время как такие изменения в геномных размерах внутри определенного уровня плоидности были связаны в основном с разной геномной композицией. Метод поточной цитометрии позволил диагностировать отдельные виды и в ряде случаев установить межгеномное родство между ними (Yan et al., 2016).

С использованием 12 пар праймеров микросателитных маркеров хлоропластного генома было проанализировано 70 образцов 25 видов рода *Avena* из коллекции ВИР. Обнаружено от 2 до 9 аллелей, среднее значение генетического разнообразия (H) составило 0.479. По различиям длины аллелей выделено 45 гаплотипов. Наиболее полиморфными были диплоидные виды *A. eriantha* Durieu (*A. pilosa* M. B.) и *A. ventricosa* Balansa с геномом C, один из диплоидных видов с геномом As (*A. atlantica* B.R. Baum & Fedak) и тетраплоидные виды *A. insularis* Ladiz. (геном AC) и *A. agadiriana* B.R. Baum & Fedak (геном AaBa). Вид *A. insularis*, который часто рассматривается как наиболее близкий к гексаплоидным видам, вероятно, является наиболее примитивным среди тетраплоидных видов с геномом AC и не может быть прямым предком гексаплоидных видов. Это исследование позволило найти новые информативные маркеры для анализа хлоропластного генома рода *Avena* и уточнить данные о филогенетических взаимоотношениях видов овса (Yan et al., 2016).

На основе секвенированного и аннотированного эталонного генома овса выявлены и охарактеризованы локусы количественных признаков (QTL), представляющие хозяйственно ценные признаки и признаки, связанные с качеством зерна у популяций культурного овса *A. sativa*. Обнаружены сильные и значимые связи между позициями генов-кандидатов и QTL, которые влияют на дату колошения, а также на концентрацию масла и β-глюканов в зерновке (Tinker et al., 2022).

В 2022 г. были полностью секвенированы геномы трех видов рода *Avena* L. – аллогексаплоидного культурного вида посевного овса (*Avena sativa*, AACCDD, $2n = 6x = 42$) и двух его близких родственников, диплоидного (*A. longiglumis*, AA, $2n = 14$) и тетраплоидного (*A. insularis*, CCDD, $2n = 4x = 28$) диких видов.

Работа N. Kamal с коллегами (2022) по результатам полногеномного секвенирования показала, что эталонный геном культурного овса *A. sativa* имеет мозаичную структуру, резко отличающуюся от геномов других представителей семейства Poaceae. Это исследование выявило, что при образовании гексаплоидного вида овса в субгеномы A и D были перераспределены не менее 226 Мб богатых генами областей из субгенома C, что связано не с потерей отдельных генов, а с большим числом транслокаций в последнем. В отличие от гексаплоидной мягкой пшеницы, скрещивания видов с различной плоидностью и чужеродные интрогрессии были чрезвычайно сложны у рода *Avena*, что позволяет предположить наличие несовместимой архитектуры генома, которая является дополнительным барьером, препятствующим генетическому улучшению посевного овса. При транскриптомном анализе средние значения экспрессии в шести тканях показали, что гены субгенома C были менее экспрессированы (32.32 %), чем гены в субгеномах D (33.53 %) и A (33.76 %). Сетевой подход продемонстрировал, что экспрессия генов из субгенома C обнаруживалась в дивергентных модулях экспрессии чаще, чем у их гомеологов из субгеномов A и D (Kamal et al., 2022).

На основе секвенированного и аннотированного эталонного генома овса исследованы полногеномные профили рекомбинации для подтверждения наличия крупной несбалансированной транслокации с хромосомы 1C на хромосому 1A и возможной инверсии на хромосоме 7D, которые типичны для овса (Tinker et al., 2022).

В дальнейшем было рассчитано время расхождения трех субгеномов овса. Время дивергенции составило: субгенома A – ~47.3 тыс. лет назад, субгенома C − ~47.0, субгенома D − ~53.3 тыс. лет назад (Nan et al., 2023).

Комплексное изучение разнообразия видов рода *Avena* с использованием методов секвенирования следующего поколения (NGS)

Комплексное изучение репрезентативного набора образцов с широким эколого-географическим разнообразием всех четырех культурных видов и 21 дикого вида рода *Avena* L., имеющих разный уровень плоидности, из кол-

лекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР) показало, что диплоидный вид *A. bruhnsiana* Gruner имеет гибридное происхождение (нотовид), одним из его предков был *A. ventricosa*, а вторым, по-видимому, – *A. clauda*. Поскольку кариотип *A. bruhnsiana* диплоидный (2*n* = 14) (Лоскутов, Абрамова, 2006), можно предположить, что это гомоплоидный гибрид. Судя по разнообразию последовательностей рДНК, вероятно, и сам *A. clauda* также гомоплоидный гибрид: один из его основных риботипов идентичен *A. pilosa*, а другой обособлен (Gnutikov et al., 2022b).

Таким образом, из четырех исследованных диплоидных видов овса с геномом C два являются гомоплоидными гибридами. Установлено также, что виды с двумя ядрышковыми организаторами в геноме на разных хромосомах зачастую имеют как минимум два риботипа, тогда как *A. ventricosa*, обладающий одним ядрышковым организатором (NOR), имеет только один риботип. Это может указывать на то, что гомогенизация рДНК происходит в пределах одного NOR более эффективно, чем гомогенизация рДНК по локусам, лежащим на разных хромосомах. Возможно, это объясняется тем, что один из механизмов гомогенизации рДНК связан с конъюгацией гомологичных хромосом и, следовательно, более эффективно происходит внутри одного NOR, чем между NOR, располагающимися на разных хромосомах (Eickbush T.H., Eickbush D.G., 2007; Sochorová et al., 2018).

Среди изученных C-геномных видов овса имеется один автотетраплоид (2*n* = 28) − многолетний, перекрестноопыляемый узкоэндемичный вид из Алжира *A. macrostachya* Balansa & Durieu. Этот вид считается самым древним видом рода *Avena* (Nikoloudakis, Katsiotis, 2008; Peng et al., 2008, 2010). По своим морфологическим признакам этот многолетник – примитивный представитель рода *Avena* (Мальцев, 1930). Некоторые исследователи даже относили его к роду *Helictotrichon* Besser (Holub, 1958). *Avena macrostachya* отличается от диплоидных видов овса с геномом C симметричным кариотипом с преобладанием равноплечих хромосом, отсутствием диффузного гетерохроматина, преимущественно прицентромерным расположением C-позитивных полос, а также размерами и морфологией сателлитных хромосом (Badaeva et al., 2010). Как оказалось, симметричный кариотип не характерен для диплоидных видов с геномом C. В то же время крупные блоки C-гетерохроматина в прицентромерных районах хромосом этого вида указывают на его родство с видами с геномом C. Это подтверждает наличие у *A. macrostachya* особого типа генома C, обозначенного как CmCm (Rodionov et al., 2005). Считалось также, что *A. macrostachya* могла иметь неописанный ранее геном EE (Лоскутов, 2007). Наш анализ данных NGS по последовательностям 18S-ITS1-5.8S рДНК показал, что риботипы *A. macrostachya* сравнительно далеки от других существующих C-геномных овсов.

Анализ внутригеномного полиморфизма рДНК диплоидных видов овса с разными вариантами генома A выявил существенные различия в числе риботипов, гаплотипов, индексах нуклеотидного разнообразия, генетической дистанции и генетической дифференциации (Rodionov et al., 2005).

В изучении были использованы образцы с большим эколого-географическим разнообразием, которые представляли все варианты генома A − As (*A. atlantica*, *A. hirtula*, *A. wiestii*), Ac (*A. canariensis*), Ad (*A. damascena* Rajhathy & B.R. Baum), Al (*A. longiglumis*), Ap (*A. prostrata* Ladiz.). В анализ также был взят один вид с геномом C – *A. clauda*. Последовательности 169 образцов выделили 156 гаплотипов, из которых семь являются общими для двух-пяти видов. Обнаружено 16 риботипов, состоящих из уникальной последовательности с характерным набором однонуклеотидных полиморфизмов и делеций. Количество риботипов на вид варьировало от одного у *A. longiglumis* до четырех у *A. wiestii*. Хотя большинство риботипов были видоспецифичными, найдены два риботипа, общие для трех видов (один – для *A. damascena*, *A. hirtula* и *A. wiestii*, а второй – для *A. longiglumis*, *A. atlantica* и *A. wiestii*), и третий риботип – общий для *A. atlantica* и *A. wiestii*. Характерная особенность риботипа *A. clauda*, вида с диплоидным геномом C, – то, что у этого вида обнаружено два разных семейства риботипов. Некоторые из этих риботипов присущи видам с геномом Cp, тогда как другие тесно связаны с риботипами с геном As. Это означает, что *A. clauda* может быть гибридом овса с геномами As и C.

Несмотря на то что изученные виды рода *Avena* были диплоидами, оказалось, что большинство из них содержало несколько различных семейств рДНК. Сравнительное изучение паттернов рДНК у отдельных видов показало, что паттерн рДНК, как правило, мозаичен и во всех случаях видоспецифичен. В то же время виды овса с геномом A могут отражать события гибридизации, имевшие место в их эволюционном прошлом, как способ их видообразования (Loskutov et al., 2021; Gnutikov et al., 2022a).

В изучение был взят большой набор местных сортов с уникальными так называемыми сорно-полевыми разновидностями культурного овса, – это специализированные сорняки полбы и ячменя, которые распространяются с зерном культурных растений, засоряя посевы. Все разновидности сформировали отдельную кладу с хорошим уровнем поддержки, при этом различия их между собой невелики (p-расстояние от 0.003 до 0.02). Все они – гексаплоиды с геномом ACD (Loskutov, Rines, 2011), однако следует помнить, что секвенирование по Сэнгеру выявляет лишь наиболее массовый вариант субгенома в полиплоидном геномном наборе.

Результаты NGS показали два наиболее представленных по количеству последовательностей семейства риботипов в полиплоидном геномном наборе, общих почти для всех исследованных разновидностей из родства *A. fatua* и *A. sativa*. Эти два семейства риботипов соответствуют последовательностям генома A и D (A′)-генома, который, как предполагалось ранее, является вариантом генома A (Лоскутов, 2007). Причем большинство риботипов в этих геномах были общими для всех исследованных образцов.

Вызывает большой интерес и то, что последовательности генома C в общем пуле последовательностей гексаплоидов не обнаружены, они располагаются отдельно, образуя очень небольшую фракцию, вероятно, сильно измененную процессами постгибридизационной транс-

формации. Подобные данные подтверждаются и цитогенетическими исследованиями. Метод FISH показал, что субгеномы C полиплоидных видов овса потеряли большую часть рДНК, и на них удается выявить только очень слабые 35S рДНК-позитивные сигналы (Badaeva et al., 2010).

С помощью локус-специфичного ДНК-секвенирования на платформе Roche 454 изучили внутригеномный полиморфизм одного из районов гена 35S рРНК (фрагмент 18S рДНК–ITS1–фрагмент 5.8S рДНК) у трех гексаплоидных видов *Avena* с кариотипом AACCDD и у тетраплоида *A. insularis* (AACC или CCDD) (Rodionov et al., 2020). В геномах этих полиплоидов найдены рДНК, полученные от предков-диплоидов как с A-, так и C-геномами. У *A. insularis* вместо ожидаемых 50 % ITS1 C-типа было только 3.3 %, а у гексаплоидов рДНК, полученной от предков с геномами C, – только 1.4–2.4 %. Последовательности 18S рДНК, ITS1 и 5.8S рДНК субгеномов C были в 10 раз более вариабельны, чем те же последовательности субгеномов A. Некоторые из последовательностей субгеномов C содержали делеции, в том числе делеции в районе, кодирующем 18S рРНК.

Результаты FISH с зондами pTa71 и pTa794 подтверждают факт утраты полиплоидами значительной части 35S рДНК и 5S рДНК субгенома, полученного от диплоида с кариотипом CC. Последовательности ITS1 субгеномов C полиплоидных видов разнообразны, но среди них можно выделить основной (core) вариант, примерно равноудаленный от ITS диплоидов, несущих геномы Cv и Cp. Результаты показывают, что утрата 35S рДНК субгеномов C происходит на фоне накопления в этих последовательностях множества однонуклеотидных замен (SNP) и делеций. В «репрессируемых» локусах 35S рРНК субгеномов C множественное мутирование, по-видимому, не сопровождается гомогенизацией рДНК, есть основания думать, что процессы изогенизации рДНК и процессы транскрипции/сайленсинга – связанные явления (Rodionov et al., 2020).

Получение результатов с помощью метода локус-специфичного секвенирования следующего поколения на платформе Illumina позволило провести филогенетический анализ представительного внутривидового разнообразия культурных и диких видов рода *Avena.* Установлено, что диплоидные виды с геномом A (варианты геномов Al, Ap и As) в действительности являются не первичными диплоидами, а своеобразным средиземноморским интрогрессивно-гибридизационным комплексом видов, спорадически вступающих в межвидовые гибридизации. Определено, что вклад *A. canariensis* (считается донором генома A для гексаплоидов) в геномную конституцию гексаплоидов (ACD) незначителен, а сам он, по нашим данным, гибридного происхождения: в его формировании принимали участие два предковых вида с близкими, но не идентичными риботипами. Установлено, что тетраплоидный культурный вид *A. abyssinica*, вероятнее всего, происходит от дикорастущего *A. vaviloviana*. При этом вид *A. agadiriana*, считавшийся ранее предковым для *A. abyssinica* и его группы родства, формирует отдельные уникальные субгеномы (семейства риботипов).

Анализ путей одомашнивания трех культурных видов овса, *A. abyssinica*, *A. sativa*, *A. byzantina*, показал, что наиболее массовый риботип гексаплоида *A. sativa* унаследован от *A. ludoviciana*, а второй по массовости – от *A. magna* H.C. Murphy & Terrell. Культурный вид *A. byzantina* обладает двумя уникальными семействами риботипов, скорее всего, унаследованными от вымершего вида овса или криптовида, до сегодняшнего дня не обнаруженного (Гнутиков и др., 2021, 2022).

На представительном наборе видов овса (*Avena* L.) проанализировано происхождение диких полиплоидных видов. Для анализа NGS использовали участок 18S– ITS1–5.8S рДНК. У полиплоидных овсов обнаружено 15 основных риботипов (более 1000 прочтений на пул рДНК). Сравнивали пулы маркерных последовательностей полиплоидных видов овса с последовательностями предполагаемых диплоидных предков: *A. atlantica* (геном As), *A. hirtula* (As), *A. canariensis* (Ac), *A. ventricosa* (Cv) и *A. clauda* (палеополиплоид с геномом Cp и последовательностями рДНК, родственными геному A). Результаты подтвердили некоторые более ранние гипотезы о происхождении полиплоидных видов рода *Avena*. Тетраплоидные овсы, которые ранее были определены как виды с геномом AC, действительно имеют эту геномную конституцию. Полученные данные не подтверждают гипотезу о наборе генома CD у тетраплоидных видов *A. magna*, *A. murphyi* и *A. insularis*. При этом последовательности генома D не обнаружены у тетраплоидных овсов с геномом AC, родственных овсам с геномом ACD.

Последовательности, связанные с геномом A, возможно, были унаследованы от As-геномного вида *A. atlantica*, в то же время последовательности, связанные с геномом D, образовались уже у гексаплоидного овса или были взяты от неизвестного предка, родственного *A. clauda*. Обнаружено, что AB-тетраплоидный овес, возможно, унаследовал свои риботипы генома A от *A. atlantica* (As1-риботип), тогда как их риботип B генома специфичен и может быть производным от семейства геномов A. Последовательности генома A у видов генома ACD рода *Avena*, вероятно, были унаследованы от *A. murphyi* (AC). Последовательности, связанные с геномом C, могли быть получены от диплоидного вида *A. ventricosa*. Все гексаплоидные виды демонстрируют другой рисунок риботипов, чем тетраплоиды; основные риботипы, *A. fatua*, *A. ludoviciana* и *A. sterilis*, вероятно, принадлежат к D-группе и также являются общими с одним из основных риботипов диплоидного вида *A. clauda* (Gnutikov et al., 2023).

Заключение

Таким образом, на основании комплексного изучения полного внутривидового разнообразия из разных зон ареала культурных видов овса и анализа данных по географическому распределению ареалов форм и видов подтверждено, что место наибольшего распространения и формообразования видов рода *Avena* находится в западной части Средиземноморского центра происхождения культурных растений, а именно: на территории северо-западной части Африканского континента и частично на юго-западной оконечности Европы. Установлено, что

процесс формирования гексаплоидных видов шел также в западной части Средиземноморья, и затем при продвижении на восток эти формы стали занимать все большие пространства в районе Юго-Западного Азиатского центра, образуя большое внутривидовое разнообразие диких и переходных сорных форм к культурным видам гексаплоидного овса. Благодаря анализу внутривидового разнообразия староместных сортов были уточнены центры формообразования всех культурных видов овса.

Проведенный с помощью методов NGS филогенетический анализ представительного внутривидового разнообразия культурных и диких видов рода *Avena* показал, что диплоидные виды с вариантами генома A в действительности являются не первичными диплоидами, а своеобразным средиземноморским интрогрессивно-гибридизационным комплексом видов, спорадически вступающих в межвидовые гибридизации. Установлено, что тетраплоидный культурный вид *A. abyssinica*, вероятнее всего, происходит от дикого вида *A. vaviloviana*. Анализ путей одомашнивания культурных видов овса *A. sativa* и *A. byzantina* показал, что наиболее массовый риботип гексаплоида *A. sativa* унаследован от *A. ludoviciana*, а второй по массовости – от *A. magna*, в то же время *A. byzantina* обладает двумя уникальными семействами риботипов, скорее всего, унаследованными от вымершего вида овса или криптовида, до настоящего времени не обнаруженного. Гексаплоидные дикие виды демонстрируют другой, чем тетраплоиды, рисунок риботипов. Основные риботипы *A. fatua*, *A. ludoviciana* и *A. sterilis*, вероятно, принадлежат к D-группе и также являются общими с одним из основных риботипов диплоидного вида *A. clauda*.

Список литературы / References

Вавилов Н.И. Центры происхождения культурных растений. *Труды по прикл. ботанике и селекции*. 1926;16(2):248
[Vavilov N.I. The Centers of Origin of Cultivated Plants. In: *Trudy po Prikladnoy Botanike i Selektsii = Proceedings on Applied Botany and Plant Breeding*. 1926;16(2):248. (in Russian)]

Вавилов Н.И. Учение о происхождении культурных растений после Дарвина. (Доклад на Дарвиновской сессии АН СССР 28.11.1939). *Советская наука.* 1940;2:55-75
[Vavilov N.I. The doctrine of the origin of cultivated plants after Darwin. (Report at the Darwin symposium of the Academy of Sciences of the USSR, November 28, 1939). *Sovetskaya Nauka = Soviet Science.* 1940;2:55-75 (in Russian)]

Гнутиков А.А., Носов Н.Н., Лоскутов И.Г., Блинова Е.В., Родионов А.В. Молекулярно-филогенетическое исследование редких сорно-полевых видов рода *Avena* L. *Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии*. 2021;20(1):108-111. DOI 10.14258/pbssm.2021022
[Gnutikov A.A., Nosov N.N., Loskutov I.G., Blinova E.V., Rodionov A.V. Molecular phylogenetic study of rare weed species of the genus *Avena* L. *Problemy Botaniki Yuzhnoy Sibiri i Mongolii = Problems of Botany of South Siberia and Mongolia*. 2021;20(1):108-111. DOI 10.14258/pbssm.2021022 (in Russian)]

Гнутиков А.А., Носов Н.Н., Лоскутов И.Г., Блинова Е.В., Родионов А.В. Исследование филогенетических связей диких и культурных видов овса (*Avena* L.). *Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии*. 2022;21(2):16-20. DOI 10.14258/pbssm.2022046
[Gnutikov A.A., Nosov N.N., Loskutov E.M., Blinova E.V., Rodionov A.V. Study of phylogenetic relationships between wild and cultivated oat species (*Avena* L.). *Problemy Botaniki Yuzhnoy Sibiri i Mongolii = Problems of Botany of South Siberia and Mongolia*. 2022;21(2):16-20. DOI 10.14258/pbssm.2022046 (in Russian)]

Лоскутов И.Г. Овес (*Avena* L.). Распространение, систематика, эволюция и селекционная ценность. СПб.: ВИР, 2007
[Loskutov I.G. Oat (*Avena* L.). Distribution, Taxonomy, Evolution, and Breeding Value. St. Petersburg: VIR, 2007 (in Russian)]

Лоскутов И.Г. История мировой коллекции генетических ресурсов растений в России. СПб.: ВИР, 2009
[Loskutov I.G. The History of the World Collection of Plant Genetic Resources in Russia. St. Petersburg: VIR, 2009 (in Russian)]

Лоскутов И.Г., Абрамова Л.И. Морфологическое и кариологическое изучение дикорастущих видов рода *Avena* L. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции.* 2006;162:108-113
[Loskutov I.G., Abramova L.I. Morphological and karyological study of wild *Avena* L. species. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2006;162:108-113 (in Russian)]

Мальцев А.И. Овсюги и овсы (Sectio Euavena Griseb). Приложение 38. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции.* 1930
[Malzew A.I. Wild and cultivated oats (Sectio Euavena Griseb). Suppl. 38. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 1930 (in Russian)]

Мордвинкина А.И. Исходный материал для селекции овса в СССР. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 1960;32(2):57-100
[Mordvinkina A.I. Parent material for oat breeding in the USSR. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 1960;32(2):57-100 (in Russian)]

Родионова Н.А., Солдатов В.Н., Мережко В.Е., Ярош Н.П., Кобылянский В.Д. Культурная флора. Т. 2. Ч. 3. Овес. М.: Колос, 1994
[Rodionova N.A., Soldatov V.N., Merezhko V.E., Yarosh N.P., Kobylyansky V.D. Flora of Cultivated Plants. Vol. 2. Pt. 3. Oat. Moscow: Kolos Publ., 1994 (in Russian)]

Тюпа Н.Б., Ким Е.С., Родионов А.В., Лоскутов И.Г. К происхождению полиплоидов в роде *Avena* L.: молекулярно-филогенетические исследования. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 2009;165:13-20
[Tyupa N.B., Kim E.S., Rodionov A.V., Loskutov I.G. On the origin polyploids in the *Avena* L. genus: a molecular-phylogenetic investigation. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2009;165:13-20 (in Russian)]

Ahmad M., Jehangir I.A., Rizvan R., Dar S.A., Iqbal S., Wani S.H., Mehraj U., Hassan R. Phylogenetic relationship of oats (*Avena sativa* L.): A guide to conservation and utilisation of genetic resources. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2020;9(11):831-845. DOI 10.20546/ijcmas.2020.911.101

Badaeva E.D., Shelukhina O., Diederichsen A., Loskutov I.G., Pukhalskiy V.A. Comparative cytogenetic analysis of *Avena macrostachya* and diploid C-genome *Avena* species. *Genome*. 2010;53(2):125-137. DOI 10.1139/g09-089

Baum B.R. Taxonomic studies in *Avena abyssinica* and *A. vaviloviana*, and related species. *Can. J. Bot.* 1971;49(12):2227-2232. DOI 10.1139/b71-31

Baum B.R. *Avena septentrionalis*, and the semispecies concept. *Can. J. Bot*. 1972;50(10):2063-2066. DOI 10.1139/b72-264

Baum B.R. Oats: wild and cultivated. A monograph of the genus *Avena* L. (Poaceae). Ottawa: Biosystematics Research Institute, 1977

Coffman F.A. Oat History, Identification and Classification. Washington: United States Department of Agriculture, 1977

Eickbush T.H., Eickbush D.G. Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics*. 2007;175(2):477-485. DOI 10.1534/genetics.107.071399

Fominaya A., Loarce Y., González J.M., Ferrer E. Cytogenetic evidence supports *Avena insularis* being closely related to hexaploid oats. *PLoS One*. 2021;16(10):e0257100. DOI 10.1371/journal.pone.0257100

Fu Y.-B., Williams D.J. AFLP variation in 25 Avena species. *Theor. Appl. Genet*. 2008;117:333-342. DOI 10.1007/s00122-008-0778-3

Fu Y.B. Oat evolution revealed in the maternal lineages of 25 *Avena* species. *Sci. Rep*. 2018;8(1):4252. DOI 10.1038/s41598-018-22478-4

Gnutikov A.A., Nosov N.N., Loskutov I.G., Blinova E.V., Shneyer V.S., Probatova N.S., Rodionov A.V. New insights into the genomic structure of *Avena* L.: comparison of the divergence of A-genome and one C-genome oat species. *Plants*. 2022a;11(9):1103. DOI 10.3390/plants11091103

Gnutikov A.A., Nosov N.N., Loskutov I.G., Machs E.M., Blinova E.V., Probatova N.S., Langdon T., Rodionov A.V. New insights into the genomic structure of the oats (*Avena* L., Poaceae): intragenomic polymorphism of ITS1 sequences of rare endemic species *Avena bruhnsiana* Gruner and its relationship to other species with C-genomes. *Euphytica.* 2022b;218:3. DOI 10.1007/s10681-021-02956-z

Gnutikov A.A., Nosov N.N., Loskutov I.G., Blinova E.V., Shneyer V.S., Rodionov A.V. Origin of wild polyploid *Avena* species inferred from polymorphism of the ITS1 rDNA in their genomes. *Diversity*. 2023;15(6):717. DOI 10.3390/d15060717

Holden J.H.W. 28 Oats. *Avena* spp. (Gramineae–Aveneae). In: Simmonds N.W. (Ed.). Evolution of Crop Plants. London & New York: Longman, 1979;86-90

Holub J. Bemerkungen zur taxonomie der gattung *Helictotrichon* Bess. In: Klášterský I. (Ed.). Philipp Maxmilian Opiz und seine Bedeutung für die Pflanzentaxonomie. Prague: Verlag der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, 1958;101-133

Jellen E.N., Beard J.L. Geographical distribution of a chromosome 7C and 17 intergenomic translocation in cultivated oat. *Crop Sci*. 2000;40(1):256-263. DOI 10.2135/cropsci2000.401256x

Jiang W., Jiang C., Yuan W., Zhang M., Fang Z., Li Y., Li G., Jia J., Yang Z. A universal karyotypic system for hexaploid and diploid *Avena* species brings oat cytogenetics into the genomics era. *BMC Plant Biol*. 2021;21(1):213. DOI 10.1186/s12870-021-02999-3

Kamal N., Tsardakas Renhuldt N., Bentzer J., Gundlach H., Haberer G., Juhász A., Lux T., Bos U., Tye-Din J.A., Lang D., van Gessel N., Reski R., Fu Y.-B., Spégel P., Ceplitis A., Himmelbach A., Waters A.J., Bekele W.A., Colgrave M.L., Hansson M., Stein N., Mayer K.F.X., Jellen E.N., Maughan P.J., Tinker N.A., Mascher M., Olsson O., Spannagl M., Sirijovski N. The mosaic oat genome gives insights into a uniquely healthy cereal crop. *Nature.* 2022;606(7912):113-119. DOI 10.1038/s41586-022-04732-y

Ladizinsky G. Biological species and wild genetic resources in *Avena*. In: Proceedings 3rd International Oat Conference, Lund, Sweden, 4-8 July 1988. Printed by grants from Svalöv A.B. (Sweden), 1989;76-86

Ladizinsky G. Studies in Oat Evolution: A Man's Life with *Avena*. Heidelberg, Germany: Springer, 2012

Latta R.G., Bekele W.A., Wight C.P., Tinker N.A. Comparative linkage mapping of diploid, tetraploid, and hexaploid *Avena* species suggests extensive chromosome rearrangement in ancestral diploids. *Sci. Rep*. 2019;9(1):12298. DOI 10.1038/s41598-019-48639-7

Li C., Rossnagel B., Scoles G. The development of oat microsatellite markers and their use in identifying relationships among *Avena* species and oat cultivars. *Theor. Appl. Genet*. 2000;101:1259-1268. DOI 10.1007/s001220051605

Linares C., Gonzalez J., Ferrer E., Fominaya A. The use of double flurescence *in situ* hybridization to physical map the position of 5S rDNA genes in relation to the chromosomal location of 18S-5.8S-26S rDNA and a C genome specific DNA sequence in the genus *Avena*. *Genome*. 1996;39(3):535-542. DOI 10.1139/g96-068

Linares C., Ferrer E., Fominaya A. Discrimination of the closely related A and D genomes of the hexaploid *Avena sativa* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998;95(21):12450-12455. DOI 10.1073/pnas.95.21.12450

Liu Q., Li X., Li M., Xu W., Schwarzacher T., Heslop-Harrison J.S. Comparative chloroplast genome analyses of *Avena*: insights into evolutionary dynamics and phylogeny. *BMC Plant Biol*. 2020;20(1):406. DOI 10.1186/s12870-020-02621-y

Loskutov I.G. Vavilov and his Institute. A History of the World Collection of Plant Resources in Russia. Rome: IPGRI, 1999

Loskutov I.G., Rines H.W. Avena. In: Kole C. (Ed.). Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. Heidelberg; Berlin: Springer, 2011;109-183. DOI 10.1007/978-3-642-14228-4_3

Loskutov I.G., Gnutikov A.A., Blinova E.V., Rodionov A.V. The origin and resource potential of wild and cultivated species of the genus of oats (*Avena* L.). *Russ. J. Genet.* 2021;57(6):642-661. DOI 10.1134/S1022795421060065

Nan J., Ling Y., An J., Wang T., Chai M., Fu J., Wang G., Yang C., Yang Y., Han B. Genome resequencing reveals independent domestication and breeding improvement of naked oat. *GigaScience*. 2023;12:giad061. DOI 10.1093/gigascience/giad061

Nikoloudakis N., Katsiotis A. The origin of the C-genome and cytoplasm of *Avena* polyploids. *Theor. Appl. Genet.* 2008;117(2):273-281. DOI 10.1007/s00122-008-0772-9

Nikoloudakis N., Skaracis G., Katsiotis A. Evolutionary in sights inferred by molecular analysis of the ITS1-5.8S-ITS2 and IGS *Avena* sp. sequences. *Mol. Phylogenet. Evol*. 2008;46(1):102-115. DOI 10.1016/j.ympev.2007.10.007

Peng Y.Y., Wei Y.M., Baum B.R., Zheng Y.L. Molecular diversity of 5S rDNA gene and genomic relationships in genus *Avena* (Poaceae: Aveneae). *Genome*. 2008;51(2):137-154. DOI 10.1139/G07-111

Peng Y.Y., Wei Y.M., Baum B.R., Jiang Q.T., Lan X.J., Dai S.F., Zheng Y.L. Phylogenetic investigation of *Avena* diploid species and the maternal genome donor of *Avena* polyploids. *Taxon*. 2010;59(5):1472-1482. DOI 10.1002/tax.595012

Peng Y., Zhou P., Zhao J., Li J., Lai S., Tinker N.A., Liao S., Yan H. Phylogenetic relationships in the genus *Avena* based on the nuclear *Pgk1* gene. *PLoS One.* 2018;13(11):e0200047. DOI 10.1371/journal.pone.0200047

Peng Y., Yan H., Guo L., Deng C., Wang C., Wang Y., Kang L., Zho P., Yu K., Dong X., Liu X., Sun Z., Peng Y., Zhao J., Deng D., Xu Y., Li Y., Jiang Q., Li Y., Wei L., Wang J., Ma J., Hao M., Li W., Kang H., Peng Z., Liu D., Jia J., Zheng Y., Ma T., Wei Y., Lu F., Ren C. Reference genome assemblies reveal the origin and evolution of allohexaploid oat. *Nat. Genet*. 2022;54(8):1248-1258. DOI 10.1038/s41588-022-01127-7

Rajhathy T. The allopolyploid model in *Avena*. In: Stadler Genetics Symposia. Vol. 3. Columbia: University of Missouri, 1971;71-87

Rajhathy T., Thomas H. Cytogenetics of oats (*Avena* L.). Ottawa: Genetics Society of Canada, 1974

Rodionov A.V., Tyupa N.B., Kim E.S., Machs E.M., Loskutov I.G. Genomic configuration of the autotetraploid oat species *Avena macrostachya* inferred from comparative analysis of ITS1 and ITS2 sequences: on the oat karyotype evolution during the early events of the *Avena* species divergence. *Russ. J. Genet*. 2005;41(5):518-528. DOI 10.1007/s11177-005-0120-y

Rodionov A.V., Amosova A.V., Krainova L.M., Machs E.M., Mikhailova Yu.V., Gnutikov A.A., Muravenko O.V., Loskutov I.G. Phenomenon of multiple mutations in the 35S rRNA genes of the C subgenome of polyploid *Avena* L. species. *Russ. J. Genet*. 2020;56(6):674-683. DOI 10.31857/S0016675820060090

Rodrigues J., Viegas W., Silva M. 45S rDNA external transcribed spacer organization reveals new phylogenetic relationships in *Avena* genus. *PLoS One*. 2017;12(4):e0176170. DOI 10.1371/journal.pone.0176170

Sochorová J., Garcia S., Gálvez F., Symonová R., Kovařík A. Evolutionary trends in animal ribosomal DNA loci: introduction to a new online database. *Chromosoma*. 2018;127(1):141-150. DOI 10.1007/s00412-017-0651-8

Thomas H. 29 Oats. *Avena* spp. (Gramineae–Aveneae). In: Smartt J., Simmonds N.W. (Eds.). Evolution of Crop Plants. Harlow: Longman Scientific and Technical, 1995;132-137

Tinker N.A., Wight C.P., Bekele W.A., Yan W., Jellen E.N., Renhuldt N.T., Sirijovski N., Lux T., Spannagl M., Mascher M. Genome analysis in *Avena sativa* reveals hidden breeding barriers and opportunities for oat improvement. *Commun. Biol*. 2022;5(1):474. DOI 10.1038/s42003-022-03256-5

Tomas D., Rodrigues J., Varela A., Veloso M.M., Viegas W., Silva M. Use of repetitive sequences for molecular and cytogenetic characterization of *Avena* species from Portugal. *Int. J. Mol. Sci*. 2016;17(2): 203. DOI 10.3390/ijms17020203

Vavilov N.I. The Linnean species as a system. Report of proceeding of V International Botanical Congress. Cambridge. 1931;213-216

Vavilov N.I. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. New York: Ronald Press, 1951

Vavilov N.I. Origin and Geography of Cultivated Plants. Cambridge: Cambridge University Press, 1992

Vavilov N.I. Five Continents. Rome: IPGRI/VIR, 1997

Yan H., Bekele W.A., Wight Ch.P., Peng Y., Langdon T., Latta R.G., Fu Y.-B., Diederichsen A., Howarth C.J., Jellen E.N., Boyle B., Wei Y., Tinker N.A. High-density marker profiling confirms ancestral genomes of *Avena* species and identifies D-genome chromosomes of hexaploid oat. *Theor. Appl. Genet*. 2016;129(11):2133-2149. DOI 10.1007/s00122-016-2762-7

Yan H., Ren Z., Deng D., Yang K., Yang C., Zhou P., Wight C.P., Ren C., Peng Y. New evidence confirming the CD genomic constitutions of the tetraploid *Avena* species in the section *Pachycarpa* Baum. *PLoS One*. 2021;16(1):e0240703. DOI 10.1371/journal.pone.0240703

Zhou X., Jellen E.N., Murphy J.P. Progenitor germplasm of domisticated hexaploid oat. *Crop Sci*. 1999;39(4):1208-1214. DOI 10.2135/cropsci1999.0011183X003900040042x

Zukovskij P.M. Cultivated Plants and Their Wild Relatives. London: C'wealth Agric. Bureaux, 1962

ORCID
I.G. Loskutov orcid.org/0000-0002-9250-7225
A.A. Gnutikov orcid.org/0000-0002-5264-5594
E.V. Blinova orcid.org/0000-0002-8898-4926
A.V. Rodionov orcid.org/0000-0003-1146-1622

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке проекта Минобрнауки России «Национальная сетевая коллекция генетических ресурсов растений для эффективного научно-технологического развития РФ в сфере генетических технологий» по соглашению № 075-15-2021-1050 от 28.09.2021. Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Вклад авторов. Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 20.04.2023. После доработки 10.09.2023. Принята к публикации 12.09.2023.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023;27(8):933-946
DOI 10.18699/VJGB-23-108

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

Аллельное разнообразие генов *Vrn* и контроль типа и скорости развития у пшениц

С.Э. Смоленская, Н.П. Гончаров ✉

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
✉ gonch@bionet.nsc.ru

Аннотация. Пшеница, являясь одной из трех основных продовольственных культур мира, занимает самый широкий ареал за счет адаптивности к разнообразным условиям возделывания. В обзоре рассматриваются полиморфизм и аллельная изменчивость генов *Vrn* (от англ. *response to vernalization*), контролирующих важнейшие адаптационные признаки пшениц – тип (яровость *vs.* озимость) и скорость развития у диких и возделываемых видов пшениц (род *Triticum* L.). Суммируется информация об аллельном разнообразии генов *Vrn* и обсуждается связь полиморфизмов этих генов на молекулярном уровне с их влиянием не только на признак «тип развития (яровость *vs.* озимость)», но и на признак «скороспелость (длина вегетационного периода яровых растений, ДВП)» у ди-, тетра- и гексаплоидных видов. Предпринята попытка связать полученную информацию о мутациях (полиморфизмах) доминантных аллелей генов *Vrn* с выраженностью наиболее важного с хозяйственной точки зрения признака «продолжительность ДВП (скороспелость)», которая ранее в обзорах не предпринималась. Рассматривается влияние мутаций (полиморфизмов) в последовательностях рецессивных генов *vrn* на признак «потребность в яровизации» у озимых форм растений пшениц и выполнена его формализация. Обсуждается эволюция озимости/яровости в роде *Triticum*. На основе выявленных полиморфизмов построена схема филогенетических взаимодействий аллелей генов *Vrn* и рассматриваются возможности расширения полиморфизма по доминантным генам *Vrn* и их аллелям за счет видов-сородичей и редко используемых алелей и перспективы селекции на изменение ДВП (скороспелости) для конкретных зон возделывания.
Ключевые слова: пшеница; гены *Vrn*; яровость; озимость; длина вегетационного периода; скороспелость.

Для цитирования: Смоленская С.Э., Гончаров Н.П. Аллельное разнообразие генов *Vrn* и контроль типа и скорости развития у пшениц. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(8):933-946. DOI 10.18699/VJGB-23-108

Allelic diversity of the *Vrn* genes and the control of growth habit and earliness in wheat

S.E. Smolenskaya, N.P. Goncharov ✉

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
✉ gonch@bionet.nsc.ru

Abstract. Wheat is one of three main food crops around the world, which has the largest distribution area due to its adaptation to the different environments. This review considers polymorphisms and allelic variation of the vernalization response genes *Vrn* controlling the major adaptation traits in wheats (the genus *Triticum* L.): growth habit (spring *vs.* winter) and length of vegetative period (earliness). The review summarizes available information on the allelic diversity of the *Vrn* genes and discusses molecular-level relationships between *Vrn* polymorphisms and their effect on growth habit (spring *vs.* winter) and earliness (length vegetative period in spring plants) in di-, tetra- and hexaploid wheat species. A unique attempt has been made to relate information on mutations (polymorphisms) in dominant *Vrn* alleles to the values of the commercially most important trait "length of plant vegetative period (earliness)". The effects of mutations (polymorphisms) in the recessive *vrn* genes on vernalization requirement in winter wheats are considered, and this trait was formalized. The evolution of the winter/spring growth habit in the genus *Triticum* species is discussed. A scheme of phylogenetic interactions between *Vrn* alleles was constructed on the basis of these polymorphisms; the paper considers the possibilities to enhance the diversity of polymorphisms for the dominant *Vrn* genes and their alleles using wheat related species and rarely used alleles and discusses the prospects of breeding for improved earliness for concrete agroecological zones.
Key words: wheat; *Vrn* genes; winter/spring growth habit; length of plant vegetative period; earliness.

For citation: Smolenskaya S.E., Goncharov N.P. Allelic diversity of the *Vrn* genes and the control of growth habit and earliness in wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(8):933-946. DOI 10.18699/VJGB-23-108

© Смоленская С.Э., Гончаров Н.П., 2023
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

Введение

У многих видов культурных и дикорастущих травянистых растений умеренного климатического пояса имеются яровые (криофобные) и озимые (криофильные) формы, возникшие как результат их адаптации к условиям произрастания (Гупало, Скрипчинский, 1971). Яровые растения проходят весь цикл развития в течение одного вегетационного сезона, в то время как озимые не переходят к генеративному развитию без предварительного воздействия низкой температурой.

У диких и возделываемых видов пшениц задержка перехода от вегетативного развития к генеративному определяется генами *Vrn* (от англ. *response to vernalization*), регулирующими тип (яровость *vs*. озимость) и скорость развития, генами *Vrd* (от англ. *response to duration vernalization requirement*), контролирующими продолжительность яровизации у озимых форм, и генами *Ppd* (от англ. *response to photoperiod*), отвечающими за реакцию на длину дня (чувствительность к фотопериоду). Любой из доминантных генов *Vrn*, а именно *Vrn-1* (Yan et al., 2003), *Vrn-3* (Yan et al., 2006) и *Vrn-D4* (Kippes et al., 2016), обусловливает яровой тип развития и эпистатичен аллелям озимого типа развития. Исключение – доминантный ген *Vrn2*, описанный у *Triticum monococcum* L. (Yan et al., 2004a), контролирующий озимый тип развития и не функциональный у полиплоидных пшениц.

Одной дозы любого доминантного аллеля гена *Vrn*, кроме *Vrn2*, достаточно, чтобы растение развивалось по яровому типу (Pugsley, 1971; Yan et al., 2004b; Fu et al., 2005; Knippes et al., 2018). Озимые сорта гексаплоидных пшениц гомозиготны по рецессивным аллелям одновременно во всех трех генах *Vrn-1* (Стельмах, 1987), тетраплоидных пшениц – по двум генам, *Vrn-A1* и *Vrn-B1*, так как доминантные гены *Vrn-3* и *Vrn-D4* не имеют рецессивных аллелей, поэтому все озимые сорта несут их нуль-аллели. Взаимодействие генов *Vrd* и *Vrn* не определено. В ряде работ предложены схемы взаимодействия генов *Vrn* с генами *Ppd* (Chen A. et al., 2014). Однако механизмы, лежащие в основе взаимодействий этих генов, до конца не изучены (Гончаров, 2012; Киселёва, Салина, 2018). По экспертным оценкам, на систему генов *Vrn* приходится до 75 %, а генов *Ppd* – около 20 % контроля изменчивости по признаку «длина вегетационного периода» (ДВП) (Стельмах, 1981). Третья группа локусов EPS (от англ. *earliness per se*), контролирующих собственно скороспелость, характеризуется полигенным контролем (van Beem et al., 2005; Royo et al., 2020) и обусловливает не более 5 % изменчивости по ДВП (Стельмах, 1981).

Гены *Vrn-1*, контролирующие адаптивность растений пшеницы к условиям произрастания (признаки «яровость-озимость» и «скороспелость»), относятся к транскрипционным факторам (Trevaskis et al., 2003; Yan et al., 2003), детермирующим экспрессию многих генов, участвующих в контроле онтогенеза. Наличие мутаций в таких генах приводит не только к нарушению их функции, но и к значительным изменениям фенотипа растения. У пшениц ДВП (скороспелость) – важнейшая характеристика, позволяющая как диким, так и возделываемым видам максимально полно использовать всю продолжительность благоприятного для развития растений весенне-летнего сезона. При этом гены *Vrn* опосредованно влияют на продуктивность растений, а также на их устойчивость к стресс-факторам, таким как засуха, низкие температуры, вредители, болезни и пр. (Zotova et al., 2019).

В настоящей статье рассмотрены результаты современных молекулярно-генетических исследований контроля типа (яровость/озимость) и влияние аллельного разнообразия генов *Vrn* на ДВП у яровых форм.

Число локусов *Vrn* у пшениц

К настоящему времени описано шесть доминантных генов *Vrn*, а именно: три *Vrn-1* (Yan et al., 2003), два *Vrn-3* (Nishimura et al., 2018), один *Vrn-D4* (Kippes et al., 2016), и один рецессивный *vrn-2* (Yan et al., 2004a), обусловливающих яровой тип развития. Рассмотрим их основные характеристики.

Локус VRN-1. У ди-, тетра- и гексаплоидных пшениц наиболее часто яровой тип развития контролируется генами *Vrn-1* (Генотипы…, 1985; Каталог…, 1987; Goncharov, 1998; Лысенко и др., 2014; и др.). Они локализованы на дистальных участках длинных плеч хромосом 5-й гомеологической группы: *Vrn-A1* – на 5AL (Law et al., 1976; Galiba et al., 1995; Dubcovsky et al., 1998), *Vrn-B1* – на 5BL (Barrett et al., 2002; Iwaki et al., 2002) и *Vrn-D1* – на 5DL (Law et al.,1976). Показано, что гены *Vrn-1* являются ортологами генов идентичности меристемы *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *CAULIFLOWER* (*CAL*), *APETALA1* (*AP1*) и *FURITFULL* (*FUL*), контролирующих переход генеративной меристемы в цветочную (Ferrándiz et al., 2000; Yan et al., 2003; Preston, Kellogg, 2006; Dhillon et al., 2010). Обнаружено, что в дополнение к роли в развитии плодолистиков и плодов у арабидопсиса, ген *FUL* также контролирует у него сроки зацветания (Ferrándiz et al., 2000). Позже был выявлен и охарактеризован еще один ген, *WAP1* (*Wheat APETALA1*), как AP1-подобный ген MADS-box у мягкой пшеницы, являющийся активатором перехода от вегетативного развития к генеративному (Yan et al., 2003). Его экспрессия начинается перед переходом растений к генеративному развитию и сохраняется до их созревания (Murai et al., 2003). Показано, что *WAP1* у пшеницы соответствует гену *Vrn-1* (Trevaskis et al., 2003).

Для доминантных аллелей *Vrn-A1* характерны инсерции и/или делеции в промоторной области гена, инсерции и/или делеции и SNP в последовательности 1-го интрона по сравнению с нативным рецессивным геном *vrn-A1* (Приложение)[1]. Большинство доминантных аллелей гена *Vrn-B1* отличается от рецессивного аллеля *vrn-B1* наличием делеций в первом интроне. Делеции или инсерции в 1-м интроне характерны также для доминантных аллелей гена *Vrn-D1*.

Несмотря на то что с использованием молекулярно-биологических методов было описано множество аллелей доминантных генов *Vrn* (Yan et al., 2004a, b; Fu et al., 2005; Liu et al., 2012; Milec et al., 2023), их влияние на признаки «продолжительность яровизации» и «время цветения» не всегда определялось (фиксировалось) исследователями (см. Приложение).

[1] Приложение см. по адресу:
https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2023-27/appx29.pdf

Локус VRN-2. Ген *Vrn2* (*Vrn-A^{m}2*) выявлен только у диплоидной пшеницы *T. monococcum* (Dubcovsky et al., 1998). Он был картирован в дистальной части длинного плеча хромосомы 5A^m внутри сегмента, перемещенного из 4A^{m}S (Dubcovsky et al., 2006). Показано, что локус VRN-2 включает два тесно сцепленных гена, *CCT ZCCT1* (zinc finger and CCT domain 1) и *ZCCT2* (zinc finger and CCT domain 2). Предполагалось, что экспрессия *Vrn-2* подавляется яровизацией (Yan et al., 2004a). Однако было установлено, что главным детерминантом экспрессии *Vrn-2* у диплоидных пшениц *T. monococcum* и *T. boeoticum* Boiss. и ячменя *Hordeum vulgare* L. является длина светового дня (Dubcovsky et al., 2006; Trevaskis et al., 2006).

Последовательность гена *Vrn-2* обнаружена у образцов озимой мягкой пшеницы Jagger и 2174. Ни в последовательности гена *Vrn-A2* в геноме A, ни в последовательности гена *Vrn-D2* не выявлены аллельные варианты (Chen Y. et al., 2009). Две дуплицированные копии *Vrn-B2* были найдены в образце 2174. Аллель *Vrn-B2* не был выделен из Jagger, что указывает на наличие у него нуль-аллеля этого гена. Нулевой аллель не оказывал влияния на время цветения в сегрегированной популяции. Картирование гена *Vrn-B2* показало, что обе его копии у образца 2174 были тесно связаны с SNP в хромосоме 4BL, что указывает на то, что дуплицированные гены *Vrn-B2* были расположены тандемным образом в одном и том же локусе. Идентичные последовательности *Vrn-B2* обнаружены в последовательностях контигов из 4BS, 2BS и 5DL Chinese Spring (CS) (International Wheat Genome Sequencing Consortium..., 2018). У *Aegilops squarrosa* L. (*Ae. tauschii* Coss.) последовательность гена *Vrn-D2* не обнаружена (Chepurnov et al., 2023). Таким образом, ген *Vrn-2* у тетра- и гексаплоидных видов пшениц не функционален (Tan, Yan, 2016).

Локус VRN-3. Доминантный ген *Vrn-B3* (ранее обозначался как *Vrn 5* или *Vrn-B4*) картирован на коротком плече хромосомы 7B с использованием 82 рекомбинантов от скрещивания сорта CS с замещенной линией CS/Hope 7B (Yan et al., 2006). Ген активируется яровизацией и длинным днем и идентифицирован как ортолог *FLOWERING LOCUS T* (гена *FT*) *Arabidopsis* (Yan et al., 2006; Cockram et al., 2007). Понимание роли *TaFT* в регуляции цветения осложняется существованием аналогичной (на 78 % идентичной) паралогичной копии *FT2* как у мягкой пшеницы (*TaFT2*), так и у ячменя (*HvFT2*) (Yan et al., 2006; Faure et al., 2007). Поскольку дупликация *TaFT/TaFT2* произошла после расхождения между этими злаками и *Arabidopsis*, она не зависит от дупликации *FT/TSF* – сестры-близнеца *FT*, обнаруженной у резуховидки (Li, Dubcovsky, 2008).

Доминантный ген *Vrn-A3* (гомолог гена *Vrn-B3*) обнаружен только у тетраплоидных пшениц и картирован в коротком плече хромосомы 7A (Nishimura et al., 2018). У мягких пшениц он, вероятно, не имеет гомологов и, как ген *vrn-2*, выявленный у *T. monococcum*, нефункционален.

Локус VRN-4. Доминантный ген *Vrn-D4* первоначально обнаружен у линии Gabo-2 (Knott, 1959; Pugsley, 1972; Goncharov, 2003), выделенной из австралийского коммерческого сорта мягкой пшеницы Gabo. Он локализован в хромосоме 5D (Kato, 1993), а позже картирован в центромерной области этой же хромосомы (Kippes et al., 2015). В настоящее время предполагают, что доминантный ген *Vrn-D4* мог возникнуть у полиплоидных пшениц в результате транслокации фрагмента размером ~290 т. п. н. из длинного плеча хромосомы 5A в проксимальную область короткого плеча хромосомы 5D (Kippes et al., 2015). Транслоцированный участок включает копию гена *Vrn-A1*, в которой произошел ряд мутаций в кодирующих и регуляторных областях (Kippes et al., 2015).

Ген экспрессируется на ранних стадиях развития яровых растений[2], при этом в его последовательности отсутствуют ранее описанные для доминантного гена *Vrn-A1* мутации, обусловливающие яровой тип развития у мягкой пшеницы (Yan et al., 2003, 2004b). Вместо них доминантный ген *Vrn-D4* имеет три близкорасположенных SNP в области первого интрона, где находится сайт связывания белка TaGRP2, описанного как отрицательный регулятор для *Vrn-A1* (Fu et al., 2005).

Генов-гомологов *Vrn-4* в геноме B к настоящему времени не описано. У *Ae. tauschii*, донора генома D гексаплоидных пшениц, доминантный ген *Vrn-D4* не выявлен (Chepurnov et al., 2023), следовательно, мутация возникла уже у полиплоидов.

Таким образом, яровые формы пшениц несут мутации в промоторе или первом интроне генов *Vrn* (Yan et al., 2004b; Fu et al., 2005). При этом большинство описанных к настоящему времени доминантных аллелей генов *Vrn-1*, а именно: *Vrn-A1a*, *Vrn-A^{m}1a*, *Vrn-A1b*, *Vrn-A1d*, *Vrn-A1e*, *Vrn-A^{m}1g*, *Vrn-A1h* и *Vrn-A1i*, несут мутации в промоторной области в VRN-боксе, включая SNP, индели или его полную элиминацию (Shcherban, Salina, 2017). Выявленные мутации в генах *Vrn* представлены в Приложении. Данные о локализации генов *Vrn* в хромосомах суммированы в табл. 1. Они подтверждены в молекулярно-генетических исследованиях (Киселева, Салина, 2018).

Факт, что доминантные аллели генов *Vrn-1* несут вставки и делеции по сравнению с рецессивными (интактными) аллелями, может указывать на то, что они эволюционно моложе (Milec et al., 2023). Это позволяет построить их филогенетические взаимоотношения (см. рисунок).

Яровизация озимых и яровых пшениц и ее молекулярно-генетическая сеть

Яровизация – это потребность в воздействии низкими температурами, определяющими переход озимых растений от вегетативного развития к генеративному у видов, адаптированных к умеренному климату. Она является механизмом, обеспечивающим растениям успешную перезимовку вследствие задержки их в состоянии укороченных побегов до начала зимы и последующего развития растений при наступлении благоприятного весенне-летнего сезона. Считается, что озимые растения несут рецессивные (нативные) аллели генов *vrn*, мутации в любом из которых могут приводить к частичному или полному подавлению потребности в яровизации (Fu et al., 2005; Milec et al., 2023) и смене озимого типа развития на яровой. Яровые растения выколашиваются без яровизации, хотя позднее-

[2] См. шкалы роста и развития в работе Т.Т. Ефремовой и Е.В. Чумановой (2023).

Таблица 1. Локализация генов в хромосомах и возможные генотипы яровых и озимых форм (из: Гончаров, 2012, с изменениями)

Тип развития	Генотипы (гаплоидные) яровых и озимых сортов	Аллелизм и локализация генов в хромосомах	Литературный источник
	Для тетра- и гексаплоидных пшениц по гипотезе и данным K. Tsunewaki, B.S. Jenkins (1961) и K. Tsunewaki (1962)		
Яровой	*Sg1Sg2Sg3** *sg1sg2sg3* *Sg1sg2Sg3**	*Sg1–Sg1^c–sg1* (5D)	Tsunewaki, Jenkins, 1961; Tsunewaki, 1962
	*Sg1^{c}Sg2^{c}Sg3**	*Sg2–Sg2^c–sg2* (5A)	
	*Sg1^{c}Sg2Sg3** *Sg1^{c}Sg2Sg3**	*Sg3–sg3* (2B)	
	*sg1sg2sg3Sg5**	*Sg5–sg5* (5B)	Singh, 1967
Озимый	*sg1sg2Sg3*		Tsunewaki, 1962
	По гипотезе A.T. Pugsley (1972) и данным ряда авторов		
Яровой	*Vrn-A1vrn-B12vrn-D1*	*Vrn-A1–vrn-A1* (5AL)	Law et al., 1976
	vrn-A1Vrn-B12vrn-D1	*Vrn-B1–vrn-B1* (5BL)	Barrett et al., 2002
	vrn-A1vrn-B12Vrn-D1	*Vrn-D1–vrn-D1* (5DL)	Law et al., 1976
	vrn-A1vrn-B12vrn-D1Vrn-B3	*Vrn-B3* (7BS)**	Yan et al., 2006
	vrn-A1vrn-B12vrn-D1Vrn-A3	*Vrn-A3* (7AS)**	Nishimura et al., 2018
	vrn-A1vrn-B12vrn-D1Vrn-D4	*Vrn-D4* (5DS)**	Kippes et al., 2014
	и любые сочетания доминантных генов		
Озимый	*vrn-A1vrn-B1vrn-D1*		Pugsley, 1972
	Для диплоидных пшениц *T. boeoticum*, *T. monococcum* по гипотезе J. Dubcovsky et al. (1998) и данным ряда авторов		
Яровой	*Vrn-A1vrn-A2*	*Vrn-A1-vrn-A1* (5AL)	Dubcovsky et al., 1998
	vrn-A1vrn-A2	*Vrn-A2–vrn-A2* (4AL)	Yan et al., 2004b
Озимый	*vrn-A1Vrn-A2*		Dubcovsky et al., 1998

* Яровой тип развития наблюдается при любом аллельном состоянии гена *Sg3*.
** Не имеют рецессивных аллелей.

спелые яровые формы, в том числе и двуручки[3], могут отзываться на яровизацию ускорением своего развития и сокращением длины вегетационного периода. Феномен яровизации поздних яровых изучен слабо. Считается, что она предохраняет их при озимом посеве в южных широтах от повреждения ранними осенними заморозками.

Существенным препятствием для исследования перехода к генеративному развитию является некорректное определение функции аллелей генов *Vrn*. Это обусловлено путаницей в терминах, которую внесли австралийские ученые A.T. Pugsley (1968) и R.A. McIntosh (1973), неудачно заменившие ранее используемое название признака «яровость» (англ. *spring growth*) (Tsunewaki, 1962) на «реакция на яровизацию» (англ. *response to vernalization*) (Pugsley, 1971) (см. табл. 1). Для этой замены терминов были определенные причины (Pugsley, 1968), правда, они больше умозрительного характера. Однако и позже молекулярный биолог J. Dubcovsky также не смог сориентироваться в проблеме и закрепил эту терминологическую путаницу в последующих редакциях «Каталога генных символов пшеницы» (McIntosh et al., 2013). Полагаем, что обозначение генов *Sg* (spring growth) более адекватно (Goncharov, 2004) и позволяет формализовать признак «яровость *vs*. озимость». Его классификация основана на генотипе, а не на фенотипе растения (Steinfort et al., 2017).

Отметим, что данные по генотипированию и фенотипированию сортов могут не всегда совпадать (см. Makhoul, 2022, табл. 2). Это касается возделывания яровых форм в южных районах восточного полушария при посеве под зиму (Makhoul et al., 2022). К сожалению, работ, в которых фенотип «определятся» (постулируется) в зависимости от сроков (сезона) сева, становится все больше (Steinfort et al., 2017). A.T. Pugsley (1983) начинает рассмотрение вопроса о терминологии с «озимости», т. е. физиологического состояния растения пшеницы, требующего для колошения воздействия низкими температурами (яровизации), а следовательно, имеющего «реакцию на яровизацию».

[3] Двуручки – это агротехнологическая характеристика. Их можно выращивать как при озимом, так и при яровом посеве в виде страховой культуры. В настоящее время в Госреестр включены три сорта двуручек, созданных в Центре зерна им. П.П. Лукьяненко (г. Краснодар) (Государственный реестр…, 2023).

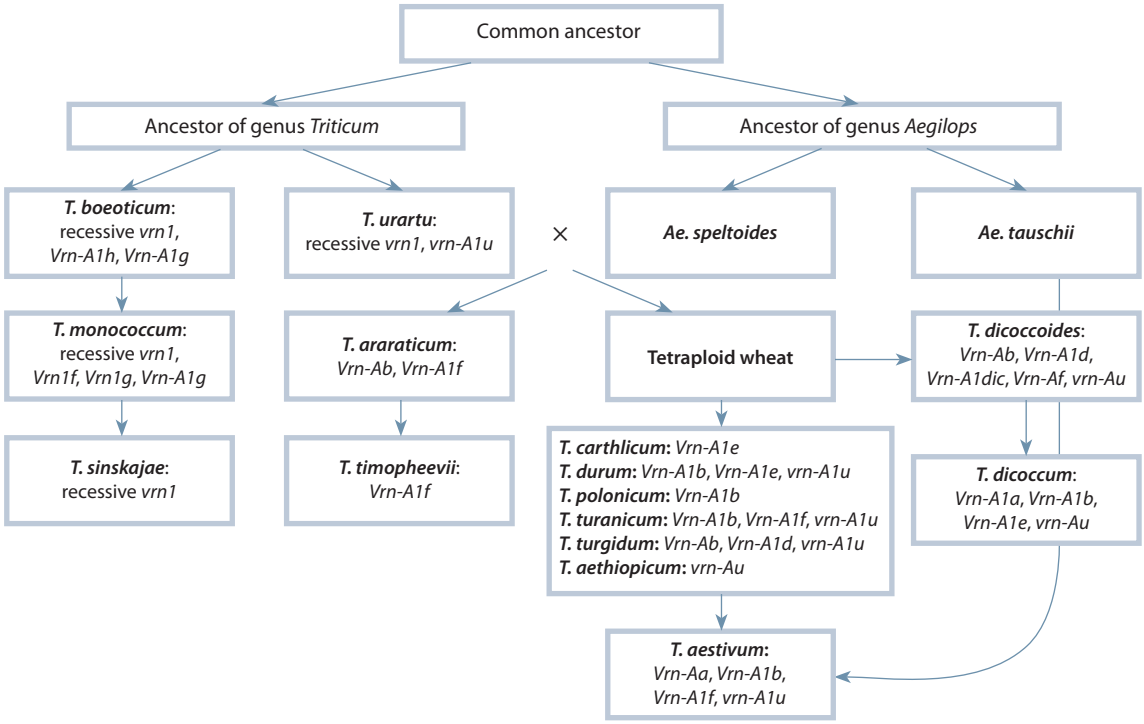


Схема эволюции родов *Triticum* и *Aegilops* (по: Goncharov, 2011, с дополнениями).

Аллели гена *Vrn-A1* у видов пшеницы представлены под названиями видов (из: Konopatskaia et al., 2016, с дополнениями).

Следующий вопрос – условие фенотипирования образцов пшеницы по признаку «тип развития (яровость *vs*. озимость)». Признак фенотипируется как качественный морфологический признак (Goncharov, 2004). Фенотипы (растения) различаются по наличию/отсутствию перехода к генеративному развитию в течение одного сезона. Сорта пшеницы по данному признаку фенотипируются летом, при высоких положительных температурах (провокационный фон), непосредственно в процессе вегетации, после высадки в поле или теплице.

Признак «реакция на яровизацию» – количественный, поэтому фенотипирование образцов необходимо проводить с использованием низких положительных температур (яровизации). Решающим в таком случае окажется вопрос о продолжительности яровизации (Долгушин, 1935). Яровым растениям (даже позднеспелым) яровизация для перехода к генеративному развитию не требуется. Выработка единого подхода для фенотипирования «яровой/озимость» даст возможность корректно сравнивать все имеющиеся результаты исследований.

В базе данных Wheat Trait Ontology признаки «яровизация (тип развития)» и «скороспелость» лежат в категории Trait подкатегории Development и связаны с фенотипом растений (Nédellec et al., 2020). Признак «реакция на яровизацию» в ней отсутствует и принадлежит другой категории – Response to environmental conditions, т. е. является реакцией растений на воздействие внешней среды (на стрессирующий фактор).

Важной частью единого подхода в определении и фенотипировании признака является не только терминология, но и символика генов пшениц. Переход контроля над символикой генов пшениц от одной группы исследователей (Ausemus et al., 1946) к другой (McIntosh et al., 1973) административно закрепил эту терминологическую путаницу. Поэтому, несмотря на аббревиатуру *Vrn* и наличие реакции на яровизацию у позднеспелых яровых сортов и сортов-двуручек, более адекватен термин «тип развития (яровость *vs*. озимость)». Термин же «реакция на яровизацию» оставим для озимых форм (Файт и др., 2018). Контролируют ли рецессивные гены *vrn* собственно реакцию на яровизацию у озимых сортов – вопрос до сих пор открытый. Рассмотрим его подробнее.

Полиморфизм рецессивных аллелей *vrn* у озимых пшениц

Все известные на сегодняшний день доминантные гены *Vrn*, контролирующие качественное отличие между яровыми и озимыми формами пшениц, клонированы. Предложены две взаимоисключающие гипотезы о том, что продолжительность яровизации у озимых форм может быть обусловлена изменчивостью рецессивных аллелей *vrn-A1*, определяющих озимый тип развития (Pugsley, 1971; Chen Y. et al., 2009, 2010), либо независимой от них системой генов (Gotoh, 1979; Булавка, 1984; Файт, 2003, 2006а, б; Stelmakh et al., 2005), не связанных с экспрессией рецессивных генов *vrn*.

Данный процесс очень плохо изучен генетически и совсем не изучен молекулярно-биологически. В настоящее время очевидно, что выявленные у озимых сортов пшеницы полиморфизмы по рецессивным генам *vrn* не могут объяснить количественные различия у них в продолжительности яровизации (табл. 2). Не сообщалось ни об одном исключении, которое сделало бы эту генетическую модель недействительной, когда многочисленные

Таблица 2. Полиморфизм рецессивных аллелей генов *Vrn* у пшениц

Локус/ген	Аллель	Мутация	Образец	Литературный источник
		Диплоидные пшеницы (2*n* = 2*x* = 14)		
Vrn-A1	*vrn-A1u*	Идентична аллелю *Vrn-A1u* полиплоидных пшениц	*T. urartu* Thum. ex Gandil. IG 44829	Golovnina et al., 2010
VRN-2 (*ZCCT1*)	*vrn2*	Точечная мутация в положении 35 в кодирующей области домена CCT	*T. monococcum* DV92	Yan et al., 2004a
	vrn2	Полная делеция *ZCCT1*	*T. monococcum*	
	vrn2	Данные не приводятся	*T. monococcum* TRI 17025	Shcherban et al., 2015b
		Тетраплоидные пшеницы (2*n* = 4*x* = 28)		
Vrn-A1	*vrn-A1b.3*	Делеция одного нуклеотида и делеция 20 п. н. ниже VRN-бокса	*T. turgidum* PI 223173, *T. durum* PI 655432	Muterko et al., 2016
	vrn-A1b.4	»	*T. dicoccoides* PI 466941	
		Гексаплоидные пшеницы (2*n* = 6*x* = 42)		
Vrn-A1	*vrn-1a/vrn-A1b*	C/T SNP в экзоне 4	Jagger (PI 593688) /2174 (PI 602595)	Chen Y. et al., 2009
	vrn-A1b.3	Делеция одного нуклеотида выше и делеция 20 п. н. ниже VRN-бокса	*T. spelta* L. PI 168680 *T. vavilovii* Jakubz. PI 428342	Muterko et al., 2016
Vrn-B1	*vrn-B1*	Делеция 1 п. н. в 5′ UTR + 8 п. н. в начале второй делеции	i: Triple Dirk C	Yan et al., 2004b
Vrn-D1	*vrn-D1*	Делеция 1 п. н. в 5′ UTR + 15 п. н. в начале второй делеции	i: Triple Dirk C	
Vrn-D1	*vrn-D1r*	SNP в CArG-бокса промотора *vrn-A1*		Strejčková et al., 2021; Makhoul et al., 2022
Vrn-B3		Нуль-аллель	cv. Yanzhan 4110	Chen F. et al., 2013

Примечание. Мутации в рецессивных аллелях гена *vrn-A1* у гексаплоидой пшеницы (Chen Y. et al., 2009) и гена *Vrn-2* у диплоидной пшеницы (Yan et al., 2004b) находятся в кодирующих областях.

сорта/зародышевая плазма из разных видов пшеницы, различающихся по уровню плоидности, подвергались скринингу с использованием молекулярных маркеров для рецессивных аллелей каждого из трех генов *Vrn-1* (Yan et al., 2003, 2004a, b; Fu et al., 2005; Bonnin et al., 2008; Zhang X.K. et al., 2008; Santra et al., 2009; Chen Y. et al., 2010). Исключение – полиморфизм по генам *Vrn-3B* и *Vrn-4D*, у которых рецессивный аллель представлен только нуль-аллелем.

Аллели, имеющие однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в экзоне 4 рецессивного гена *vrn-A1*, связаны с регуляцией развития озимых растений и обозначены *vrn-A1a* у сорта Jagger (PI 593688) и *vrn-A1b* у образца 2174 (PI 602595). При полевой оценке популяции из 96 RIL от скрещивания Jagger с 2174 Y. Chen с коллегами (2009) продемонстрировали, что генотип с аллелем *vrn-A1a* характеризовался более ранним выходом в трубку. В то же время влияние алелей на продолжительность яровизации экспериментально не проверялось.

Растения с гаплотипом 3_SNP показали более высокие уровни транскрипции гена *Vrn-A1*, чем растения с гаплотипом 1_SNP (Kippes et al., 2018). Сделано предположение, что однонуклеотидный полиморфизм в регуляторном сайте первого интрона, возможно, связан с различиями в продолжительности яровизации у озимой пшеницы. Отметим, что попытка N. Kippes с коллегами (2018) показать связь однонуклеотидных замен в рецессивном гене *vrn-A1* с продолжительностью яровизации неубедительна, так как использовалась озимая изогенная линия Triple Dirk C ярового сорта Triple Dirk, растения которой в поле за четыре месяца без яровизации выходили в трубку и часть из них колосилась (Гончаров, 2012).

Можно сделать вывод, что все выявленные на сегодняшний день изменения (точечные мутации) в последовательностях рецессивных генов *vrn* достоверно не влияют на продолжительность яровизации озимых образцов пшениц (см. табл. 2).

Отметим, что уже довольно давно созданы изогенные линии по генам *Vrd*, контролирующим полиморфизм в продолжительности яровизации у озимых сортов мягкой пшеницы (Файт, 2006б), которые могут быть использованы в молекулярно-биологических экспериментах. Эти гены локализованы на хромосомах у озимой мягкой пшеницы: ген *Vrd1* – в хромосоме 4A, ген *Vrd2* – в 5D (Файт и др., 2007).

Аллельная изменчивость в локусе VRN-2 и озимость. Мутации в регуляторных областях гена *Vrn-1* обусловливают доминирование яровости, равно как точечные мутации гена(-ов) в локусе VRN-2 (аллель *vrn-2a*) или делеция всего гена (аллель *vrn-2b*) связаны с яровостью как рецессивным признаком у диплоидной пшеницы *T. monococcum* и ячменя *H. vulgare* (Yan et al., 2004b; Dub-

covsky et al., 2005). Множественный аллелизм доминантного гена *Vrn-2*, контролирующего озимый тип развития, не выявлен. Это косвенно говорит об отсутствии связи данного гена с контролем продолжительности яровизации у диплоидных пшениц *T. monococcum* и *T. boeoticum.* Неизвестно также, какими генами она контролируется у ячменя.

Изменчивость доминантных аллелей генов *Vrn* у яровых образцов ди-, тетра- и гексаплоидных пшениц и их влияние на длину вегетационного периода яровых растений

Значительное число работ посвящено анализу распространения доминантных генов *Vrn* и их аллелей в основных регионах возделывания пшеницы (Каталог…, 1987; Goncharov, 1998; Fu et al., 2005; Zhang X.K. et al., 2008; Лысенко и др., 2014; Смоленская и др., 2022; и др.). Показана дифференциация регионов по аллелям (Генотипы…, 1985; Stelmakh, 1990; Goncharov, 1998). Среди современных сортов яровой мягкой пшеницы аллель *Vrn-A1a* преобладает в регионах с холодными зимами, где яровые пшеницы высевают только весной. Напротив, доминантные аллели генов-гомологов *Vrn-B1a* и *Vrn-D1a* присутствуют с высокой частотой у сортов, возделываемых в средиземноморском климате, где яровую пшеницу сеют осенью (под зиму) (Stelmakh, 1990; Zhang X.K. et al., 2008; Shcherban et al., 2015a). При этом аллель *Vrn-D1a* появился в Южной Европе в 1930-е гг. вместе с генами нечувствительности к фотопериоду и короткостебельностью от японских сортов мягкой пшеницы (Гончаров, 2012). Возможно ли широкое использование, кроме Китая, в селекции (Bonnin et al., 2008) доминантного гена *Vrn-B3* – вопрос открытый и требует детального изучения. В отечественном сортименте этот ген не обнаружен (Лысенко и др., 2014), так же как и у потомков сорта Hope (Гончаров, Гайдаленок, 2005), донора гена *Vrn-B3* для изогенной линии CS/Hope 7B.

Двуручки. В англоязычной литературе двуручки известны под названием “intermediate” (Flood, Halloran, 1986). Б.В. Ригин с коллегами считают возможной детерминацию ярового типа развития у сортов-двуручек доминантным геном *Vrn-A1* (Генотипы…, 1985), в то время как А.Ф. Стельмах (1981) приписывал сортам-двуручкам контроль ярового типа развития исключительно доминантным геном *Vrn-B1*. В Китае двуручки имеют доминантный аллель *Vrn-D1b* (Zhang X.K. et al., 2008).

Поскольку сорта-двуручки (в англоязычной литературе их иногда называют полуяровые – semispring) играют важную роль в производстве пшеницы в некоторых регионах (Файт и др., 2018), было изучено 689 образцов Китая для определения частоты и распределения у них *Vrn-D1b* аллеля. Результаты показали, что аллели *Vrn-D1a*, *Vrn-D1b* и *vrn-D1* присутствовали в 27.3, 20.6 и 52.1 % изученных образцов соответственно. Анализ родословных показывает, что аллель *Vrn-D1b* произошел от китайских местных сортов (Guo et al., 2015).

Исследование популяции гибридов F_2, расщепляющихся по аллелям *Vrn-D1b* и *Vrn-D1a* в теплице в условиях длинного дня без яровизации, показало, что растения, гомозиготные по аллелю *Vrn-D1b*, выколашивались на 32 дня позже, чем растения, гомозиготные по аллелю *Vrn-D1a*. Поскольку аллель *Vrn-D1b* имеет ту же делецию в интроне 1, что и *Vrn-D1a*, и, кроме того, одиночную нуклеотидную мутацию в промоторной области и связан с факультативным типом развития, авторы предположили, что мутация в промоторе может изменять базовый уровень активности аллеля *Vrn-D1*, который уже активен (из-за делеции в интроне 1) (Zhang J. et al., 2012).

Копийность генов *Vrn*. Изменение числа копий (CNV) генов *Vrn-1* является одним из источников генетической изменчивости у сортов гексаплоидной пшеницы (Díaz et al., 2012; Würschum et al., 2015). В большинстве случаев CNV связаны с изменениями экспрессии генов *Vrn* (Muterko, 2023), тем не менее данные об их влиянии на ДВП неочевидны.

Гексаплоидные (2*n* = 6*x* = 42) пшеницы

Наиболее важным с хозяйственной точки зрения аспектом исследования аллелизма доминантных генов *Vrn* является поиск их функциональной связи с длиной вегетационного периода яровых растений. Сведения о продолжительности ДВП (скороспелости) у яровой пшеницы достаточно разнообразны. По мнению К.А. Фляксбергера (1938), у мягкой пшеницы она варьирует от 76 до 140 и более дней. Другие авторы приводят пределы варьирования от 70–80 до 120–130 дней (Кумаков, 1980). Нет единого мнения и по вопросу классификации коммерческих сортов мягкой пшеницы по группам спелости (Гончаров Н.П., Гончаров П.Л., 2018), которая имеет четко выраженную региональную компоненту. При этом скороспелость может быть связана с различным сочетанием доминантных аллелей генов *Vrn* (см. Приложение).

Аллели локуса VRN-A1. Распределение яровых сортов мягкой пшеницы по группам спелости выявило влияние на нее сочетания определенных доминантных генов *Vrn* и их аллелей (Stelmakh, 1993; Лихенко и др., 2014; Смоленская и др., 2022). Яровые сорта с доминантным геном *Vrn-A1* обычно более скороспелые, чем сорта с доминантными генами *Vrn-B1* и *Vrn-D1* (Stelmakh, 1993). Показано, что основной вклад в сокращение периода «всходы–колошение» определяется доминантным аллелем *Vrn-A1a*, а аллель *Vrn-A1b*, напротив, обусловливает более позднее колошение растений (Ефремова и др., 2016). При этом сорта, в генотипе которых имеется доминантный аллель *Vrn-A1b*, встречаются Сибири с пониженной частотой, 8 % (Смоленская и др., 2022). Отметим, что аллель *Vrn-A1a* несет инсерцию в промоторной области, а *Vrn-A1b* – делецию (Yan et al., 2004b).

В исследовании Б.В. Ригина с коллегами (2021) ультраскороспелые линии Рико (к-65588) и Римакс (к-67257) имели самую высокую скорость развития от всходов до колошения среди образцов яровой мягкой пшеницы из всей коллекции ВИР. В их генотипах определено наличие доминантных аллелей сразу трех генов *Vrn*: *Vrn-A1*, *Vrn-B1* (*Vrn-B1a* и *Vrn-B1c* соответственно), *Vrn-D1*.

Наличие любого из доминантных аллелей, *Vrn-A1a* или *Vrn-A1b*, приводит к отсутствию отзывчивости на яровизацию, тогда как наличие любого из доминантных аллелей генов *Vrn-B1* или *Vrn-D1* обусловливает «остаточную» реакцию и приводит к более позднему цветению растений (Stelmakh, 1993). Эти данные подтверждаются исследо-

ваниями, в которых показано, что доминантные аллели *Vrn-A1a* и *Vrn-A1b* в сочетании с доминантным геном *Vrn-B1* могут обеспечить оптимальное время цветения и потенциальную высокую урожайность также и в условиях Тихоокеанского Северо-Западного региона США (Santra et al., 2009), в то время как сорта яровой пшеницы, несущие доминантный ген *Vrn-D1*, могут иметь преимущество в условиях штатов Айдахо и Орегона, где вегетационный период более продолжительный (Santra et al., 2009).

Аллели локуса VRN-B1. С использованием изогенных линий с разными аллелями гена *Vrn-B1*, был выявлен новый аллель, *Vrn-B1c*, который, вероятно, связан с детерминацией более раннего колошения у позднеспелых сортов (Shcherban et al., 2012a). Показано его преобладание у сортов яровой мягкой пшеницы Западной Сибири и Северного Казахстана с моногенным контролем ярового типа развития (Shcherban et al., 2012b). В отсутствие эпистатических эффектов доминантного гена *Vrn-A1* этот аллель вызывает более раннее колошение по сравнению с аллелем *Vrn-B1a* (Shcherban et al., 2013). Влияние на время колошения аллеля *Vrn-B1f* аналогично таковому аллеля *Vrn-B1c*, но механизм его регуляции, скорее всего, отличается (Strejčková et al., 2021).

Аллели локуса VRN-D1. Доминантный ген *Vrn-D1* встречается только в сортименте гексаплоидных пшениц азиатского региона и у ряда итальянских сортов (Stelmakh, 1993; Goncharov, 1998). K. Iwaki с коллегами (2000, 2001) обнаружили доминантный аллель *Vrn-D4* у многих сортов яровой мягкой пшеницы из различных регионов мира (55 из 272 изученных сортов). Наиболее высокая частота его встречаемости была у образцов из Индии и соседних с ней стран (Iwaki et al., 2000, 2001). Ранее этот доминантный ген был обнаружен у большинства образцов индийского гексаплоидного вида-эндемика *T. sphaerococcum* Perciv. (Гончаров, Шитова, 1999).

При анализе яровых образцов *Ae. tauschii*, собранных на Ближнем Востоке, выявлен доминантный аллель *Vrn-D^{t}1* с делецией 5.4 т. п. н. в первом интроне (Takumi et al., 2011). Позже был описан еще один доминантный аллель (Chepurnov et al., 2023). Наличие данного аллеля не влияло на время колошения.

Все идентифицированные вариации в трех гомеологах *Vrn-1* пшеницы были обозначены как отдельные аллели, но не для всех из них было экспериментально подтверждено влияние на ДВП (скороспелость) (см. Приложение).

Аллели локуса VRN-B3. Нуклеотидные замены или инсерции/делеции в копиях в геномах A и D гена *FT* (*Vrn-B3*) у 239 местных, стародавних и современных коммерческих сортов различного географического происхождения пшеницы можно связать с различиями по ДВП (Bonnin et al., 2008). Но, в отличие от *Vrn-1*, эпистатического взаимодействия между гомеологическими копиями *FT* не обнаружено (Bonnin et al., 2008). Сверхэкспрессия гена *TaFT* в трансгенных растениях *T. aestivum* значительно ускоряла их цветение по сравнению с нетрансгенным контролем (Yan et al., 2006).

Отсутствие изогенных линий не позволяет сравнить его различные аллели по силе фенотипического проявления. Заметим, что в старших беккроссах линия 620 с *Vrn-B3* колосилась значительно позже (Гончаров, 2012). Более позднее колошение также отмечено у сортов, несущих различные аллели *Vrn-B3*, *Vrn-B3a* и *Vrn-B3b* (Chen F. et al., 2013), *Vrn-B3d* и *Vrn-B3e* (Berezhnaya et al., 2021).

С использованием молекулярных маркеров для генов *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1* и *Vrn-B3* охарактеризовано 278 китайских сортов яровой мягкой пшеницы. Самыми ранними были сорта, имеющие в генотипе от трех до четырех доминантных генов *Vrn*, включая редкий доминантный ген *Vrn-B3* (в среднем 30–31 день до колошения), за которым следовали одно-, двух- или трехгенные комбинации, включая доминантный ген *Vrn-A1*, но не *Vrn-B3* (в среднем 38 дней до колошения). На основании этих данных доминантные гены *Vrn-1* были ранжированы по их влиянию на сокращение ДВП у китайских сортов: *Vrn-A1* > *Vrn-B1* > *Vrn-D1* (Zhang X.K. et al., 2008). Она отличается от ранжировок других исследователей (Gotoh, 1979; Goncharov, 2003).

Аллели локуса VRN-D4. Доминантный ген *Vrn-D4* оказывает более слабое влияние на ДВП, чем гены *Vrn-A1*, *Vrn-D1* или *Vrn-B3* (Kippes et al., 2014), но более сильное, чем *Vrn-B1* (Gotoh, 1979; Goncharov, 1998).

Тетраплоидные (2*n* = 4*x* = 28) пшеницы

В соответствии с результатами анализа экспрессии гена *Vrn-A3* с использованием сестринских линий показано, что признак «раннее цветение» у образца TN26 полбы *T. dicoccum* Schrank ex Schuebl. при сравнении с образцом TN28 *T. pyramidale* Perciv. обусловлен вставкой в промоторной области гена 7 п. н., которая включала последовательность цис-элемента GATA-бокса (Nishimura et al., 2018). Анализ показал наличие раннецветущих аллелей *Vrn-A3* у полбы из Эфиопии и Индии, их отсутствие у образцов твердой (*T. durum* Desf.) и мягкой пшениц. Результаты позволили авторам сделать заключение, что аллели *Vrn-A3a-h1* и *Vrn-A3a-h2* могут быть полезны для селекции на скороспелость твердой и мягкой пшениц (Nishimura et al., 2021).

Растения *T. carthlicum* Nevski и *T. dicoccum* с аллелем *Vrn-B1c*, содержащим встроенный в ген ретротранспозон, цвели без яровизации. У озимых DH-линий, несущих рецессивный аллель *vrn-B1*, транскрипты обнаруживались только после яровизации растений (Chu et al., 2011).

Два яровых образца, PI 208912 (Ирак) *T. turgidum* и PI 74830 (Китай) *T. durum*, и один озимый образец, PI 221422 (Сербия) *T. turgidum*, зацветали без яровизации. Однако цветение было значительно позже, чем у образцов с доминантными генами *Vrn-A1* или *Vrn-B1*. При этом озимый образец PI 221422 зацвел на 25 дней позже яровых (PI 208912, PI 74830). Все они имеют рецессивные аллели *vrn-B1* и нуль-аллели *vrn-B3*. Предполагается, что их позднее цветение обусловлено аллелем *Vrn-A1i* (Muterko et al., 2016).

Сочетание доминантных аллелей *Vrn-A1* и *Vrn-B1s* было связано с ранним цветением образцов тетраплоидных видов *T. dicoccum* и *T. dicoccoides* (Körn. ex Asch. et Graebn.) Schweinf. (Muterko et al., 2016). Возможен аллелизм по доминантному гену *Vrn-A1* (Ригин и др., 1994).

Аллельный вариант гена, происходящий от вида *T. militinae* Zhir. et Migusch., был обозначен как *Vrn-A1f*-подобный. Анализ QTL показал, что у сортов Tähti и

Mooni он вызывал задержку цветения на 1.9–18.6 дня в зависимости от условий выращивания (Ivaničová et al., 2016).

У всех исследованных образцов *T. timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. яровость была ассоциирована с доминантными аллелями *Vrn-A1f-ins* и *Vrn-A1f-del/ins* (Golovnina et al., 2010; Shcherban et al., 2016). У образца дикого вида *T. araraticum* Jakubz. выявлен тот же аллель (Golovnina et al., 2010). При этом число яровых форм у последнего вида крайне ограниченно (Goncharov, 1998).

Диплоидные (2*n* = 2*x* = 14) пшеницы

Возможно, у диплоидных пшениц картина наследования выглядит сложнее, чем предполагали ранее, так как недавно для дикого вида *T. boeoticum* показан дигенный контроль признака «яровость» (Fu Hao, Boguslavskyi, 2023). Для возделываемого вида *T. monococcum* подобные результаты L. Smith (1939) остались незамеченными. В геноме яровых образцов *T. urartu*, донора генома A^u полиплоидных видов пшениц, обнаружена типичная для видов секции *Triticum* мутация гена *Vrn-A1* (Головнина и др., 2009). Однако из 400 изученных образцов только четыре образца *T. urartu* были яровыми (Goncharov, 1998), два из них были «нетипичными» (имеющими фенотип *T. urartu* – бархатистое опушение листьев, но кариотип *T. boeoticum*) (Adonina et al., 2015), поэтому полиморфизм по гену *Vrn-A1* мог возникнуть, вероятнее всего, только уже у полиплоидных пшениц.

В полевых опытах образцы *T. monococcum* с различными делециями в области промотора (аллели *Vrn-A1f* и *Vrn-A1g*) выколашивались в среднем за 59–60 дней и достоверно не отличались друг от друга по срокам колошения ($p = 0.842$) (Чепурнов, Блинов, 2022).

Расширение полиморфизма генов *Vrn* и перспективы селекции на изменение ДВП (скороспелость)

Полиморфизм по доминантным генам *Vrn*, контролирующим яровость у селекционных сортов Сибири и РФ, минимален (Лысенко и др., 2014; Смоленская и др., 2022). У 75 % сортов Сибири он контролируется дигенно доминантными *Vrn-A1* и *Vrn-B1*; у 25 % – моногенно доминантными генами (у 24 сортов, из них у 19 и 5 соответственно – только одним доминантным геном – *Vrn-A1* или *Vrn-B1*). У одного сорта, Тулун 15, описан тригенный контроль (Лихенко и др., 2014). Подтвержден вывод Е.А. Моисеевой и Н.П. Гончарова (2007) об оптимальности для агроклиматических условий как Западной, так и Восточной Сибири контроля яровости двумя доминантными генами *Vrn*. Выявлена повышенная частота встречаемости аллеля *Vrn-B1c* у сортов Западной Сибири и аллеля *Vrn-B1a* у сортов Восточной Сибири, что позволяет говорить об их селективности (Смоленская и др., 2022). Другие регионы РФ так подробно не изучены (Лысенко и др., 2014).

Полагаем, что для увеличения разнообразия (полиморфизма) по ДВП в сортимент яровой мягкой пшеницы Сибири и РФ в целом целесообразно интрогрессировать доминантные аллели генов *Vrn* от ее диких сородичей (Гончаров, Чикида, 1995; Goncharov, 1998) либо использовать редкие аллели уже имеющихся в ее генпуле (Stelmakh, Avsenin, 1996; Koval, Goncharov, 1998), но до настоящего времени молекулярно-генетически неизученных и крайне редко используемых в селекции. Отметим, что донор генома A^u *T. urartu* Thum. ex Gandil. не несет каких-либо новых для яровой мягкой пшеницы мутаций (Golovnina et al., 2010). Вероятно, неперспективно и использование диплоидного вида с геномом A^b *T. monococcum* (Гончаров и др., 2007; Nishiura et al., 2018) в силу его эволюционной отдаленности от возделываемых видов пшениц. Поэтому вид *T. monococcum* как модель неудачен, так как он – тупиковая ветвь современного растениеводства.

Цель будущих исследований – разработать простую модель прогнозирования фенологии пшеницы, учитывающую эффекты яровизации и фотопериода. Новые факты об экспрессии генов *Vrn*, их аллельном составе, взаимодействии с другими генами постепенно расширяют представление о первоначально выявленных связях (Distelfeld et al., 2009; Jin, Wei, 2016; Krasileva et al., 2017; Киселева, Салина, 2018; Milec et al., 2023). Они будут способствовать повышению эффективности селекции будущего.

Список литературы / References

Булавка Н.В. Наследование различной потребности в яровизации при скрещивании озимых сортов мягкой пшеницы. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 1984;85:37-42
[Bulavka N.V. Inheritance of different requirements for vernalization in crossing winter varieties of bread wheat. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding.* 1984;85:37-42 (in Russian)]

Генотипы образцов яровой мягкой пшеницы по генам, контролирующим тип развития. Каталог мировой коллекции ВИР. Вып. 427. Л.: ВНИИР, 1985
[Genotypes of Accessions of Spring Soft Wheat by Genes Controlling the Habit of Development. Catalog of the World Collection of VIR. Issue 427. Leningrad: VNIIR, 1985 (in Russian)]

Головнина К.А., Кондратенко Е.Я., Блинов А.Г., Гончаров Н.П. Филогения А геномов диких и возделываемых видов пшениц. *Генетика.* 2009;45(11):1540-1547
[Golovnina K.A., Kondratenko E.Ya., Blinov A.G., Goncharov N.P. Phylogeny of the A genome of wild and cultivated wheat species. *Russ. J. Genet.* 2009;45(11):1360-1367. DOI 10.1134/S1022795409110106]

Гончаров Н.П. Сравнительная генетика пшениц и их сородичей. 2-е изд. испр. и доп. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2012
[Goncharov N.P. Comparative Genetics of Wheats and their Related Species. 2nd edn. Novosibirsk: Acad. Publ. House “Geo”, 2012 (in Russian)]

Гончаров Н.П., Гайдаленок Р.Ф. Локализация генов, контролирующих округлозерность и компактную форму колоса у *Triticum antiquorum* Heer ex Udacz. *Генетика*. 2005;41(11):1531-1537
[Goncharov N.P., Gaidalenok R.F. Localization of genes controlling spherical grain and compact ear in *Triticum antiquorum* Heer ex Udacz. *Russ. J. Genet*. 2005;41(11):1262-1267. DOI 10.1007/s11177-005-0227-1]

Гончаров Н.П., Гончаров П.Л. Методические основы селекции растений. Изд. 3-е, испр. и доп. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2018
[Goncharov N.P., Goncharov P.L. Methodical Bases of Plant Breeding. 3rd edn. Novosibirsk: Acad. Publ. House “Geo”, 2018 (in Russian)]

Гончаров Н.П., Чикида Н.Н. Генетика типа развития у *Aegilops squarrosa* L. *Генетика*. 1995;31(3):396-399
[Goncharov N.P., Chikida N.N. Genetics of the growth habit in *Aegilops squarrosa* L. *Genetika (Moscow)*. 1995;31(3):343-346]

Гончаров Н.П., Шитова И.П. Наследование типа развития у стародавних и местных сортов гексаплоидных пшениц. *Генетика.* 1999;35(4):467-473
[Goncharov N.P., Shitova I.P. The inheritance of growth habit in old local varieties and landraces of hexaploid wheat. *Russ. J. Genet.* 1999;35(4):386-392]

Гончаров Н.П., Кондратенко Е.Я., Банникова С.В., Коновалов А.А., Головнина К.А. Сравнительно-генетический анализ голозерной диплоидной пшеницы *Triticum sinskajae* и ее исходной формы *T. monococcum*. *Генетика.* 2007;43(11):1491-1500
[Goncharov N.P., Kondratenko E.Ja., Bannikova S.V., Konovalov A.A., Golovnina K.A. Comparative genetic analysis of diploid naked wheat *Triticum sinskajae* and the progenitor *T. monococcum* accession. *Russ. J. Genet.* 2007;43(11):1248-1256. DOI 10.1134/S1022795407110075]

Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т. 1. Сорта растений. М.: Росинформагротех, 2023
[State Register of Selection Achievements Authorized for Use for Production Purposes. Vol. 1. Plant Varieties (official publication). Moscow: Rosinformagrotekh Publ., 2023 (in Russian)]

Гупало П.И., Скрипчинский В.В. Физиология индивидуального развития растений. М.: Колос, 1971
[Gupalo P.I., Skripchinskiy V.V. Physiology of the Individual Development of Plants. Moscow: Kolos Publ., 1971 (in Russian)]

Долгушин Д.А. Мировая коллекция пшениц на фоне яровизации. М.: Сельхозгиз, 1935
[Dolgushin D.A. World Collection of Wheats against the Background of Vernalization. Moscow: Selkhozgiz Publ., 1935 (in Russian)]

Ефремова Т.Т., Чуманова Е.В. Стадии роста и развития пшеницы и их значение в формировании элементов продуктивности. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;9(2):54-80. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-09
[Efremova T.T., Chumanova E.V. Stages of growth and development of wheat and their importance in the formation of productivity elements. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2023;9(2):54-80. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-09 (in Russian)]

Ефремова Т.Т., Чуманова Е.В., Трубачеева Н.В., Арбузова В.С., Белан И.А., Першина Л.А. Распространенность аллелей локуса *VRN1* среди сортов яровой мягкой пшеницы, возделываемых в Западной Сибири. *Генетика*. 2016;52(2):170-178
[Efremova T.T., Chumanova E.V., Trubacheeva N.V., Arbuzova V.S., Pershina L.A., Belan I.A. Prevalence of *VRN1* locus alleles among spring common wheat cultivars cultivated in Western Siberia. *Russ. J. Genet*. 2016;52(2):146-153. DOI 10.1134/S102279541601004X

Каталог сортов яровой мягкой пшеницы по генотипам системы локусов *Vrn* (чувствительность к яровизации). Одесса: ВСГИ, 1987
[Catalogue of Varieties of Spring Soft Wheat by Genotypes of the *Vrn* Loci System (Sensitivity to Vernalization). Odessa: Plant Breeding and Genetics Institute, 1987 (in Russian)]

Киселёва А.А., Салина Е.А. Генетические механизмы формирования времени колошения мягкой пшеницы. *Генетика*. 2018; 54(4):381-396. DOI 10.7868/S001667581804001X
[Kiseleva A.A., Salina E.A. Genetic regulation of common wheat heading time. *Russ. J. Genet.* 2018;54(4):375-388. DOI 10.1134/S1022795418030067]

Кумаков В.А. Принципы разработки оптимальных моделей (идиотипов) сортов растений. *С.-х. биология*. 1980;15(2):190-197
[Kumakov V.A. Principles of constructing optimum models (idiotypes) of plant varieties. *Sel'skokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology.* 1980;15(2):190-197 (in Russian)]

Лихенко И.Е., Стасюк А.И., Щербань А.Б., Зырянова А.Ф., Лихенко Н.И., Салина Е.А. Изучение аллельного состава генов *Vrn-1* и *Ppd-1* у раннеспелых и среднеранних сортов яровой мягкой пшеницы Сибири. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014;18(4/1):691-703
[Likhenko I.E., Stasyuk A.I., Shcherban' A.B., Zyryanova A.F., Likhenko N.I., Salina E.A. Analysis of the allelic variation of the *Vrn-1* and *Ppd-1* genes in Siberian early and medium early varieties of spring wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2014;18(4/1):691-703 (in Russian)]

Лысенко Н.С., Киселева А.А., Митрофанова О.П., Потокина Е.К. Каталог мировой коллекции ВИР. Вып. 815. Мягкая пшеница. Молекулярное тестирование аллелей *Vrn*- и *Ppd*-генов у допущенных к использованию в Российской Федерации селекционных сортов. СПб., 2014
[Lysenko N.S., Kiseleva A.A., Mitrofanova O.P., Potokina E.K. Catalog of the world collection of VIR. Iss. 815. Common wheat. Molecular Testing of *Vrn*- and *Ppd* Gene Alleles in Breeding Varieties Authorized for Use in the Russian Federation. St. Petersburg, 2014 (in Russian)]

Моисеева Е.А., Гончаров Н.П. Генетический контроль ярового типа развития у стародавних и местных сортов мягкой пшеницы Сибири. *Генетика*. 2007;43(4):469-476
[Moiseeva E.A., Goncharov N.P. Genetic control of the spring habit in old local cultivars and landraces of common wheat from Siberia. *Russ. J. Genet*. 2007;43(4):369-375. DOI 10.1134/S1022795407040035]

Ригин Б.В., Летифова М.С., Репина Т.С. Сравнительная генетика скорости развития растений видов рода *Triticum* L. *Генетика*. 1994;30(10):1326-1333
[Rigin B.V., Letifova M.S., Repina T.S. Comparative genetics of maturation rate of plant species of genus *Triticum* L. *Genetika* (*Moscow*). 1994;30(10):1148-1154]

Ригин Б.В., Зуев Е.В., Андреева А.С., Матвиенко И.И., Пыженкова З.С. Сравнительный анализ наследования высокой скорости развития линий Римакс и Рико яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции.* 2021;182(2):81-88. DOI 10.30901/2227-8834-2021-2-81-88
[Rigin B.V., Zuev E.V., Andreeva A.S., Matvienko I.I., Pyzhenkova Z.S. Comparative analysis of the inheritance of a high development rate in the Rimax and Rico lines of spring bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding.* 2021;182(2):81-88. DOI 10.30901/2227-8834-2021-2-81-88 (in Russian)]

Смоленская С.Э., Ефимов В.М., Кручинина Ю.В., Немцев Б.Ф., Чепурнов Г.Ю., Овчинникова Е.С., Белан И.А., Зуев Е.В., Чжоу Чэньси, Пискарев В.В., Гончаров Н.П. Скороспелость и морфотип сортов мягкой пшеницы Западной и Восточной Сибири. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(7):662-674. DOI 10.18699/VJGB-22-81
[Smolenskaya S.E., Efimov V.M., Kruchinina Yu.V., Nemtsev B.F., Chepurnov G.Yu., Ovchinnikova E.S., Belan I.A., Zuev E.V., Zhou Chenxi, Piskarev V.V., Goncharov N.P. Earliness and morphotypes of common wheat cultivars of Western and Eastern Siberia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(7):662-674. DOI 10.18699/VJGB-22-81 (in Russian)]

Стельмах А.Ф. Генетика типа развития и продолжительность вегетационного периода мягких пшениц. *Селекция и семеноводство (Киев).* 1981;48:8-15
[Stelmakh A.F. Genetics of the habit of development and duration of the growing season of bread wheats. *Selektsiya i Semenovodstvo (Kyiv) = Breeding and Seed Production (Kyiv).*1981;48:8-15 (in Russian)]

Стельмах А.Ф. Генетические эффекты локусов *Vrn1-3* и специфическое действие доминантного аллеля *Vrn3* у мягкой пшеницы. *Цитология и генетика*. 1987;21(4):278-286

[Stelmakh A.F. Genetic effects of the *Vrn1-3* loci and the specific effect of the dominant *Vrn3* allele on bread wheat. *Tsitologiya i Genetika = Cytology and Genetics.* 1987;21(4):278-286 (in Russian)]

Файт В.И. Генетическая система контроля различий по продолжительности яровизации у озимой пшеницы. *Цитология и генетика.* 2003;37(5):69-76

[Fayt V.I. Genetic system for the control of differences in vernalization duration in winter wheat. *Tsitologiya i Genetika = Cytology and Genetics.* 2003;37(5):69-76 (in Russian)]

Файт В.И. Генетический контроль продолжительности яровизации сортов озимой пшеницы. *Экол. генетика*. 2006а;4(2):29-36

[Fayt V.I. Genetic control of vernalization requirement duration of winter wheat cultivars. *Ekologicheskaya Genetika = Ecological Genetics.* 2006a;4(2):29-36 (in Russian)]

Файт В.И. Изогенные линии озимой пшеницы по генам контроля продолжительности яровизации. *Информ. вестн. ВОГиС*. 2006б;10(3):580-587

[Fayt V.I. Near-isogenic lines on the genes controlling differences in duration of vernalization in winter common wheat. *Informatsionnyy Vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists.* 2006b;10(3):580-587 (in Russian)]

Файт В.И., Симоненко Л.К., Мокану Н.В., Попова Н.В. Хромосомная локализация генов контроля продолжительности яровизации (*Vrd*) озимой мягкой пшеницы. *Генетика.* 2007;43(2): 202-208

[Fayt V.I., Symonenko L.K., Mokanu N.V., Popova N.V. Chromosomal location of genes for vernalization requirement duration (*Vrd*) in winter bread wheat. *Russ. J. Genet.* 2007;43(2):143-148. DOI 10.1134/S1022795407020081]

Файт В.И., Губич Е.Ю., Зеленина Г.А. Различия сортов двуручек мягкой пшеницы по генам *Vrn-1* типа развития. *Plant Varieties Studying and Protection.* 2018;14(2):160-169. DOI 10.21498/2518-1017.14.2.2018.134762

[Fayt V.I., Gubich O.Yu., Zelenina G.A. Differences in the alternate varieties of soft wheat for *Vrn-1* genes of development type. *Plant Varieties Studying and Protection*. 2018;14(2):160-169. DOI 10.21498/2518-1017.14.2.2018.134762 (in Russian)]

Фляксбергер К.А. Пшеницы. М.; Л.: Сельхозгиз, 1938

[Flaksberger K.A. Wheat. Moscow; Leningrad: Selkhozgiz Publ., 1938 (in Russian)]

Чепурнов Г.Ю., Блинов А.Г. Влияние различных аллелей гена *Vrn-A1* на сроки колошения *T. monococcum*. В: Генофонд и селекция растений. Сб. матер. 6-й Междунар. конф. (Новосибирск, 23–25 ноября 2022 г.). Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2022;206-209

[Chepurnov G.Yu., Blinov A.G. Effect of different alleles of the *Vrn-A1* gene on the timing of heading in *T. monococcum*. In: Proceedings the 6th International Conference "Gene Pool and Plant Breeding" (GPB2022), Novosibirsk, November 23–25, 2022. Novosibirsk: Institute of Cytology and Genetics, 2022;206-209 (in Russian)]

Adonina I.G., Goncharov N.P., Badaeva E.D., Sergeeva E.M., Petrash N.V., Salina E.A. (GAA)n microsatellite as an indicator of the A genome reorganization during wheat evolution and domestication. *Comp. Cytogenet.* 2015;9(4):533-547. DOI 10.3897/CompCytogen.v9i4.5120

Ausemus E.R., Herrington J.B., Reitz L.P., Worzella W.W. A summary of genetic studies in hexaploid and tetraploid wheats. *J. Am. Soc. Agron.* 1946;38:1082-1099

Barrett B., Bayram M., Kidwell K., Weber W.E. Identifying AFLP and microsatellite markers for vernalization response gene *Vrn-B1* in hexaploid wheat using reciprocal mapping populations. *Plant Breed*. 2002;121(5):400-406. DOI 10.1046/j.1439-0523.2002.732319.x

Berezhnaya A., Kiseleva A., Leonova I., Salina E. Allelic variation analysis at the vernalization response and photoperiod genes in Russian wheat varieties identified two novel alleles of *Vrn-B3*. *Biomolecules.* 2021;11(12):1897. DOI 10.3390/biom11121897

Bonnin I., Rousset M., Madur D., Sourdille P., Dupuits C., Brunel D., Goldringer I. FT genome A and D polymorphisms are associated with the variation of earliness components in hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet*. 2008;116(3):383-394. DOI 10.1007/s00122-007-0676-0

Chen A., Li C., Hu W., Lau M.Y., Lin H., Rockwell N., Martin S.S., Jernstedt J., Lagarias K., Dubcovsky J. Phytochrome C plays a major role in the acceleration of wheat flowering under long-day photoperiod. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014;111(28):10037-10044. DOI 10.1073/pnas.1409795111

Chen F., Gao M., Zhang J., Zuo A., Shang X., Cui D. Molecular characterization of vernalization and response genes in bread wheat from the Yellow and Huai Valley of China. *BMC Plant Biol.* 2013;13(1): 199. DOI 10.1186/1471-2229-13-199

Chen Y., Carver B.F., Wang S., Zhang F., Yan L. Genetic loci associated with stem elongation and winter dormancy release in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2009;118(5):881-889. DOI 10.1007/s00122-008-0946-5

Chen Y., Carver B.F., Wang S., Cao S., Yan L. Genetic regulation of developmental phases in winter wheat. *Mol. Breed.* 2010;26(4):573-582. DOI 10.1007/s11032-010-9392-6

Chen Z., Cheng X., Chai L., Wang Z., Du D., Wang Z., Bian R., Zhao A., Xin M., Guo W., Hu Z., Peng H., Yao Y., Sun Q., Ni Z. Pleiotropic QTL influencing spikelet number and heading date in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2020;133(6):1825-1838. DOI 10.1007/s00122-020-03556-6

Chepurnov G.Y., Ovchinnikova E.S., Blinov A., Chikida N.N., Belousova M.Kh., Goncharov N.P. Analysis of structural organization and expression of *Vrn-D1* genes that control the growth habit (spring *vs*. winter) in *Aegilops tauschii* Coss. *Plants*. 2023;12(20):3596. DOI 10.3390/plants12203596

Chu C.-G., Tan C.T., Yu G.-T., Zhong S., Xu S.S., Yan L. A novel retrotransposon inserted in the dominant *Vrn-B1* allele confers spring growth habit in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.). *G3*. 2011; 1(7):637-645. DOI 10.1534/g3.111.001131

Cockram J., Jones H., Leigh F.J., O'Sullivan D., Powell W., Laurie D.A., Greenland A.J. Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication, and sustainable productivity. *J. Exp. Bot*. 2007;58(6):1231-1244. DOI 10.1093/jxb/erm042

Dhillon T., Pearce S.P., Stockinger E.J., Distelfeld A., Li C., Knox A.K., Vashegyi I., Vagujfalvi A., Galiba G., Dubcovsky J. Regulation of freezing tolerance and flowering in temperate cereals: the *VRN-1* connection. *Plant Physiol*. 2010;153(4):1846-1858. DOI 10.1104/pp.110.159079

Díaz A., Zikhali M., Turner A.S., Isaac P., Laurie D.A. Copy number variation affecting the *Photoperiod-B1* and *Vernalization-A1* genes is associated with altered flowering time in wheat (*Triticum aestivum*). *PloS One*. 2012;7(3):e33234. DOI 10.1371/journal.pone.0033234

Distelfeld A., Tranquilli G., Li C., Yan L., Dubcovsky J. Genetic and molecular characterization of the *VRN2* loci in tetraploid wheat. *Plant Physiol.* 2009;149(1):245-257. DOI 10.1104/pp.108.129353

Dubcovsky J., Lijavetzky D., Appendino L., Tranquilli G. Comparative RFLP mapping of *Triticum monococcum* genes controlling vernalization requirement. *Theor. Appl. Genet*. 1998;97(5):968-975. DOI 10.1007/s001220050978

Dubcovsky J., Chen C., Yan L. Molecular characterization of the allelic variation at the *VRN-H2* vernalization locus in barley. *Mol. Breed.* 2005;15(4):395-407. DOI 10.1007/s11032-005-0084-6

Dubcovsky J., Loukoianov A., Fu D., Valarik M., Sanchez A., Yan L. Effect of photoperiod on the regulation of wheat vernalization genes *VRN1* and *VRN2*. *Plant Mol. Biol*. 2006;60(4):469-480. DOI 10.1007/s11103-005-4814-2

Faure S., Higgins J., Turner A., Laurie D.A. The *FLOWERING LOCUS T*-like gene family in barley (*Hordeum vulgare*). *Genetics*. 2007; 176(1):599-609. DOI 10.1534/genetics.106.069500

Ferrándiz C., Gu Q., Martienssen R., Yanofsky M.F. Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*,

APETALA1 and *CAULIFLOWER*. *Development.* 2000;127(4):725-734. DOI 10.1242/dev.127.4.725

Flood R.G., Halloran G.M. Genetics and physiology of vernalization response in wheat. *Adv. Agron.* 1986;39:87-125. DOI 10.1016/S0065-2113(08)60466-6

Fu D., Szűcs P., Yan L., Helguera M., Skinner J.S., von Zitzewitz J., Hayes P.M., Dubcovsky J. Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Mol. Gen. Genomics*. 2005;273(1):54-65. DOI 10.1007/s00438-004-1095-4

Fu Hao, Bohuslavskyi R.L. Inheritance of growth habit in einkorn wheat. *Visnik Ukrains'kogo Tovaristva Genetikiv i Selekcioneriv.* 2023;20(1-2):24-30. DOI 10.7124/visnyk.utgis.20.1-2.1510

Galiba G., Quarrie S.A., Sutka J., Morgounov A., Snape J.W. RFLP mapping of the vernalization (*Vrn1*) and frost resistance (*Fr1*) genes on chromosome 5A of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1995;90(7):1174-1179. DOI 10.1007/BF00222940

Golovnina K.A., Kondratenko E.Y., Blinov A.G., Goncharov N.P. Molecular characterization of vernalization loci *VRN1* in wild and cultivated wheats. *BMC Plant Biol.* 2010;10(1):168. DOI 10.1186/1471-2229-10-168

Goncharov N.P. Genetic resources of wheat related species: The *Vrn* genes controlling growth habit (spring *vs*. winter). *Euphytica*. 1998;100:371-376. DOI 10.1023/A:1018323600077

Goncharov N.P. Genetics of growth habit (spring vs winter) in common wheat: confirmation of the existence of dominant gene *Vrn4*. *Theor. Appl. Genet*. 2003;107(4):768-772. DOI 10.1007/s00122-003-1317-x

Goncharov N.P. Response to vernalization in wheat: its quantitative or qualitative nature. *Cereal Res. Commun.* 2004;32(3):323-330. DOI 10.1007/BF03543317

Goncharov N.P. Genus *Triticum* L. taxonomy: the present and the future. *Plant Syst. Evol.* 2011;295:1-11. DOI 10.1007/s00606-011-0480-9

Gotoh T. Genetic studies on growth habit of some important spring wheat cultivars in Japan, with special reference to the identification of the spring genes involved. *Japan. J. Breed*. 1979;29(2):133-145. DOI 10.1270/jsbbs1951.29.133

Guo X., Wang Y., Meng L., Liu H., Yang L., Zhou Y., Zhang H. Distribution of the *Vrn-D1b* allele associated with facultative growth habit in Chinese wheat accessions. *Euphytica.* 2015;206:1-10. DOI 101007/s10681-015-1440-1

International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC). Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science*. 2018;361(6403):eaar7191. DOI 10.1126/science.aar7191

Ivaničová Z., Jakobson I., Reis D., Šafář J., Milec Z., Abrouk M., Doležel J., Järve K., Valárik M. Characterization of new allele influencing flowering time in bread wheat introgressed from *Triticum militinae*. *New Biotechnol*. 2016;33(5/B):718-727. DOI 10.1016/j.nbt.2016.01.008

Iwaki K., Nakagawa K., Kuno H., Kato K. Ecogeographical differentiation in East Asian wheat, revealed from the geographical variation of growth habit and *Vrn* genotype. *Euphytica*. 2000;111(2):137-143. DOI 10.1023/A:1003862401570

Iwaki K., Haruna S., Niwa T., Kato K. Adaptation and ecological differentiation in wheat with special reference to geographical variation of growth habit and *Vrn* genotype. *Plant Breed.* 2001;120(2):107-114. DOI 10.1046/j.1439-0523.2001.00574.x

Iwaki K., Nishida J., Yanagisawa T., Yoshida H., Kato K. Genetic analysis of *Vrn-B1* for vernalization requirement by using linked dCAPS markers in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2002;104(4):571-576. DOI 10.1007/s00122-001-0769-0

Jin F.F., Wei L. The expression patterns of three *VRN* genes in common wheat (*Triticum aestivum* L.) in response to vernalization. *Cereal Res. Commun.* 2016;44(1):1-12. DOI 10.1556/0806.43.2015.041

Kato K. Chromosomal location of the genes for vernalization response, *Vrn2* and *Vrn4*, in common wheat, *Triticum aestivum* L. *Wheat Inf. Serv.* 1993;76:53-53

Kippes N., Zhu J., Chen A., Vanzetti L., Lukaszewski A., Nishida H., Kato K., Dvorak J., Dubcovsky J. Fine mapping and epistatic interaction of the vernalization gene *VRN-D4* in hexaploid wheat. *Mol. Genet. Genomics*. 2014;289(1):47-62. DOI 10.1007/s00438-013-0788-y

Kippes N., Debernardi J.M., Vasquez-Gross H.A., Akpinar B.A., Budak H., Kato K., Chaod S., Akhunov E., Dubcovsky J. Identification of the *VERNALIZATION 4* gene reveals the origin of spring growth habit in ancient wheats from South Asia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015;112(39):E5401-E5410. DOI 10.1073/pnas.1514883112

Kippes N., Chen A., Zhang X., Lukaszewski A.J., Dubcovsky J. Development and characterization of a spring hexaploid wheat line with no functional *VRN2* genes. *Theor. Appl. Genet*. 2016;129(7):1417-1428. DOI 10.1007/s00122-016-2713-3

Kippes N., Guedira M., Lin L., Alvarez M.A., Brown-Guedira G.L., Dubcovsky J. Single nucleotide polymorphisms in a regulatory site of *VRN-A1* first intron are associated with differences in vernalization requirement in winter wheat. *Mol. Gen. Genomics*. 2018;293(5):1231-1243. DOI 10.1007/s00438-018-1455-0

Knott D.R. The inheritance of rust resistance: IV. Monosomic analysis of rust resistance and some other characters in six varieties of wheat including Gabo and Kenya farmer. *Can. J. Plant Sci*. 1959;39(2):215-228. DOI 10.4141/cjps59-031

Konopatskaia I., Vavilova V., Kondratenko E.Ya., Blinov A., Goncharov N.P. Allelic variation of *VRN1* gene in tetraploid wheat species with spring growth habit. *BMC Plant Biol*. 2016;16(Suppl. 3):244. DOI 10.1186/s12870-016-0924-z

Koval S.F., Goncharov N.P. Multiple allelism at *VRN1* locus of common wheat. *Acta Agr. Hung*. 1998;46(2):113-119

Krasileva K.V., Vasquez-Gross H.A., Howell T., Bailey P., Paraiso F., Clissold L., Simmonds J., Ramirez-Gonzalez R.H., Wang X., Borrill P., Fosker C., Ayling S., Phillips A.L., Uauy C., Dubcovsky J. Uncovering hidden variation in polyploid wheat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017;114(6):E913-E921. DOI 10.1073/pnas.1619268114

Law C.N., Worland A.J., Giorgi B. The genetic control of ear-emergence time by chromosomes 5A and 5D of wheat. *Heredity.* 1976;36(1):49-58. DOI 10.1038/hdy.1976.5

Li C., Dubcovsky J. Wheat FT protein regulates *VRN1* transcription through interactions with FDL2. *Plant J*. 2008;55(4):543-554. DOI 10.1111/j.1365-313X.2008.03526.x

Liu Y., He Z., Appels R., Xia X. Functional markers in wheat: current status and future prospects. *Theor. Appl. Genet.* 2012;125:1-10. DOI 10.1007/s00122-012-1829-3

Makhoul M., Chawla H.S., Wittkop B., Stahl A., Voss-Fels K.P., Zetzsche H., Snowdon R.J., Obermeier C. Long-amplicon single-molecule sequencing reveals novel, trait-associated variants of *VERNALIZATION1* homoeologs in hexaploid wheat. *Front. Plant Sci.* 2022;13:942461. DOI 10.3389/fpls.2022.942461

McIntosh R.A. Catalogue of Gene Symbols for Wheat. In: Proceedings of the Fourth International Wheat Genetics Symposium, Held at the University of Missouri, Columbia, Missouri, USA, August 6-11, 1973. Missouri, 1973;893-937

McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of gene symbols for wheat. 2013. Retrieved from http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp (accessed 20 Febr. 2023)

Milec Z., Tomková L., Sumíková T., Pánková K. A new multiplex PCR test for the determination of *Vrn-B1* alleles in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol. Breed*. 2012;30(1):317-323. DOI 10.1007/s11032-011-9621-7

Milec Z., Strejčková B., Šafář J. Contemplation on wheat vernalization. *Front. Plant Sci.* 2023;13:1093792. DOI 10.3389/fpls.2022.1093792

Murai K., Miyamae M., Kato H., Takumi S., Ogihara Y. *WAP1*, a wheat *APETALA1* homolog, plays a central role in the phase transition from vegetative to reproductive growth. *Plant Cell Physiol*. 2003;44(12):1255-1265. DOI 10.1093/pcp/pcg171

Muterko A. Copy number variation and expression dynamics of the dominant *Vernalization-A1a* allele in wheat. *Plant Mol. Biol. Rep*. 2023;1-16. https://doi.org/10.1007/s11105-023-01406-5

Muterko A.F., Salina E.A. Analysis of the *VERNALIZATION-A1* exon-4 polymorphism in polyploid wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(3): 323-333. DOI 10.18699/VJ16.19-o

Muterko A., Balashova I., Cockram J., Kalendar R., Sivolap Y. The new wheat vernalization response allele *Vrn-D1s* is caused by DNA transposon insertion in the first intron. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2015;33:294-303. DOI 10.1007/s11105-014-0750-0

Muterko A., Kalendar R., Salina E. Novel alleles of the *VERNALIZATION1* genes in wheat are associated with modulation of DNA curvature and flexibility in the promoter region. *BMC Plant Biol.* 2016;16(Suppl. 1):9. DOI 10.1186/s12870-015-0691-2

Nédellec C., Ibanescu L., Bossy R., Sourdille P. WTO, an ontology for wheat traits and phenotypes in scientific publications. *Genomics Inform*. 2020;18(2): e14. DOI 10.5808/GI.2020.18.2.E14

Nishimura K., Moriyama R., Katsura K., Saito H., Takisawa R., Kitajima A., Nakazaki T. The early flowering trait of an emmer wheat accession (*Triticum turgidum* L. ssp. *dicoccum*) is associated with the *cis*-element of the *Vrn-A3* locus. *Theor. Appl. Genet*. 2018;131(10): 2037-2053. DOI 10.1007/s00122-018-3131-5

Nishimura K., Handa H., Mori N., Kawaura K., Kitajima A., Nakazaki T. Geographical distribution and adaptive variation of *VRN-A3* alleles in worldwide polyploid wheat (*Triticum* spp.) species collection. *Planta.* 2021;253(6):132. DOI 10.1007/s00425-021-03646-9

Nishiura A., Kitagawa S., Matsumura M., Kazama Y., Abe T., Mizuno N., Nasuda S., Murai K. An early-flowering einkorn wheat mutant with deletions of *PHYTOCLOCK 1/LUX ARRHYTHMO* and *VERNALIZATION 2* exhibits a high level of *VERNALIZATION 1* expression induced by vernalization. *J. Plant Physiol*. 2018;222: 28-38. DOI 10.1016/j.jplph.2018.01.002

Preston J.C., Kellogg E.A. Reconstructing the evolutionary history of paralogous *APETALA1/FRUITFULL*-like genes in grasses (Poaceae). *Genetics*. 2006;174(1):421-437. DOI 10.1534/genetics.106.057125

Pugsley A.T. Genetic studies of phasic development and their application to wheat breeding. In: Proceedings of the Third International Wheat Genetics Symposium, Australian Academy of Science, Canberra (5-9 August, 1968). Canberra: Australian Academy of Science, 1968;288-293

Pugsley A.T. A genetic analysis of the spring-winter habit of growth in wheat. *Austr. J. Agr. Res.* 1971;22(1):21-31. DOI 10.1071/AR9710021

Pugsley A.T. Additional genes inhibiting winter habit in wheat. *Euphytica*. 1972;21(3):547-552. DOI 10.1007/BF00039355

Pugsley A.T. The impact of plant physiology on Australian wheat breeding. *Euphytica*. 1983;32:743-748. https://doi.org/10.1007/BF00042154

Royo C., Dreisigacker S., Soriano J.M., Lopes M.S., Ammar K., Villegas D. Allelic variation at the vernalization response (*Vrn-1*) and photoperiod sensitivity (*Ppd-1*) genes and their association with the development of durum wheat landraces and modern cultivars. *Front. Plant Sci.* 2020;11:838. DOI 10.3389/fpls.2020.00838

Santra D.K., Santra M., Allan R.E., Campbell K.G., Kidwell K.K. Genetic and molecular characterization of vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, and *Vrn-D1* in spring wheat germplasm from the Pacific Northwest region of the USA. *Plant Breed*. 2009;128(6):576-584. DOI 10.1111/j.1439-0523.2009.01681.x

Shcherban A.B., Salina E.A. Evolution of *VRN-1* homoeologous loci in allopolyploids of *Triticum* and their diploid precursors. *BMC Plant Biol.* 2017;17(Suppl. 1):188. DOI 10.1186/s12870-017-1129-9

Shcherban A.B., Efremova T.T., Salina E.A. Identification of a new *Vrn-B1* allele using two near-isogenic wheat lines with difference in heading time. *Mol. Breed.* 2012a;29(3):675-685. DOI 10.1007/s11032-011-9581-y

Shcherban A.B., Emtseva M.V., Efremova T.T. Molecular genetical characterization of vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1* and *Vrn-D1* in spring wheat germplasm from Russia and adjacent regions. *Cereal Res. Commun.* 2012b;40(3):351-361. DOI 10.1556/CRC.40.2012.3

Shcherban A.B., Khlestkina E.K., Efremova T.T., Salina E.A. The effect of two differentially expressed wheat *VRN-B1* alleles on the heading time is associated with structural variation in the first intron. *Genetica.* 2013;141(4-6):133-141. DOI 10.1007/s10709-013-9712-y

Shcherban A.B., Börner A., Salina E.A. Effect of *VRN-1* and *PPD-D1* genes on heading time in European bread wheat cultivars. *Plant Breed.* 2015a;134(1):49-55. DOI 10.1111/pbr.12223

Shcherban A.B., Strygina K.V., Salina E.A. *VRN-1* gene-associated prerequisites of spring growth habit in wild tetraploid wheat *T. dicoccoides* and the diploid A genome species. *BMC Plant Biol.* 2015b;15(1):94. DOI 10.1186/s12870-015-0473-x

Shcherban A.B., Schichkina A.A., Salina E.A. The occurrence of spring forms in tetraploid Timopheevi wheat is associated with variation in the first intron of the *VRN-A1* gene. *BMC Plant Biol.* 2016;16(3): 107-118. DOI 10.1186/s12870-016-0925-y

Shitsukawa N., Ikari C., Shimada S., Kitagawa S., Sakamoto K., Saito H., Ryuto H., Fukunishi N., Abe T., Takumi S., Nasuda S., Murai K. The einkorn wheat (*Triticum monococcum*) mutant, maintained vegetative phase, is caused by a deletion in the *VRN1* gene. *Genes Genet. Syst.* 2007;82(2):167-170

Singh M.P. Monosomic analysis in wheat. *Heredity*. 1967;22(4):591-596. DOI 10.1038/hdy.1967.72

Smith L. Mutant and Linkage Studies in *Triticum monococcum* and *T. aegilopoides*. Columbia: University of Missouri, Agricultural Experiment Station, 1939

Steinfort U., Trevaskis B., Fukai S., Bell K.L., Dreccer M.F. Vernalisation and photoperiod sensitivity in wheat: Impact on canopy development and yield components. *Field Crops Res.* 2017;201:108-121. DOI 10.1016/j.fcr.2016.10.012

Stelmakh A.F. Geographic distribution of *Vrn*-genes in landraces and improved varieties of spring bread wheat. *Euphytica*. 1990;45:113-118. DOI 10.1007/BF00033278

Stelmakh A.F. Genetic effects of *Vrn* genes on heading date and agronomic traits in bread wheat. *Euphytica.* 1993;65:53-60. DOI 10.1007/BF00022199

Stelmakh A.F., Avsenin V.I. Alien introgressions of spring habit dominant genes into bread wheat genomes. *Euphytica.* 1996;89:65-68. DOI 10.1007/BF00015720

Stelmakh A., Zolotova N., Fayt V. Genetic analysis of differences in duration vernalization requirement of winter bread wheat. *Cereal Res. Commun.* 2005;33(4):713-718. DOI 10.1556/CRC.33.2005.2-3.139

Strejčková B., Milec Z., Holušová K., Cápal P., Vojtková T., Čegan R., Šafář J. In-depth sequence analysis of bread wheat *VRN1* genes. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22:12284. DOI 10.3390/ijms222212284

Strejčková B., Mazzucotelli E., Čegan R., Milec Z., Brus J., Çakır E., Mastrangelo A.M., Özkan H., Šafář J. Wild emmer wheat, the progenitor of modern bread wheat, exhibits great diversity in the *VERNALIZATION1* gene. *Front. Plant Sci.* 2023;13:1106164. DOI 10.3389/fpls.2022.1106164

Takumi S., Koyama K., Fujiwara K., Kobayashi F. Identification of a large deletion in the first intron of the *Vrn-D1* locus, associated with loss of vernalization requirement in wild wheat progenitor *Aegilops tauschii* Coss. *Genes Genet. Syst*. 2011;86(3):183-195. DOI 10.1266/ggs.86.183

Tan C., Yan L. Duplicated, deleted and translocated *VRN2* genes in hexaploid wheat. *Euphytica.* 2016;208(2):277-284. DOI 10.1007/s10681-015-1589-7

Trevaskis B., Bagnall D.J., Ellis M.H., Peacock W.J., Dennis E.S. MADS box genes control vernalization-induced flowering in cereals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003;100(22):13099-13104. DOI 10.1073/pnas.1635053100

Trevaskis B., Hemming M.N., Peacock W.J., Dennis E.S. *HvVRN2* responds to daylength, whereas *HvVRN1* is regulated by vernalization and developmental status. *Plant Physiol*. 2006;140(4):1397-1405. DOI 10.1104/pp.105.073486

Tsunewaki K. Monosomic analysis of synthesized hexaploid wheats. *Japan. J. Genet.* 1962;37(2):155-168. DOI 10.1266/jjg.37.155

Tsunewaki K., Jenkins B.S. Monosomic and conventional gene analysis in common wheat. II. Growth habit and awnedness. *Japan. J. Genet*. 1961;46(11/12):428-443. DOI 10.1266/jjg.36.428

van Beem J., Mohler V., Lukman R., van Ginkel M., William M., Crossa J., Worland A.J. Analysis of genetic factors influencing the developmental rate of globally important CIMMYT wheat cultivars. *Crop Sci*. 2005;45(5):2113-2119. DOI 10.2135/cropsci2004.0665

Würschum T., Boeven P.H., Langer S.M., Longin C.F., Leiser W.L. Multiply to conquer: copy number variations at *Ppd-B1* and *Vrn-A1* facilitate global adaptation in wheat. *BMC Genet*. 2015;16:96. https://doi.org/10.1186/s12863-015-0258-0

Yan L., Loukoianov A., Tranquilli G., Helguera M., Fahima T., Dubcovsky J. Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003;100(10):6263-6268. DOI 10.1073_pnas.0937399100

Yan L., Loukoianov A., Blechl A., Tranquilli G., Ramakrishna W., SanMiguel P., Bennetzen J.L., Echenique V., Dubcovsky J. The wheat *VRN2* gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science*. 2004a;303(5664):1640-1644. DOI 10.1126/science.1094305

Yan L., Helguera M., Kato K., Fukuyama S., Sherman J., Dubcovsky J. Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2004b;109(8):1677-1686. DOI 10.1007/s00122-004-1796-4

Yan L., Fu D., Li C., Blechl A., Tranquilli G., Ramakrishna W., SanMeguel P., Bennetzen J.L., Echenique V., Dubcovsky J. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006;103(51):19581-19586. DOI 10.1073/pnas.0607142103

Zhang B., Wang X., Wang X., Ma L., Wang Z., Zhang X. Molecular characterize ation of a novel vernalization allele *Vrn-B1d* and its effect on heading time in Chinese wheat (*Triticum aestivum* L.) landrace Hongchunmai. *Mol. Breed*. 2018;38(10):127. DOI 10.1007/s11032-018-0870-6

Zhang J., Wang Y., Wu S., Yang J., Liu H., Zhou Y. A single nucleotide polymorphism at the *Vrn-D1* promoter region in common wheat is associated with vernalization response. *Theor. Appl. Genet.* 2012;125(8):1697-1704. DOI 10.1007/s00122-012-1946-z

Zhang X., Gao M., Wang S., Chen F., Cui D. Allelic variation at the vernalization and photoperiod sensitivity loci in Chinese winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). *Front. Plant Sci.* 2015;6:470. DOI 10.3389/fpls.2015.00470

Zhang X.K., Xiao Y.G., Zhang Y., Xia X.C., Dubcovsky J., He Z.H. Allelic variation at the vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, and *Vrn-B3* in Chinese wheat cultivars and their association with growth habit. *Crop Sci*. 2008;48(2):458-470. DOI 10.2135/cropsci2007.06.0355

Zotova L., Kurishbayev A., Jatayev S., Goncharov N.P., Shamambayeva N., Kashapov A., Nuralov A., Otemissova A., Sereda S., Shvidchenko V., Lopato S., Schramm C., Jenkins C., Soole K., Langridge P., Shavrukov Y. General transcription repressor gene, *TaDr1*, mediates expressions of *TaVrn1* and *TaFT1* controlling flowering in bread wheat under drought and slowly dehydration. *Front. Genet*. 2019;10:63. DOI 10.3389/fgene.2019.00063

Благодарности. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-16-20026) и Правительства Новосибирской области.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 12.10.2023. После доработки 01.11.2023. Принята к публикации 02.11.2023.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023;27(7):947-957
DOI 10.18699/VJGB-23-109

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

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

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

© Крупин П.Ю., Юркина А.И., Кочешкова А.А., Ульянов Д.С., Карлов Г.И., Дивашук М.Г., 2023
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

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 Selektsii = 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 плоидности ($2n = 2x/4x/6x$) отличаются наличием P-генома (Zhang Y. et al., 2015). Геном J (=E) в качестве основного несут диплоиды *Thinopyrum bessarabicum* (геном $J = J^b$) и *Th. elongatum* (геном $E = J^e$). 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 соотнесенности 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 удлиненным *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 – тандемно 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 (Anamthawat-Jónsson, Heslop-Harrison, 1993; Vershinin et al., 1994; Kishii et al., 1999; Anamthawat-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 представителей 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 $J^rJ^{vs}St$ как носитель St-субгенома и St-специфичных повторов в рекомбинантном геноме J^{vs}. 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^1X^{cr}) (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^b-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 CTAB (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 (2*n*)	Геномная формула	Цель (секвенирование /qPCR)
P. spicata	PI 578855	GRIN[1]	14	StSt	Секвенирование, qPCR
P. spicata	PI 236671	GRIN	28	StStStSt	Секвенирование, qPCR
P. libanotica	PI 228389	GRIN	14	StSt	qPCR
P. libanotica	PI 330690	GRIN	14	StSt	Секвенирование
P. tauri	PI 380652	GRIN	14	StSt	Секвенирование, qPCR
P. geniculata	PI 670437	GRIN	28	StStStSt	Секвенирование, qPCR
P. cognata	PI 670361	GRIN	28	StStStSt	Секвенирование, qPCR
P. kosaninii	PI 237636	GRIN	56	StStStSt StStStSt	Секвенирование, qPCR
Th. intermedium	PI 401200	GRIN	42	$J^{vs}J^{vs}J^{r}J^{r}StSt$	qPCR
Th. bessarabicum	PI 531711	GRIN	14	$J^{b}J^{b}$	qPCR
Th. junceum	PI 119604	GRIN	42	$J^{b}J^{b}J^{b}J^{b}J^{e}J^{e}$	qPCR
E. pendulinus	PI 639804	GRIN	28	StStYY	qPCR
Ae. tauschii	K-608	ВИР[2]	14	DD	qPCR
S. cereale	Сорт Берегиня	НЦЗ[3]	14	RR	qPCR
T. aestivum	Сорт Chinese Spring	–	42	BBAADD	qPCR

[1] GRIN – информационная сеть по ресурсам зародышевой плазмы Службы сельскохозяйственных исследований Министерства сельского хозяйства США (USDA-ARS Germplasm Resources Information Network).
[2] ВИР – Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова.
[3] 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[1].

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 флюорофором 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 °C; далее 40 циклов: денатурация – 10 с при 95 °C; отжиг праймера – 30 с при 60 °C.

Статистический анализ, включая расчет средних значений Cq, 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.

[1] Приложения 1 и 2 см. адресу:
https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2023-27/appx30.xlsx

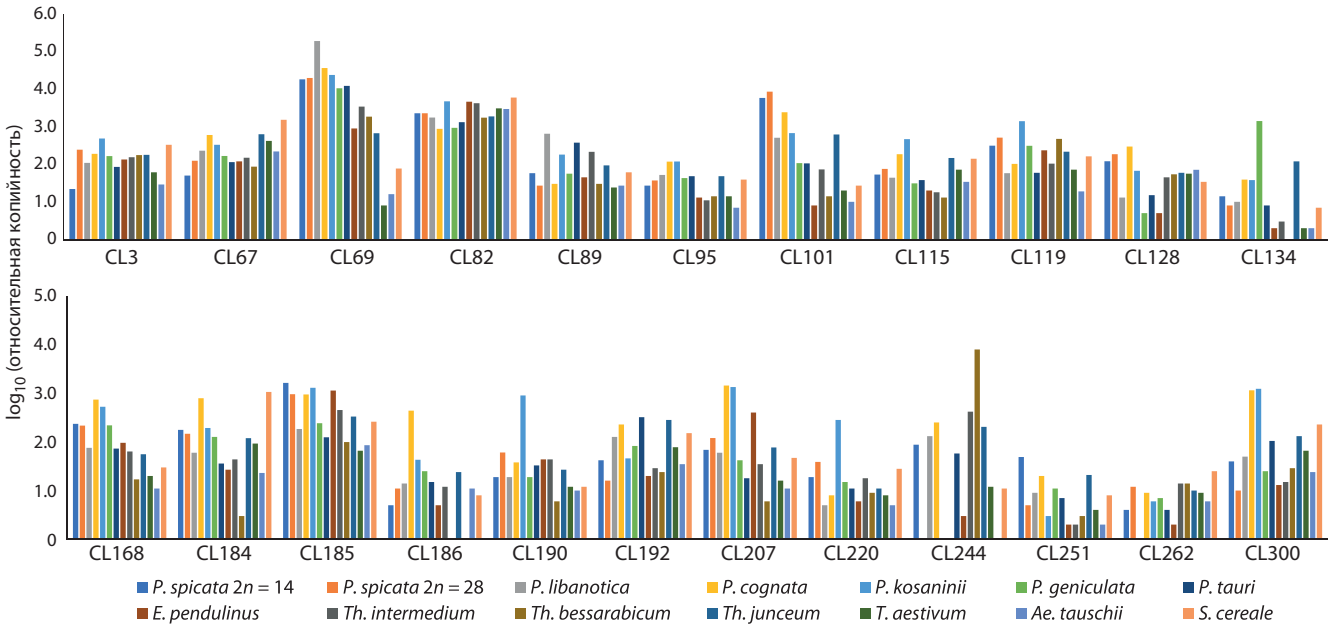
Коэффициенты корреляции *r* Пирсона ($p < 0.05$) между паттернами копийности повтора и паттернами копийности вида рассчитывали на основе полученных значений копийности посредством программного обеспечения Statistica 12 (StatSoft, США). Диаграммы методом анализа главных компонент строили для сателлитных 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* (2*n* = 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



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 pTa-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 pTa-451 из генома мягкой пшеницы (88 %). Четыре найденных нами повтора проявили сходство со следующими мобильными элементами: CL184 – с ретротранспозоном *Cassandra* из генома ржи (98 %), CL67 и CL115 – с ретротранспозонами из генома ячменя *Cereba* (91 %) и *Sandra5* (78 %) соответственно, CL 192 – с транспозоном XJ из генома *Ae. tauschii* (70 %). Повтор CL3 более всего был сходен с E-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 различались 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 (≤2), средней (>2, <4) и высокой копийностью (≥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 копийность у видов *Pseudoroegneria* (4.0–5.3), средняя – у *Thinopyrum* и *E. pendulinus* (2.8–3.0), низкая – у остальных; CL101 – средняя копийность у *Pseudoroegneria* (2.0–3.9) и *Th. junceum* (2.8), низкая – у остальных; CL244 – близкая к высокой у *Th. bessarabicum* (3.9), значительно варьирующаяся 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 копийность 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 копийностью, варьирующейся 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 копийности повторов позволили выделить следующие группы с близкими паттернами копийности 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 копийности видов показали высокий уровень сходства копийности 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 копийности наблюдался между *Th. intermedium* и *Pseudoroegneria* ($r > 0.6$). Паттерн копийности *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 копийности у родственных видов.

Часть обнаруженных нами в St-геноме сателлитных повторов показала сходную копийность 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 копийностью у образцов *Pseudoroegneria* и средней копийностью у видов *Thinopyrum* и *E. pendulinus* отличался CL69, что может говорить о его возникновении до расхождения St- и J-геномов. Повтор CL101 со средней копийностью 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 копийности между видами (Pestsova et al., 1998; Ruban, Badaeva, 2018). Копийность 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 хромосомных 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 копийности 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 копийности 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 копийностью 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 копийности между видами *Pseudoreogneria*, 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 *Pseudoreogneria* 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. Приложения 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. Приложения 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_2-80, гибридизующийся 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 локализацией, 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 Selektsii = 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 Selektsii = 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 дупликации 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., Burridge 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 turczaninovii* (Triticeae: Poaceae). *Ecol. Evol*. 2022;12(1):e8517. DOI 10.1002/ece3.8517

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/plants 9010015

Divashuk M.G., Nikitina E.A., Sokolova V.M., Yurkina A.I., Kocheshkova A.A., Razumova O.V., Karlov G.I., Kroupin P.Yu. 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., Burridge 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 proces-

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

Kroupin 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

Kroupin 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

Kroupin 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

Kroupin 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^{St} 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 wheatgrasses 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 (*mat*K, *rbc*L and *trn*H-*psb*A) 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 *Campeiostachys* (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 Selektsii = 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. Autoploid 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/tpj.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/compcytogen.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., Svitashev 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_2-80: 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 genomic 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. *Pseudorogneria 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 *Campeiostachys* 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-*Dasypyrum 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 *trn*H-*psb*A 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.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023;27(8):958-970
DOI 10.18699/VJGB-23-110

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

Молекулярно-генетический и цитогенетический анализ интрогрессии хромосом хлопчатника *Gossypium barbadense* L. в геном *G. hirsutum* L. у гибридов BC_2F_1

М.Ф. Санамьян[1] ✉, Ш.У. Бобохужаев[1], Ш.С. Абдукаримов[2], О.Г. Силкова[3]

[1] Национальный университет Узбекистана им. Мирзо Улугбека, Ташкент, Узбекистан
[2] Центр геномики и биоинформатики Академии наук Республики Узбекистан, Ташкент, Узбекистан
[3] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
✉ sanam_marina@rambler.ru

Аннотация. Линии хлопчатника *Gossypium hirsutum* L. с чужеродным замещением хромосом тетраплоидных видов *G. barbadense* L., *G. tomentosum* Nutt. ex Seem., *G. mustelinum* Miers ex Watt. являются ценным источником для селекции, увеличивающим генетическое разнообразие *G. hirsutum*. Замещение определенных хромосом хлопчатника вида *G. hirsutum* L. хромосомами вида *G. barbadense* оказывает влияние на удлинение, выход и прочность волокна, микронейр. Для повышения эффективности процесса создания линий необходимо изучение характера интрогрессии чужеродных хромосом в геном *G. hirsutum* L. В результате молекулярно-генетического анализа гибридов BC_2F_1, полученных от скрещиваний моносомных линий хлопчатника *G. hirsutum* цитогенетической коллекции Узбекистана с моносомными беккроссными гибридами BC_1F_1 *G. hirsutum* × *G. barbadense* по одинаковым хромосомам, обнаружены генетические различия по профилю хромосом-специфичных микросателлитных SSR-маркеров между гибридами. Выявлена преимущественная интрогрессия хромосом 4, 6, 12 A_t-субгенома и 22 D_t-субгенома *G. barbadense*, тогда как хромосомы 2, 7 A_t-субгенома и 18 D_t-субгенома *G. barbadense* характеризовались элиминацией, среди них хромосомы 7 A_t-субгенома и 18 D_t-субгенома *G. barbadense* элиминировали уже в первом беккроссном поколении. В настоящей работе проанализированы две линии, CS-B06 и CS-B07, американской цитогенетической коллекции с предполагаемым замещением по хромосомам 6 и 7 A_t-субгенома. Обнаружены присутствие только полиморфных аллелей вида *G. hirsutum* и отсутствие полиморфных аллелей вида *G. barbadense*, что показало отсутствие замещения по этим хромосомам. Гибриды BC_2F_1 с моносомией как по хромосомам *G. barbadense*, так и по хромосомам *G. hirsutum* характеризовались регулярной конъюгацией хромосом и высоким мейотическим индексом. Однако многие гибриды отличались снижением фертильности пыльцы. Два гибрида с моносомией по хромосоме 7 A_t-субгенома *G. hirsutum* и хромосоме 6 A_t-субгенома *G. barbadense* имели наибольшую редукцию в жизнеспособности пыльцы (70.09 ± 1.57 и 75.00 ± 1.66 % соответственно). Таким образом, в этой работе показана особенность в интрогрессии индивидуальных хромосом хлопчатника вида *G. barbadense* в геном хлопчатника *G. hirsutum*.
Ключевые слова: хлопчатник; *Gossypium hirsutum*; *G. barbadense*; моносомные линии; хромосомно-замещенные гибриды; молекулярно-генетический анализ.

Для цитирования: Санамьян М.Ф., Бобохужаев Ш.У., Абдукаримов Ш.С., Силкова О.Г. Молекулярно-генетический и цитогенетический анализ интрогрессии хромосом хлопчатника *Gossypium barbadense* L. в геном *G. hirsutum* L. у гибридов BC_2F_1. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(8):958-970. DOI 10.18699/VJGB-23-110

Molecular-genetic and cytogenetic analyses of cotton chromosome introgression from *Gossypium barbadense* L. into the genome of *G. hirsutum* L. in BC_2F_1 hybrids

M.F. Sanamyan[1] ✉, Sh.U. Bobokhujayev[1], Sh.S. Abdukarimov[2], O.G. Silkova[3]

[1] National University of Uzbekistan named after Mirzo Ulugbek, Tashkent, Uzbekistan
[2] Center of Genomics and Bioinformatics of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Uzbekistan
[3] Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
✉ sanam_marina@rambler.ru

Abstract. Substitution lines of the cotton *G. hirsutum* L. involving chromosomes of the tetraploid species *G. barbadense* L., *G. tomentosum* Nutt. ex Seem., and *G. mustelinum* Miers ex Watt. are a valuable source for breeding, increasing the genetic diversity of *G. hirsutum*. The substitution of certain *G. hirsutum* L. chromosomes with *G. barbadense* chromosomes affect fibre elongation, fibre yield, fibre strength, and micronaire. To increase the efficiency of creating lines, it is necessary to study the nature of the introgression of alien chromosomes into the *G. hirsutum* L. genome. As a result of molecular genetic analysis of BC_2F_1 hybrids obtained from crossing monosomic lines of the cotton *G. hirsutum* from the cytogenetic collection of Uzbekistan with monosomic backcross hybrids BC_1F_1 *G. hirsutum* × *G. barbadense* on the

© Санамьян М.Ф., Бобохужаев Ш.У., Абдукаримов Ш.С., Силкова О.Г., 2023
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

same chromosomes, genetic differences between the hybrids in the profile of chromosome-specific microsatellite SSR markers were found. The predominant introgression of chromosomes 4, 6 and 12 of the A_t-subgenome and 22 of the D_t-subgenome of *G. barbadense* was revealed, while chromosomes 2 and 7 of the A_t-subgenome and 18 of the D_t-subgenome of *G. barbadense* were characterized by elimination. Among them, chromosomes 7 of the A_t-subgenome and 18 of the D_t-subgenome of *G. barbadense* were eliminated in the first backcross generation. In this work, two lines, CS-B06 and CS-B07, from the American cytogenetic collection with a putative substitution involving chromosomes 6 and 7 of the A_t-subgenome were analysed. The presence of only polymorphic alleles from the species *G. hirsutum* and the absence of polymorphic alleles from the species *G. barbadense* were revealed, which showed the absence of substitution involving these chromosomes. BC_2F_1 hybrids with monosomy for both *G. barbadense* and *G. hirsutum* chromosomes were characterized by regular pairing of chromosomes and high meiotic indexes. However, many hybrids were characterized by a decrease in pollen fertility. Two hybrids with monosomy for chromosome 7 of the A_t-subgenome of *G. hirsutum* and chromosome 6 of the A_t-subgenome of *G. barbadense* had the greatest reduction in pollen viability (70.09 ± 1.57 and 75.00 ± 1.66 %, respectively). Thus, this work shows a specific feature in the introgression of individual chromosomes of the cotton species *G. barbadense* into the cotton *G. hirsutum* genome.
Key words: cotton; *Gossypium hirsutum*; *G. barbadense*; monosomic lines; chromosome-substituted hybrids; molecular genetic analysis.

For citation: Sanamyan M.F., Bobokhujayev Sh.U., Abdukarimov Sh.S., Silkova O.G. Molecular-genetic and cytogenetic analyses of cotton chromosome introgression from *Gossypium barbadense* L. into the genome of *G. hirsutum* L. in BC_2F_1 hybrids. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(8):958-970. DOI 10.18699/VJGB-23-110

Введение

В настоящее время в мире в коммерческих целях выращивают четыре вида хлопчатника, из них два вида, *Gossypium herbaceum* L. (A_1-геном) и *G. arboretum* L. (A_2-геном), – диплоиды, а другие два, *G. hirsutum* L. (AD_1-геном) и *G. barbadense* L. (AD_2-геном), – тетраплоиды (Wendel et al., 2009). Хлопчатник *G. hirsutum* является основной культурой, которая составляет более чем 90 % мирового урожая хлопка (International Cotton Advisory Committee – ICAC, 2019).

Мировое потребление хлопка демонстрирует устойчивое увеличение на 80 % в период с 1980/1981 по 2020/2021 г. (International Cotton Advisory Committee – ICAC, 2021), что требует повышения урожайности хлопка и качества его волокна. Увеличение урожайности хлопка было достигнуто путем создания трансгенных сортов, традиционной селекции, межсортового скрещивания. Однако большинство этих сортов получено при отборе из узкой генотипической среды и адаптировано к определенным почвенно-климатическим условиям (International Cotton Advisory Committee – ICAC, 2021). Таким образом, на сегодняшний день у культивируемого хлопчатника отмечается сокращение генетического разнообразия, что является причиной снижения качества волокна и повышения уязвимости к стрессовым факторам из-за близкой родственности высокоурожайных сортов.

Обогащение генома *G. hirsutum* аллелями хозяйственно ценных генов от других видов хлопчатника очень актуально (Grover et al., 2022). Например, *G. tomentosum* характеризуется жароустойчивостью, а *G. mustelinum* и *G. stocksii* – устойчивостью к вредителям и заболеваниям. Известно, что тонковолокнистый хлопчатник вида *G. barbadense* менее продуктивен и обладает меньшей адаптивностью к условиям выращивания, но имеет свойства волокна, значительно превышающие по качеству (длина, крепость и тонина волокна) культивируемые сорта *G. hirsutum*, хотя последний более урожайный. С учетом взаимодополняющих хозяйственно ценных признаков этих двух видов предприняты многочисленные попытки гибридизации в рамках традиционной селекции (Anwar et al., 2022). Однако у межвидовых гибридов были плохие агрономически ценные признаки, гибриды характеризовались ограниченной рекомбинацией по причине несовместимости геномов из-за крупных инверсий на различных хромосомах двух субгеномов тетраплоидных видов. Как правило, гибриды F_1 *G. hirsutum* × *G. barbadense* плодовиты, но фенотипы F_2 и последующие поколения смещены в сторону одного из их родителей из-за стерильности пыльцы, подавления кроссинговера, селективной элиминации генов и нарушения расщепления (Zhang et al., 2014; Si et al., 2017; Fang et al., 2023).

Получение форм с замещением хромосом (CS – chromosome substitition) у различных видов растений позволяет осуществлять направленную интрогрессию конкретных хромосом или плеч отдельных хромосом, которые представляют собой ценный источник новых аллелей полезных генов. Ранее такие формы были созданы у многих сельскохозяйственных культур, что позволило улучшить некоторые агрономические признаки (Shchapova, Kravtsova, 1982; Силкова и др., 2006, 2007; Schneider et al., 2008; Tiwari et al., 2010; Rawat et al., 2011).

На протяжении ряда лет в США у хлопчатника проводятся исследования по созданию линий с чужеродным замещением хромосом с участием трех тетраплоидных видов (*G. barbadense*, *G. tomentosum*, *G. mustelinum*), причем с участием вида *G. barbadense* уже получено 20 линий с замещениями отдельных хромосом (Saha et al., 2006, 2013, 2015). Эти линии позволили выяснить, что замещения определенных хромосом хлопчатника вида *G. hirsutum* L. хромосомами вида *G. barbadense* L. (CS-B02, CS-B04, CS-B16, CS-B17, CS-B22Lo, CS-B22sh, CS-B25) оказывают влияние на удлинение, выход, прочность волокна, микронейр и др. в сравнении с исходными линиями TM-1 и Pima 3-79 (Saha et al., 2004). Показано, что такие линии являются важным источником для селекции, увеличивающим генетическое разнообразие *G. hirsutum* L. (Jenkins et al., 2006, 2007).

Ранее моносомные линии Цитогенетической коллекции хлопчатника Узбекистана (ЦКХУ), созданные в генотипической среде высокоинбредной линии Л-458 вида *G. hir-*

sutum L. (Sanamyan et al., 2014), с идентифицированной моносомией по хромосомам 2, 4, 6, 7, 12 A_t-субгенома и 17, 18, 21, 22 D_t-субгенома, а также две линии с моносомией по телоцентрикам 6 и 11 A_t-субгенома (Санамьян и др., 2016; Sanamyan et al., 2016; Санамьян, Бобохужаев, 2019) были использованы в скрещиваниях с линией Pima 3-79 вида *G. barbadense*, а также в скрещиваниях с гибридами F_1, для получения анеуплоидных гибридов BC_1F_1 и в последующем для создания линий хлопчатника с замещением хромосом. В работе был задействован двойной скрининг гибридов на всех этапах беккроссирования с помощью молекулярно-генетических маркеров и цитогенетического анализа (Sanamyan et al., 2022). Первый этап исследования заключался в молекулярно-генетическом анализе гибридных растений на стадии проростков с целью ускоренного выявления анеуплоидных форм с присутствием или отсутствием замещений хромосом или их плеч. На втором этапе выполнен цитогенетический анализ мейоза у гибридов на стадиях метафазы I и телофазы II, а также изучена фертильность пыльцы при окраске ацетокармином с целью подтверждения моносомного статуса беккроссных гибридных растений и нахождения у них особенностей в поведении хромосом.

Целью этой работы были молекулярно-генетическое и цитогенетическое изучение гибридов BC_2F_1 от скрещиваний моносомных линий хлопчатника ЦКХУ с моносомными беккроссными гибридами BC_1F_1 и выяснение особенностей интрогрессии индивидуальных хромосом хлопчатника вида *G. barbadense* в геном хлопчатника вида *G. hirsutum*. В ходе работы на стадии проростков с помощью молекулярно-генетических маркеров (SSR) среди гибридов BC_2F_1 обнаружены анеуплоидные формы, у которых подтверждены замещение хромосом 4, 6, 12 A_t-субгенома и хромосомы 22 D_t-субгенома и элиминация хромосом 2, 7 A_t-субгенома и 18 D_t-субгенома с *G. barbadense*. У анеуплоидов BC_2F_1 изучено поведение индивидуальных хромосом *G. hirsutum* и *G. barbadense* в мейозе, а также проведена оценка мейотического индекса и фертильности пыльцы. Продемонстрирована перспективность использования молекулярно-генетических маркеров на стадии проростков для ускоренного отбора растений с чужеродным замещением отдельных хромосом *G. hirsutum*/*G. barbadense* в поколении BC_2F_1.

Материалы и методы

Растительный материал. Моносомные и монотелосомные линии ЦКХУ были созданы в единой генотипической среде высокоинбредной линии Л-458 *G. hirsutum*, полученной М.Ф. Абзаловым и Г.Н. Фатхуллаевой, в результате многолетнего самоопыления (F_{20}) на основе сорта 108-Ф. Для создания коллекции применялись различные методы облучения семян и пыльцы, а также потомство растений с транслокациями и десинапсисом (табл. 1) (Санамьян, 2020). Линия Pima 3-79 вида *G. barbadense* не чувствительна к фотопериоду и высокогомозиготна, так как происходит от удвоенного гаплоида (Endrizzi et al., 1985). Эта линия является генетическим стандартом для вида *G. barbadense* L. в США (Hulse-Kemp et al., 2015), поэтому она использована в качестве родителя-донора замещенной хромосомы (CS) или сегментов хромосом от *G. barbadense* как в США, так и в Узбекистане.

Для получения беккроссных гибридов BC_2F_1 моносомные линии по хромосомам 2, 4, 6, 7, 12 A_t-субгенома и 18, 22 D_t-субгенома беккроссировали моносомными гибридами BC_1F_1(Mo × F_1(Mo × Pima 3-79)), а также монотелосомную линию с нехваткой одного из плеч хромосомы 11 беккроссировали с монотелосомным гибридом BC_1F_1(Telo × F_1(Telo × Pima 3-79)), у которых моносомия и монотелосомия были по тем же хромосомам, что и у исходных анеуплоидов *G. hirsutum*. Все растения исходных линий и гибридов разных поколений круглогодично содержались в теплице Национального университета Узбекистана.

Цитологические анализы. Поведение хромосом изучали в материнских клетках пыльцы (МКП) на стадии метафазы I (MI) и тетрад мейоза. Для этого проводили фиксацию 2–3 мм бутонов в этилово-уксусной смеси (7:3). Затем МКП окрашивали железо-ацетокармином. На временных давленых препаратах на стадии MI учитывали характер конъюгации хромосом. Для анализа стадии тетрад анализировали по три бутона от каждого растения и подсчитывали процент нормальных тетрад от их общего количества. Для анализа фертильности пыльцы утром в день цветения собирали раскрывшиеся цветки, готовили временные ацетокарминовые препараты, которые укладывали в чашки Петри и оставляли в холодильнике на сутки с целью лучшего прокрашивания пыльцевых зерен. Затем анализировали по 10 полей зрения с каждого цветка.

Все цитологические наблюдения проводили с использованием микроскопов AxioScopeA1, Laboval (Carl Zeiss, Германия) и Biomed (Leica, Швейцария) при увеличении объективов 10x, 100x, бинокулярной насадки 1.6x и GF 12.5 × 120 и окуляра 10x. Микрофотографирование выполняли с помощью цифровой фотокамеры Mikroskopkamera AxioCamERc5s. При экспонировании использовали зеленый светофильтр 3С-11-3. Статистическую обработку полученных данных осуществляли согласно Б.А. Доспехову (1985).

Экстракция ДНК и генотипирование. Геномную ДНК выделяли из образцов молодых листьев цитогенетически идентифицированных беккроссных анеуплоидных гибридов BC_2F_1 и молодых проростков гибридных растений (BC_2F_1) методом CTAB (Saha et al., 2015). Геномную ДНК проверяли с помощью электрофореза в 0.9 % агарозе, и разводили ДНК в 15 мкл до рабочей концентрации с применением контрольного раствора HindIII-расщепленной ДНК λ-фага (25 нг/мкл). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 1.0 мкл 10-кратного ПЦР-буфера (с 25 мМ $MgCl_2$), 0.2 мкл БСА, 0.08 мкл НТФ (25 мМ), 0.2 мкл праймеров, 0.1 мкл Taq-полимеразы и 2 мкл ДНК-матрицы. Полимеразную цепную реакцию осуществляли с начальной денатурированной ДНК при 94 °C в течение 2 мин, затем следовали 35 циклов при 94 °C (шаг 1) в течение 20 с, 55 °C (этап 2) в течение 30 с и 72 °C (шаг 2, шаг 3) в течение 50 с. После 35 циклов температура растяжения 72 °C поддерживалась в течение 7 мин. Продукты ПЦР визуализировали в 3.5 % агарозном геле высокого разрешения,

Таблица 1. Моносомные и монотелосомные линии хлопчатника *G. hirsutum* L. цитогенетической коллекции Узбекистана

№ п/п	Номер каталога	Условное обозначение моносомика	Происхождение	Название линии	Моносомия по хромосоме	Размер унивалента
1	233	Mo16	Получен в M_1 после опыления гамма-облученной пыльцой линии Л-458 (доза 25 Гр)	Моносомная линия Mo16	2 A_t-субгеном	Крупный
2	255	Mo38	Получен в M_2 после опыления гамма-облученной пыльцой линии Л-458 (доза 25 Гр)	Моносомная линия Mo38	4 A_t-субгеном	Средний
3	275	Mo58	Получен из потомства десинаптика в M_2 после облучения семян линии Л-458 тепловыми нейтронами (доза 15 Гр)	Моносомная линия Mo58		Средний
4	276	Mo59	Получен из потомства десинаптика в M_2 после облучения семян линии Л-458 тепловыми нейтронами (доза 15 Гр)	Моносомная линия Mo59		Средний
5	277	Mo60	Получен из потомства десинаптика в M_2 после облучения семян линии Л-458 тепловыми нейтронами (доза 15 Гр)	Моносомная линия Mo60		Средний
6	292	Mo75	Получен в M_2 после опыления гамма-облученной пыльцой линии Л-458 (доза 20 Гр)	Моносомная линия Mo75		Средний
7	251	Mo34	Получен в M_2 после опыления гамма-облученной пыльцой линии Л-458 (доза 20 Гр)	Моносомная линия Mo34	6 A_t-субгеном	Крупный
8	309	Mo92	Получен в M_3 после облучения семян линии Л-458 тепловыми нейтронами (доза 27 Гр)	Моносомная линия Mo92		Крупный
9	244	Mo27	Получен в M_2 после опыления гамма-облученной пыльцой линии Л-458 (доза 20 Гр)	Моносомная линия Mo27	7 A_t-субгеном	Средний
10	311	Mo94	Получен в M_3 после опыления гамма-облученной пыльцой линии Л-458 (доза 20 Гр)	Моносомная линия Mo94	12 A_t-субгеном	Крупный
11	265	Mo48	Получен в M_1 после опыления гамма-облученной пыльцой линии Л-458 (доза 25 Гр)	Моносомная линия Mo48	18 D_t-субгеном	Среднемелкий
12	234	Mo17	Получен в M_1 после опыления гамма-облученной пыльцой линии Л-458 (доза 25 Гр)	Моносомная линия Mo17	22 D_t-субгеном	Средний
13	238	Telo21	Выделен в потомстве моносомика, полученного в M_1 после опыления гамма-облученной пыльцой линии Л-458 (доза 15 Гр)	Телосомная линия Telo21	Telo11 A_t-субгеном	Гетероморфный бивалент

окрашивали бромистым этидием и фотодокументировали с помощью системы документирования геля Alpha Imager (Innotech Inc., США).

Пары праймеров к кодоминантным хромосом-специфичным SSR-маркерам были синтезированы в соответствии с работами по генетическому картированию (Dellaporta et al., 1983; Gutiérrez et al., 2009; Saha et al., 2015; Reddy et al., 2020), которые перечислены в Приложении 1[1]. Для каждой хромосомы выбрано в среднем по четыре локуса, полиморфных между Л-458 (*G. hirsutum*) и Pima 3-79 (*G. barbadense*). Результаты электрофореграммы для SSR были оценены как a/b/h, где локус a соответствовал реципиентному L-458, локус b – донорской линии Pima 3-79, а генотип h – дисомному гибриду BC_1F_1 и BC_2F_1. Элиминацию хромосом *G. hirsutum* у моносомного гибрида хлопчатника BC_1F_1 и BC_2F_1 определяли по отсутствию амплификации маркера по хромосомам *G. hirsutum* (материнский) и присутствию только аллель-специфичных продуктов ПЦР *G. barbadense* (отцовский) (Liu et al., 2000). Для всех типов замещений отдельных хромосом в качестве контроля использовали ДНК хромосом-замещенных линий американской цитогенетической коллекции, за исключением хромосомы 2.

[1] Приложения 1–13 см. по адресу: https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2023-27/appx31.pdf

Результаты

Идентификация замещений хромосом *G. barbadense*/*G. hirsutum* у гибридов BC_2F_1 с использованием хромосом-специфичных молекулярно-генетических маркеров

Согласно ранее разработанной нами схеме (Sanamyan et al., 2022), молекулярно-генетический анализ растений BC_2F_1 проводили на стадии проростков до того, как они были пересажены в грунт теплицы для ускоренного выделения моносомиков по хромосомам донорного вида, чтобы с помощью молекулярных маркеров отделить их

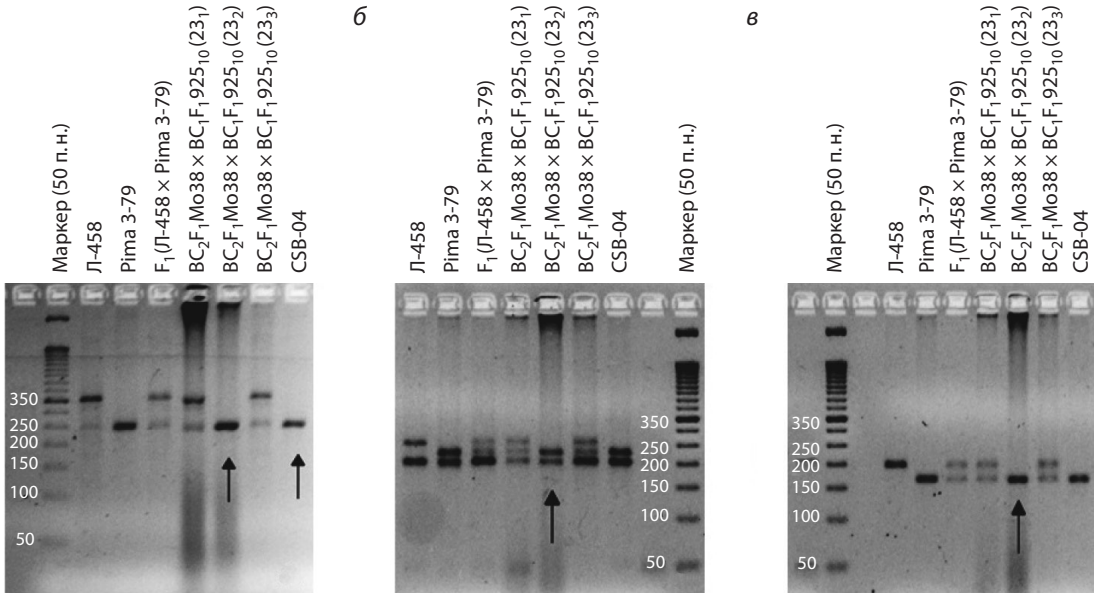


Рис. 1. Электрофореграмма ДНК-ампликонов SSR-маркеров у гибридных проростков BC_2F_1(Mo38 × $BC_1F_1925_{10}$) по хромосоме 4 A_t-субгенома хлопчатника: *а* – Gh107; *б* – Gh117; *в* – TMB0809.

от растений с хромосомами вида-реципиента. Поскольку большинство моносомиков были идентифицированы ранее, только два варианта скрещиваний, BC_2F_1(Mo16 × $BC_1F_1(923_7)$) и BC_2F_1(Mo38 × $BC_1F_1(925_{10})$) были проанализированы на стадии проростков.

Результаты анализа показали пять моносомиков (21_1, 21_2, 21_4, 21_7 и 22_1, где цифры указывают на посевные номера растений) в двух семьях (21*n* и 22*n*, где цифры обозначают посевные номера семей, а буква «*n*» – на разное число растений в семье) в варианте BC_2F_1(Mo16 × $BC_1F_1(923_7)$), где предполагалось замещение хромосомы 2 A_t-субгенома. Эти растения характеризовались присутствием хромосом-специфичных аллелей только от линии Л-458 вида *G. hirsutum*, тогда как аллели вида *G. barbadense* отсутствовали. Поскольку прежде хромосом-специфичные SSR-маркеры, BNL834, BNL3971, TMB0471, JESPR179, были локализованы на хромосоме 2 A_t-субгенома хлопчатника (Gutiérrez et al., 2009; Lacape et al., 2009) (см. Приложения 1–3), полученные данные указали на отсутствие замещения хромосомы 2 у всех пяти беккроссных проростков в варианте BC_2F_1(Mo16 × $BC_1F_1923_7$), что стало негативным результатом этого исследования, поскольку потребовало получения в дальнейшем новых гибридных беккроссных семян и изучения нового BC_2F_1 гибридного потомства.

Один проросток (23_2) с замещением хромосомы 4 был обнаружен в варианте BC_2F_1(Mo38 × $BC_1F_1925_{10}$). Этот гибрид характеризовался присутствием аллелей только от *G. barbadense*, что было выявлено при получении ПЦР-продуктов в результате амплификации с четырьмя хромосом-специфичными SSR-маркерами – BNL2572, Gh107, Gh117, TMB0809 (Hoffman et al., 2007; Gutiérrez et al., 2009) (см. Приложения 1, 2, рис. 1).

Замещение хромосом в других 10 вариантах проведено у ранее цитогенетически изученных моносомиков BC_2F_1. Анализ моносомиков с предполагаемым замещением хромосомы 4 показал амплификацию пяти аллель-специфичных продуктов ПЦР SSR-маркеров, TMB0809, Gh107, Gh117, CIR249, JESPR234, только для *G. barbadense* у моносомика (530_1) из варианта BC_2F_1(Mo58 × $BC_1F_1115_1$), у двух моносомиков, 284_1 и 284_{11}, в варианте BC_2F_1(Mo59 × $BC_1F_1104_4$), у моносомика (494_3) из варианта BC_2F_1(Mo60 × $BC_1F_1117_5$) и у моносомика (496_1) в варианте BC_2F_1(Mo75 × $BC_1F_1298_2$ (см. Приложения 1, 4, 5), что подтвердило замещение хромосом у них.

Анализ моносомика (497_4) в варианте BC_2F_1(Mo34 × $BC_1F_1(293_3)$) и моносомика (499_2) в варианте BC_2F_1(Mo92 × $BC_1F_1(1040_2)$) с предполагаемым замещением хромосомы 6 выявил аллели только от *G. barbadense*, тогда как аллели вида *G. hirsutum* отсутствовали, на что указала локализация 11 хромосом-специфичных SSR-маркеров – BNL1440, BNL3650, BNL2884, BNL1064, BNL3359, TMB1277, TMB0154, TMB0853, TMB1538, Gh039, Gh082 (Gutiérrez et al., 2009) (см. Приложения 1, 5, рис. 2), что подтвердило присутствие замещения этих хромосом.

Молекулярно-генетический анализ двух моносомиков, 500_{11} и 500_{12}, из варианта BC_2F_1(Mo27 × $BC_1F_1(111_2)$) определил только аллели хромосомы 7 от линии Л-458 *G. hirsutum*, тогда как аллели вида *G. barbadense* отсутствовали. Поскольку прежде четыре хромосом-специфичных SSR-маркера, BNL1694, Gh146, TMB0180, TMB0561, были локализованы на хромосоме 7 A_t-субгенома хлопчатника (Hoffman et al., 2007; Guo et al., 2008; Gutiérrez et al., 2009; Saha et al., 2015) (см. Приложения 5, 6), полученные данные указали на отсутствие замещения хромосомы 7 у этих двух моносомиков.

Необходимо подчеркнуть, что замещенные линии CS-B06 и CS-B07 американской цитогенетической коллекции, служившие контролем в нашем исследовании, характеризовались отсутствием замещения хромосом 6 и 7 A_t-субгенома хлопчатника, поскольку у них присутствовали аллели только от вида *G. hirsutum*, тогда как

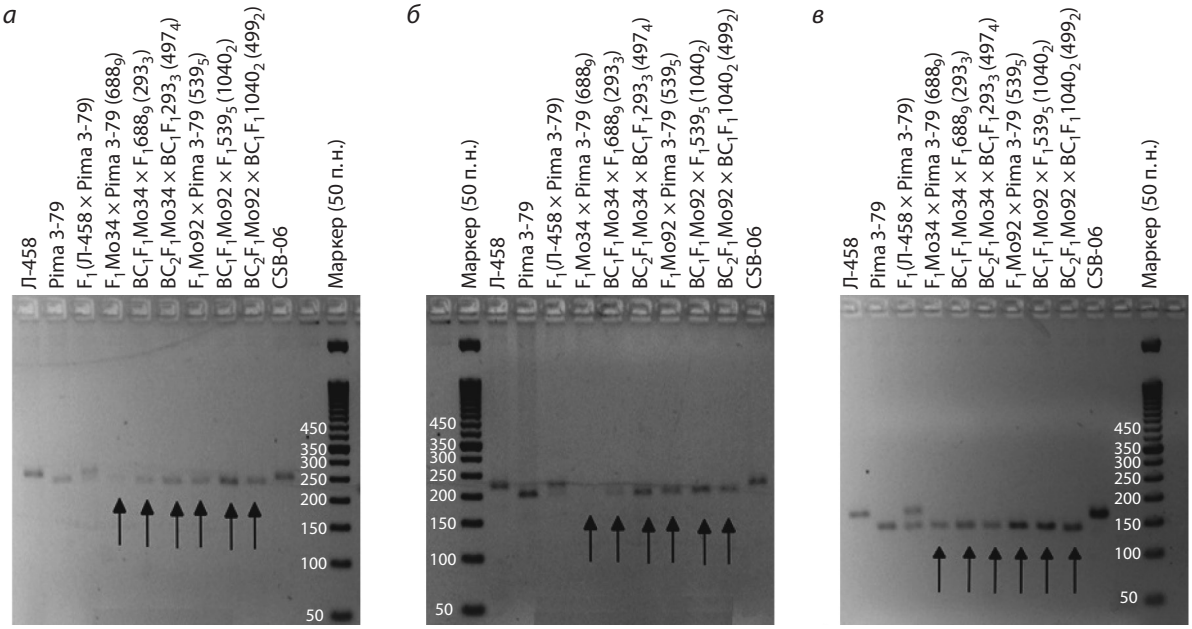


Рис. 2. Электрофореграмма ДНК-ампликонов SSR-маркеров у гибридных моносомных растений (BC_2F_1(Mo34 × BC_1F_1(293_3)) и BC_2F_1(Mo92 × F_1BC_1(1040_2)) по хромосоме 6 A_t-субгенома хлопчатника: *а* – TMB0853; *б* – TMB1538; *в* – Gh082.

от вида *G. barbadense* отсутствовали, как отчетливо видно на рис. 2 и в Приложении 6 соответственно. Однако все другие контроли соответствовали замещениям тех хромосом, по которым проводилось исследование.

У двух моносомиков, 505_4 и 506_2, из варианта BC_2F_1 (Mo94 × $BC_1F_1299_1$) идентифицирована только хромосома 12 A_t-субгенома хлопчатника *G. barbadense* согласно ПЦР-амплификации хромосом-специфичных SSR-маркеров – BNL3261, BNL3835 (Gutiérrez et al., 2009) (см. Приложения 5, 7).

Анализ моносомика (286_{14}) из комбинации BC_2F_1 (Mo48 × $F_1BC_1114_{20}$) показал только аллели хромосомы 18 от *G. hirsutum*, тогда как аллели вида *G. barbadense* отсутствовали. Поскольку прежде восемь хромосом-специфичных SSR-маркеров, BNL193, BNL2544, BNL3280, BNL3479, CIR216, Gh142, TMB0114, TMB1603, были локализованы на хромосоме 18 D_t-субгенома хлопчатника (Reddy et al., 2020) (см. Приложения 5, 8), полученные данные указали на отсутствие замещения этой хромосомы.

Молекулярно-генетический SSR-анализ моносомика (288_1) из варианта BC_2F_1(Mo17 × $F_1BC_1110_1$) выявил присутствие только аллеля от *G. barbadense*, тогда как аллель вида *G. hirsutum* не был обнаружен на основе локализации хромосом-специфичного SSR-маркера BNL673. Так как прежде этот маркер был локализован на хромосоме 22 D_t-субгенома хлопчатника (Gutiérrez et al., 2009), то замещение хромосомы 22 было подтверждено у изученного моносомика (см. Приложения 5, 9).

Молекулярно-генетический анализ двух телоцентриков, 790_2 и 791_1, из варианта BC_2F_1(Telo21 × BC_1F_1(292_1)) показал противоречивые данные, возможно, из-за локализации маркеров на разных плечах хромосомы 11. Поэтому изучение этих монотелосомиков будет продолжено с помощью меченых праймеров, поскольку они показывают более точную их локализацию.

Изучение мейоза у гибридов BC_2F_1 с идентифицированными унивалентами

Анализ конъюгации хромосом на стадии MI мейоза выявил анеуплоидные растения в 12 вариантах гибридного потомства, полученного от скрещиваний моносомных линий вида *G. hirsutum* ЦКХУ с моносомиками BC_1F_1. Так, по два моносомика было изолировано в каждом из трех беккроссов (с участием линий Mo59, Mo27 и Mo94), и по одному моносомику выделено в каждом из оставшихся девяти беккроссных вариантов (с участием Mo16, Mo38, Mo58, Mo60, Mo75, Mo34, Mo92, Mo48 и Mo17) (Приложение 10). К сожалению, мы не смогли продолжить исследования с четырьмя линиями (Mo31, Mo56, Mo42 и Telo12), которые изучали в первом поколении беккроссов, из-за отсутствия завязываемости гибридных коробочек.

Анализ метафазы I мейоза у 15 моносомиков BC_2F_1, где четыре моносомика, 21_1, 500_{11} и 500_{12}, 286_{14}, трех вариантов скрещиваний с унивалентными хромосомами *G. hirsutum* (2, 7 и 18) и 11 других моносомиков восьми других вариантов скрещиваний с унивалентными хромосомами *G. barbadense* (4, 6 и 12) показал, что растения характеризовались модальной для моносомиков хлопчатника конъюгацией хромосом с 25 бивалентами и одним унивалентом (табл. 2). Один моносомик (288_1) из варианта F_1BC_2(Mo17 × $F_1BC_1110_1$) с замещением хромосомы 22 D_t-субгенома выделялся присутствием дополнительных унивалентов (1.94 ± 0.19 в среднем на клетку), которые могли привести к появлению нуллисомных гамет.

У монотелосомиков (790_2 и 791_1) в варианте BC_2F_1 (Telo21 × BC_1F_1(292_1)) в отдельных МКП обнаружены парные униваленты (0.75 ± 0.37 и 1.00 ± 0.41 в среднем на клетку соответственно) наряду с гетероморфными бивалентами. У одного монотелосомика (791_1) также формировался один квадривалент (0.25 ± 0.25 в среднем на клетку) (см. табл. 2).

Табл. 2. Конъюгация хромосом на стадии метафазы I мейоза у анеуплоидных гибридов BC_2F_1, полученных от скрещиваний рекуррентных родителей с межвидовыми анеуплоидными гибридами BC_1F_1(Mo × F_1Mo × Pima 3-79) или BC_1F_1(Telo × F_1Telo × Pima 3-79)

Хромосома	Вариант скрещивания	Номер гибрида	Число изученных МКП	Размер унивалента	В среднем на клетку	
					унивалентов	бивалентов
	Л-458	–	11	–	0	26.00 ± 0.00
	Pima 3-79	–	12	–	0	26.00 ± 0.00
	F_1(Л-458 × Pima 3-79)	680	10	–	0	26.00 ± 0.00
2	BC_2F_1(Mo16 × BC_1F_1(923_7))	21_1	5	Крупный	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
4	BC_2F_1(Mo38 × BC_1F_1(925_{11}))	23_2	30	Средний	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
	BC_2F_1(Mo58 × BC_1F_1(115_1))	530_1	30	Средний	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
	BC_2F_1(Mo59 × BC_1F_1(1041_4))	284_1	26	Средний	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
		284_{11}	11	Средний	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
	BC_2F_1(Mo60 × BC_1F_1(117_4))	494_3	15	Средний	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
	BC_2F_1(Mo75 × BC_1F_1(298_2))	496_1	15	Средний	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
6	BC_2F_1(Mo34 × BC_1F_1(293_3))	497_4	25	Крупный	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
	BC_2F_1(Mo92 × BC_1F_1(1040_2))	499_2	18	Крупный	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
7	BC_2F_1(Mo27 × BC_1F_1(111_2))	500_{11}	15	Средний	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
		500_{12}	13	Средний	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
12	BC_2F_1(Mo94 × BC_1F_1(299_1))	505_4	9	Крупный	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
		506_2	6	Крупный	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
18	BC_2F_1(Mo48 × BC_1F_1(114_1))	286_{14}	14	Мелкий	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
22	BC_2F_1(Mo17 × BC_1F_1(110_1))	288_1	16	Среднемелкий	1.94 ± 0.19	24.75 ± 0.11
Telo11	BC_2F_1(Telo21 × BC_1F_1(292_1))	790_2	8	–	0.75 ± 0.37	25.63 ± 0.18
		791_1*	15	–	1.00 ± 0.41	24.75 ± 0.63

* 0.25 ± 0.25 квадривалентов в среднем на клетку у монотелосомного растения 791_1.

Анализы размера унивалентов у моносомиков BC_2F_1 обнаружили большой размер хромосомы 2 *G. hirsutum* в одной семье BC_2F_1(Mo16 × BC_1F_1(923_7)), хромосомы 6 *G. barbadense* в двух семьях BC_2F_1(Mo34 × BC_1F_1(293_3)) и BC_2F_1(Mo92 × BC_1F_1(1040_2)) (см. рис. 3, *г*), а также хромосомы 12 *G. barbadense* в одной семье BC_2F_1(Mo94 × BC_1F_1(299_1)) (см. рис. 4, *б*). Моносомики BC_2F_1 у пяти семей с хромосомой 4 *G. barbadense* BC_2F_1(Mo38 × BC_1F_1(925_{11})), BC_2F_1(Mo58 × BC_1F_1(115_1)), BC_2F_1(Mo59 × BC_1F_1(1041_4)), BC_2F_1(Mo60 × BC_1F_1(117_4)) и BC_2F_1(Mo75 × BC_1F_1(298_2)) (см. рис. 3, *а–в*) так же, как и с хромосомой 7 *G. hirsutum* BC_2F_1(Mo27 × BC_1F_1(111_2)) (рис. 4, *а*), имели средний размер унивалентов, что подтвердило их принадлежность к A_t-субгеному.

Изучение размера унивалента у растения (288_1) варианта скрещиваний BC_2F_1(Mo17 × BC_1F_1(110_1)) с хромосомой 22 *G. barbadense* обнаружило среднемелкий размер унивалента (см. рис. 4, *г*), а у растения другого варианта – BC_2F_1(Mo48 × BC_1F_1(114_1)) с хромосомой 18 *G. hirsutum* – мелкий размер, который дополнительно подтвердил принадлежность хромосом к D_t-субгеному (см. рис. 4, *в*).

Большинство моносомиков BC_2F_1 проявило высокий мейотический индекс, который свидетельствует, что их унивалентные хромосомы претерпевали регулярное расхождение (Приложение 11). Однако один моносомик в варианте BC_2F_1(Mo34 × BC_1F_1(293_3)) с замещением хромосомы 6 продемонстрировал снижение мейотического индекса (до 83.66 ± 0.62) и увеличение числа тетрад с микроядрами (до 9.23 ± 0.77 %) (рис. 5). Это указало на нарушения в расхождении хромосом и формировании несбалансированных гамет, которые могли привести к смене унивалента в потомстве. Еще пять моносомиков в вариантах BC_2F_1(Mo60 × BC_1F_1(117_4)), BC_2F_1(Mo92 × BC_1F_1(1040_2)), BC_2F_1(Mo94 × BC_1F_1(299_1)) и BC_2F_1(Mo17 × BC_1F_1(110_1)) тоже продемонстрировали небольшое увеличение числа тетрад с микроядрами (от 1.22 ± 0.43 до 1.84 ± 0.37 %), что также могло привести к таким же последствиям (Приложение 12, рис. 5). Сходно с конъюгацией хромосом, мейотический индекс не показал существенных различий между беккроссными моносомиками с присутствием замещений отдельных хромосом или их отсутствием.

Два монотелосомика из семьи BC_2F_1(Telo21 × BC_1F_1 (292_1)) показали увеличение процента тетрад с микроядрами от 2.17 ± 0.30 % (791_1) до 2.32 ± 0.30 % (790_2), которое могло быть следствием нарушения в расхождении телоцентрика и формировании несбалансированных гамет у этих гибридов (см. Приложение 12).

Жизнеспособность пыльцы была оценена у моносомиков BC_2F_1 с помощью окраски ацетокармином. Большинство из них продемонстрировало высокую жизне-

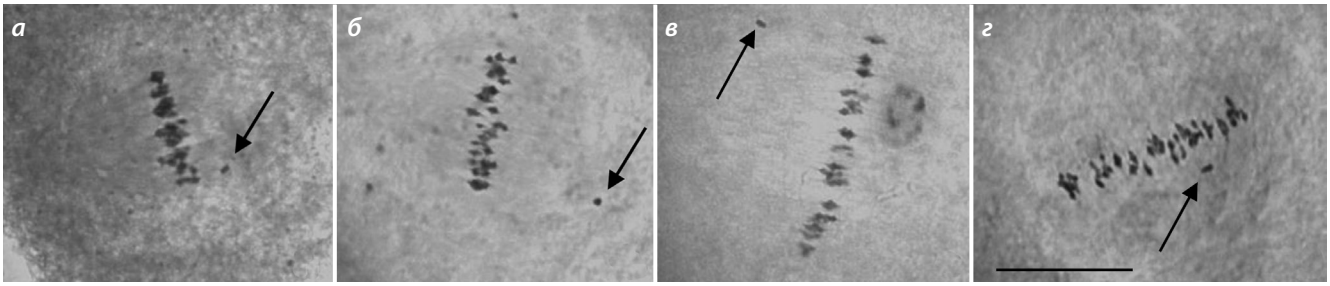


Рис. 3. Конфигурации хромосом в метафазе I мейоза у гибридных растений BC_2F_1, полученных от скрещиваний моносомных линий с межвидовыми моносомными гибридами $BC_1F_1(25^{II}+1^{I})$.

а – BC_2F_1(Mo58 × $BC_1F_1(115_1)$) (530_1); *б* – BC_2F_1(Mo59 × $BC_1F_1(1041_4)$) (284_1); *в* – BC_2F_1(Mo60 × $BC_1F_1(117_5)$) (494_3) ($25^{II}+1^{I}$) с хромосомой 4 *G. barbadense*; *г* – BC_2F_1(Mo34 × $BC_1F_1(293_3)$) (497_4) с хромосомой 6 *G. barbadense*. Здесь и на рис. 4: стрелкой указаны униваленты. Масштабная линейка = 10 мкм.

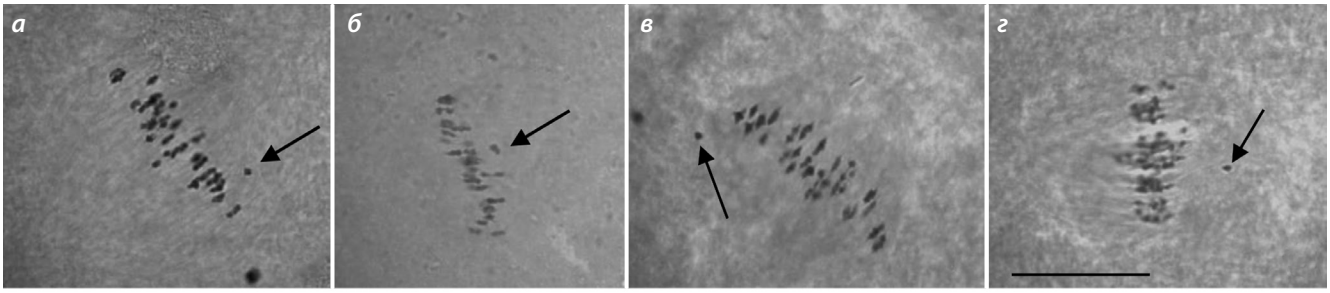


Рис. 4. Конфигурации хромосом в метафазе I мейоза у гибридных растений BC_2F_1, полученных от скрещиваний моносомных линий с межвидовыми моносомными гибридами $BC_1F_1(25^{II}+1^{I})$.

а – BC_2F_1(Mo27 × $BC_1F_1(111_2)$) (500_{12}) с хромосомой 7 *G. hirsutum*; *б* – BC_2F_1(Mo94 × $BC_1F_1(299_1)$) (505_4) с хромосомой 12 *G. barbadense*; *в* – BC_2F_1(Mo48 × $BC_1F_1(114_{20})$) (286_{14}) с хромосомой 18 *G. hirsutum*; *г* – BC_2F_1(Mo17 × $BC_1F_1(110_1)$) (288_1) с хромосомой 22 *G. barbadense*.

способность пыльцы (от 90.22 ± 1.31 до 96.15 ± 0.69 %), сходную с линией Л-458 (90.92 ± 1.15 %) (Приложение 13). Специфически два моносомика (500_{12} и 499_2) в двух вариантах скрещиваний, BC_2F_1(Mo27 × $BC_1F_1(111_2)$) и BC_2F_1(Mo92 × $BC_1F_1(1040_2)$) с хромосомой 7 *G. hirsutum* и с хромосомой 6 *G. barbadense* имели наибольшую редукцию в жизнеспособности пыльцы (70.09 ± 1.57 и 75.00 ± 1.66 % соответственно) (рис. 6), но четыре моносомика показали небольшую редукцию жизнеспособности пыльцы (от 83.20 ± 2.39 до 87.50 ± 1.95 %). Однако в одном варианте BC_2F_1(Mo59 × $BC_1F_1(1041_4)$) два моносомика характеризовались различиями в жизнеспособности пыльцы более 17 %, а в другом, BC_2F_1(Mo27 × $BC_1F_1(111_2)$), эти различия составили более 20 %.

Обсуждение

В последние годы хорошо зарекомендовал себя комплексный анализ чужеродно-дополненных и чужеродно-замещенных линий, включающий морфо-биологический, генетический, цитогенетический и молекулярно-генетический методы (Schneider et al., 2010; Tiwari et al., 2010; Rawat et al., 2011; Garg et al., 2016).

Комплексный подход с использованием дифференциальной С-окраски, флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) и анализа глиадинов в анализах интрогрессивных линий *T. aestivum* × *Ae. columnaris* позволил выявить замещения, дополненные хромосомы или фрагменты отдельных хромосом у 15 линий, тогда как у пяти линий присутствие чужеродного генетического материала не обнаружено (Шишкина и др., 2017). В исследовании интрогрессивных линий, полученных от беккроссов с сортами мягкой пшеницы синтетической формы RS7 (BBAAUS), с помощью С-окраски, FISH, а также ДНК-маркеров выявлены линии с замещением хромосом пшеницы, с перестройками хромосом, однако две линии характеризовались отсутствием чужеродных интрогрессий (Давоян и др., 2019). Стало очевидным, что в исследованиях геномного состава чужеродно замещенных форм крайне необходимо применение комплекса цитологических и молекулярно-генетических методов.

У хлопчатника также были начаты исследования с использованием SSR-маркеров и *in situ* геномной гибридизации (GISH), которые позволили изолировать пять моносомных чужеродных дополненных линий (MAALs) в беккроссном потомстве пентаплоида, полученного от скрещиваний вида *G. hirsutum* с австралийским диплоидным видом *G. australe* F. Muell. (Sarr et al., 2011). Применение у пяти диплоидных видов хлопчатника BAC-FISH зондов позволило успешно идентифицировать отдельные хромосомы и картировать 45S и 5S рДНК на специфических хромосомах пяти видов (Gan et al., 2012). Сравнение цитогенетической карты хромосомы 1 вида *G. herbaceum* L., построенной с помощью BAC-FISH, с генетическими картами хромосомы 1 у видов *G. hirsutum*, *G. arboreum*, *G. raimondii* показало, что большинство идентифицированных клонов BAC располагаются в оди-

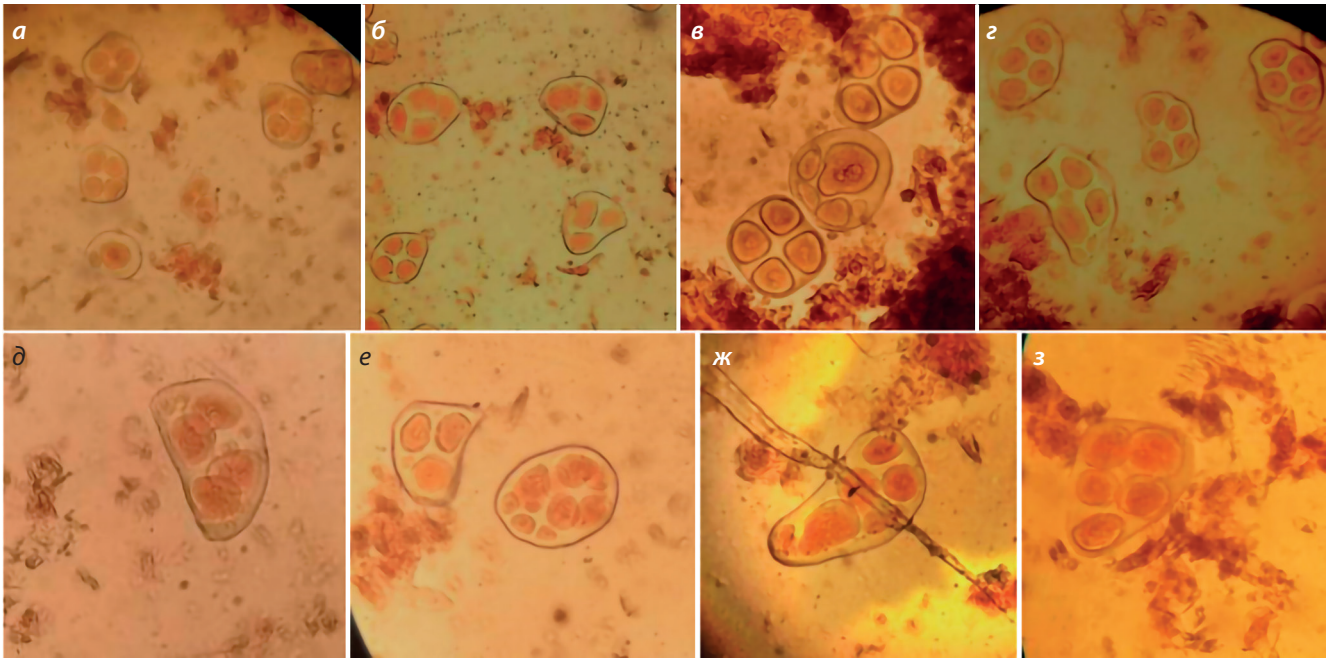


Рис. 5. Спорады у моносомного гибридного растения BC_2F_1(Mo34 × BC_1F_1(293_3)) (497_4): *а* – монада с микроядрами; *б* – триады и тетрады; *в* – монада с микроядрами и тетрады; *г–е* – тетрады с микроядрами; *ж* – пентада с микроядрами; *з* – пентада.

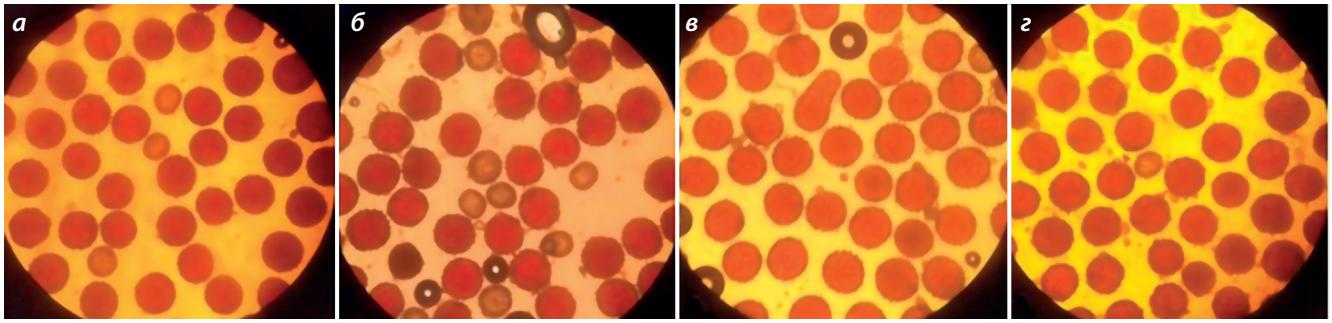


Рис. 6. Фертильная (окрашенная) и стерильная (неокрашенная) пыльца у моносомных гибридов BC_2F_1, полученных от скрещиваний моносомных линий с моносомными гибридами BC_1F_1(Mo × F_1Mo × Pima 3-79): *а, б* – BC_2F_1(Mo75 × $BC_1F_1298_2$) (496_1); *в, г* – F_1BC_2(Mo34 × $F_1BC_1293_3$) (497_4).

наковом порядке на разных картах, за исключением трех маркеров, указывающих на перестройки хромосом (Cui et al., 2015). К сожалению, подобные методы комплексного анализа пока не использованы для изучения хромосом-замещенных линий.

Современные генотипы культивируемого хлопчатника характеризуются ограничением аллелей полезных признаков из-за монофилетического происхождения и образования «генетически узкого горлышка», возникшего во время одомашнивания от общего предка и скрещиваний между однотипными генотипами элитных форм (Saha et al., 2018). Это стимулировало поиск генетического разнообразия среди различных видов хлопчатника.

Создание 17 замещенных линий хлопчатника (CS-B), где каждая гомологичная пара хромосом или хромосомное плечо вида *G. hirsutum* (TM-1) были замещены гомологичной хромосомой или плечом вида *G. barbadense* (Pima 3-79) (Stelly et al., 2005), позволило связать важнейшие признаки качества волокна с отдельной хромосомой или ее плечом (Saha et al., 2004; Jenkins et al., 2006), начать интрогрессию благоприятных генов для улучшения культивируемого хлопчатника (Jenkins et al., 2006, 2007), а также изучать хромосомные эффекты агрономических признаков (выход волокна, масса одной коробочки, урожай хлопка-сырца, урожай волокна) и обработку данных с помощью генетической модели (ADAA) (Saha et al., 2010).

Позже некоторые из этих линий хлопчатника не получили молекулярно-генетического подтверждения (Gutiérrez et al., 2009; Saha et al., 2015; Ulloa et al., 2016). В недавней работе в популяции MAGIC, созданной в результате скрещиваний 18 CS-B линий с тремя сортами хлопчатника Upland были использованы хромосом-специфичные маркеры (SSR). В итоге выяснилось, что те же пять линий (CS-B05sh, CS-B06, CS-B07, CS-B12sh и CS-B15sh), которые были перечислены в предыдущих статьях, содержали «небольшую интрогрессию» или вообще не содержали соответствующей интрогрессии целой хромосомы или участка хромосомы (Fang et al., 2023). Только 13 CS-B ли-

ний имели «значительную интрогрессию» от вида *G. barbadense*, причем причины отсутствия молекулярно-генетического подтверждения у некоторых хромосом-замещенных линий хлопчатника остаются невыясненными.

При создании линий хлопчатника с замещением хромосом *G. barbadense*/*G. hirsutum* отбор растений с необходимым генотипом ускорялся благодаря молекулярно-генетическому тестированию беккроссных растений на стадии проростка (Sanamyan et al., 2022). Это способствовало также продолжению беккроссирования только тех гибридных форм, которые имели нужный генотип. Быстрый отбор растений с необходимым генотипом подчеркивал преимущества использования молекулярных маркеров (SSR) в таких исследованиях.

В настоящей работе с помощью хромосом-специфичных SSR-маркеров в варианте BC_2F_1(Mo16 × $BC_1F_1(923_7)$) у шести проростков с моносомией обнаружены элиминация хромосомы 2 A_t-субгенома *G. barbadense* и присутствие хромосомы 2 A_t-субгенома *G. hirsutum*, тогда как у одного проростка другой семьи BC_2F_1(Mo38 × $BC_1F_1(925_{10})$) выявлено присутствие только хромосомы 4 A_t-субгенома *G. barbadense*, что свидетельствует о замещении хромосом у данного растения. Подтверждение замещений хромосом, проведенное методом молекулярно-генетического анализа у ранее цитогенетически идентифицированных моносомных гибридов BC_2F_1, установлено только по хромосомам 4, 6, 12 A_t-субгенома и хромосоме 22 D_t-субгенома хлопчатника в восьми вариантах, тогда как в двух вариантах, BC_2F_1(Mo27 × $BC_1F_1(111_2)$) и BC_2F_1(Mo48 × $BC_1F_1(114_{20})$), выявлено отсутствие замещения хромосом 7 A_t-субгенома и 18 D_t-субгенома. Следовательно, отсутствие элиминации хромосомы 4 A_t-субгенома *G. barbadense* в пяти изученных беккроссных вариантах (с участием линий Mo38, Mo58, Mo59, Mo60 и Mo75) косвенно указывает на ее преимущественную передачу через гаметы, в то время как элиминация хромосом 7 A_t-субгенома и 18 D_t-субгенома *G. barbadense* уже в первом беккроссном поколении указывает на их неконкурентоспособность в сравнении с гомеологами *G. hirsutum*.

Необходимо подчеркнуть, что наличие ПЦР-продуктов, полученных в результате амплификации только с хромосом-специфичными SSR-маркерами для хромосом 6 и 7 A_t-субгенома *G. hirsutum* у двух линий, CS-B06 и CS-B07, американской цитогенетической коллекции, служивших контролем в нашем исследовании, стало новым подтверждением некорректного определения замещения хромосом 6 и 7 A_t-субгенома, что прежде подчеркивалось другими исследователями (Gutiérrez et al., 2009; Ulloa et al., 2016). В связи с этим выяснение причин отсутствия интрогрессии донорной хромосомы 2 A_t-субгенома вида *G. barbadense* при беккроссировании гибридов представляет большой интерес для будущих исследований.

До настоящего времени причины элиминации донорных хромосом у беккроссных гибридов остаются невыясненными, однако известно, что у пшенично-ржаных линий частота интрогрессии чужеродной хромосомы зависит как от генотипа линии, так и от генотипа сорта, используемого в скрещивании (Красилова и др., 2011). Анализ интрогрессивных линий гибридной пшеницы с *Aegilops columnaris* Zhuk. показал, что процессы интрогрессии зависят от родительского генотипа пшеницы и уровня дивергенции гомеологичных хромосом родительских видов (Badaeva et al., 2018). Низкой компенсационной способностью отличаются хромосомы тех видов, которые в большей степени таксономически отошли от мягкой пшеницы, что могло быть вызвано структурными перестройками. Поскольку у хлопчатника пока не проводились исследования по выяснению причин, влияющих на частоту интрогрессии чужеродной хромосомы, изучение интрогрессивных линий пшеницы может способствовать пониманию сходных процессов у других видов растений.

Это исследование может прояснить в дальнейшем процессы, из-за которых происходит элиминация донорной хромосомы *G. barbadense* при беккроссировании в некоторых вариантах скрещиваний, но уже сегодня известно, что у хромосом D_t-субгенома хлопчатника мелких инверсий меньше, чем у хромосом A_t-субгенома (Chen et al., 2020). Кроме того, у тетраплоидного хлопчатника имеются две реципрокные транслокации, Chr.4/Chr.5 и Chr.2/Chr.3, возникшие после полиплоидизации, которые были подтверждены наличием гомологичных локусов (Wang et al., 2016). На многих хромосомах, исключая хромосомы Chr.1, Chr.6, Chr.10, Chr.11, Chr.14, Chr.16, Chr.21, Chr.22 и Chr.24, обнаружены инверсии. Все вышеперечисленные структурные изменения хромосом тетраплоидного хлопчатника могли способствовать тем затруднениям, которые возникли при интрогрессии гомеологичных хромосом.

Сравнительный анализ конъюгации хромосом у беккроссных моносомиков разных вариантов скрещиваний выявил лишь единичные моносомики с дополнительными унивалентами BC_2F_1(Mo17 × $BC_1F_1(110_1)$), что теоретически могло привести к «смене унивалента» в потомстве. Однако, как показало проведенное исследование, элиминация хромосомы *G. barbadense* в процессе беккроссирования наблюдалась в потомствах других беккроссных гибридов с модальной конъюгацией хромосом, что указало на существование механизма элиминации чужеродной хромосомы, не зависимого от конъюгации хромосом и последующего их расхождения.

Тем не менее ожидалось, что в одном варианте скрещиваний, BC_2F_1(Mo34 × BC_1F_1)) (293_3) у гибридного моносомика (497_4) с модальной конъюгацией хромосом могли произойти какие-либо нарушения в генотипе потомков из-за формирования частично несбалансированных гамет вследствие сниженного мейотического индекса (83.66 ± 0.62) и увеличенного процента тетрад с микроядрами (до 9.23 ± 0.77). Поэтому обнаружение в следующем беккроссном поколении, BC_3F_1(Mo34 × $BC_2F_1497_4$), пяти проростков без замещения хромосомы 6 A_t-субгенома хлопчатника было предсказуемо и указало на исключительность предсказанного события (Санамьян, неопубл.).

Оценка фертильности пыльцы после окраски ацетокармином у анеуплоидных беккроссных растений хлопчатника выявила ее снижение в разных вариантах, что указало на абортацию нуллисомных гамет. Нередко в одних и тех же вариантах скрещиваний моносомные гибриды характеризовались различиями в числе жизнеспособной пыльцы. С другой стороны, объяснить различия в генотипах моносомных гибридов только отличиями в фертильности пыльцы не представляется возможным.

Ранее было показано, что оценка фертильности пыльцы после окраски ацетокармином в потомстве моносомиков хлопчатника является не вполне убедительной в качестве способа разделения моносомных и дисомных растений вследствие абортации несбалансированных микроспор в раннем развитии (Brown, Endrizzi, 1964). Такая оценка указывает на структурную изменчивость геномов межвидовых моносомных гибридов с чужеродным замещением хромосом и без него. Эта изменчивость на уровне поведения хромосом в первом делении мейоза с помощью рутинных методов окраски не обнаруживается, но на уровне жизнеспособности пыльцы четко прослеживается.

Заключение

В настоящей работе показана особенность в интрогрессии индивидуальных хромосом хлопчатника вида *G. barbadense* в геном хлопчатника *G. hirsutum*. Хромосомы 4, 6, 12 A_t-субгенома и 22 D_t-субгенома *G. barbadense* показали преимущественную интрогрессию, по этим хромосомам получены гибриды BC_2F_1 с моносомным замещением *G. barbadense*/*G. hirsutum*. Хромосомы 2, 7 A_t-субгенома и 18 D_t-субгенома *G. barbadense* характеризовались элиминацией, среди них хромосомы 7 A_t-субгенома и 18 D_t-субгенома *G. barbadense* L. элиминировали уже в первом беккроссном поколении.

Список литературы / References

Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян Э.Р., Миков Д.С., Зубанова Ю.С., Болдаков Д.М., Бадаева Е.Д., Адонина И.Г., Салина Е.А., Зинченко А.Н. Создание и изучение интрогрессивных линий мягкой пшеницы, полученных на основе синтетической формы RS7. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(7):827-835. DOI 10.18699/VJ19.556

[Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan E.R., Mikov D.S., Zubanova Yu.S., Boldakov D.M., Badaeva E.D., Adonina I.G., Salina E.A., Zinchenko A.N. The development and study of common wheat introgression lines derived from the synthetic form RS7. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(7):827-835. DOI 10.18699/VJ19.556 (in Russian)]

Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Агропромиздат, 1985

[Dospekhov B.A. Methodology of Field Experience (with the Basics of Statistical Processing of Research Results). Moscow: Agropromizdat Publ., 1985 (in Russian)]

Красилова Н.М., Адонина И.Г., Силкова О.Г., Шумный В.К. Особенности передачи хромосомы ржи 2R при беккроссировании пшенично-ржаных замещенных линий 2R(2D) различными сортами мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2011;15(3):554-562

[Krasilova N.M., Adonina I.G., Silkova O.G., Shumny V.K. Transmission of rye chromosome 2R in backcrosses of wheat-rye 2R(2D) substitution lines to various common wheat varieties. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2011;15(3):554-562 (in Russian)]

Санамьян М.Ф. Цитогенетика мутаций, транслокаций, моносомии и межвидовой гибридизации у хлопчатника. Ташкент: Изд-во «Университет», 2020

[Sanamyan M.F. Cytogenetics of Mutations, Translocations, Monosomy and Interspecific Hybridization in Cotton. Tashkent: University Publ., 2020 (in Russian)]

Санамьян М.Ф., Бобохужаев Ш.У. Идентификация унивалентных хромосом у моносомных линий хлопчатника *Gossypium hirsutum* L. с помощью цитогенетических маркеров. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(7):836-845. DOI 10.18699/VJ19.557

[Sanamyan M.F., Bobokhujayev Sh.U. Identification of univalent chromosomes in monosomic lines of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by means of cytogenetic markers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019; 23(7):836-845. DOI 10.18699/VJ19.557 (in Russian)]

Санамьян М.Ф., Бобохужаев Ш.У., Макамов А.Х., Ачилов С.Г., Абдурахмонов И.Ю. Создание новой серии анеуплоидных линий у хлопчатника (*Gossypium hirsutum* L.) с идентификацией нехваток отдельных хромосом с помощью транслокационных и SSR-маркеров. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016; 20(5):643-652. DOI 10.18699/VJ16.186

[Sanamyan M.F., Bobokhujaev Sh.U., Makamov A.X., Achilov S.G., Abdurakhmonov I.Y. The creation of new aneuploid lines of the cotton (*Gossypium hirsutum* L.) with identification of chromosomes by translocation and SSR markers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(5): 643-652. DOI 10.18699/VJ16.186 (in Russian)]

Силкова О.Г., Добровольская О.Б., Дубовец Н.И., Адонина И.Г., Кравцова Л.А., Родер М.С., Салина Е.А., Щапова А.И., Шумный В.К. Создание пшенично-ржаных замещенных линий с идентификацией хромосомного состава кариотипов методами С-бэндинга, GISH и SSR-маркеров. *Генетика*. 2006;42(6):793-802

[Silkova O.G., Dobrovolskaya O.B., Adonina I.G., Kravtsova L.A., Salina E.A., Shchapova A.I., Shumny V.K., Dubovets N.I., Roeder M.S. Production of wheat-rye substitution lines and identification of chromosome composition of karyotypes using C-banding, GISH, and SSR markers. *Russ. J. Genet*. 2006;42(6):645-653. DOI 10.1134/S1022795406060093]

Силкова О.Е., Добровольская О.Б., Дубовец Н.И., Адонина И.Г., Кравцова Л.А., Щапова А.И., Шумный В.К. Получение пшенично-ржаных замещенных линий на основе озимых сортов ржи с идентификацией кариотипов методами С-бэндинга, GISH и SSR-маркеров. *Генетика*. 2007;43(8):1149-1152

[Silkova O.G., Dobrovolskaya O.B., Dubovets N.I., Adonina I.G., Kravtsova L.A., Shchapova A.I., Shumny V.K. Production of wheat-rye substitution lines based on winter rye cultivars with karyotype identification by means of C-banding, GISH, and SSR markers. *Russ. J. Genet.* 2007;(43)8:957-960. DOI 10.1134/S1022795407080200]

Шишкина А.А., Драгович А.Ю., Рубан А.С., Сибикеев С.Н., Дружин А.Е., Бадаева Е.Д. Разработка генетической классификации хромосом *Aegilops columnaris* Zhuk. *Triticum aestivum* × *Ae. columnaris*. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2017;21(2): 241-249. DOI 10.18699/VJ17.243

[Shishkina A.A., Dragovich A.Yu., Rouban A.S., Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Badaeva E.D. Development of the genetic classification of *Aegilops columnaris* Zhuk. chromosomes based on the analysis of introgression lines *Triticum aestivum* × *Ae. columnaris*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(2):241-249. DOI 10.18699/VJ17.243 (in Russian)]

Anwar M., Iqbal M.Z., Abro A.A., Memon S., Bhutto L.A., Memon S.A., Peng Y. Inter-specific hybridization in cotton (*Gossypium hirsutum*) for crop improvement. *Agronomy.* 2022;12(12):3158. DOI 10.3390/agronomy12123158

Badaeva E.D., Ruban A.S., Shishkina A.A., Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Surzhikov S.A., Dragovich A.Yu. Genetic classification of *Aegilops columnaris* Zhuk. ($2n = 4x = 28$, $U^cU^cX^cX^c$) chromosomes based on FISH analysis and substitution patterns in common wheat × *Ae. columnaris* introgressive lines. *Genome*. 2018;61(2):131-143. DOI 10.1139/gen-2017-0186

Brown M.S., Endrizzi J.E. The origin, fertility and transmission of monosomics in *Gossypium. Am. J. Bot.* 1964;51(1):108-115. DOI 10.2307/2440070

Chen Z.J., Sreedasyam A., Ando A., Song Q., De Santiago L.M., Hulse-Kemp A.M., Ding M., Ye W., Kirkbride R.C., Jenkins J., Plott Ch., Lovell J., Lin Yu-M., Vaughn R., Liu B., Simpson Sh., Scheffler B.E., Wen L., Saski Ch.A., Grover C.E., Hu G., Conover J.L., Carlson J.W., Shu Sh., Boston L.B., Williams M., Peterson D.G., McGee K., Jones D.C., Wendel J.F., Stelly D.M., Grimwood J., Schmutz J. Genomic diversifications of five *Gossypium* allopolyploid species and their impact on cotton improvement. *Nat. Genet*. 2020;52(5):525-533. DOI 10.1038/s41588-020-0614-5

Cui X., Liu F., Liu Yu., Zhou Zh., Zhao Y., Wang C.H., Wang X., Cai X., Wang Y., Meng F., Peng R., Wang K. Construction of cytogenetic map of *Gossypium herbaceum* chromosome 1 and its integration with genetic maps. *Mol. Cytogenet.* 2015;8(1):2. DOI 10.1186/s13039-015-0106-y

Gan Y., Liu F., Peng R., Wang Ch., Li Sh., Zhang X., Wang Yu., Wang K. Individual chromosome identification, chromosomal collinearity and genetic-physical integrated map in *Gossypium darwinii* and four D genome cotton species revealed by BAC-FISH. *Genes Genet. Syst.* 2012;87(4):233-241. DOI 10.1266/ggs.87.233

Dellaporta S.J., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA mini preparation: version II. *Plant Mol. Biol. Rep*. 1983;1(4):19-21. DOI 10.1007/BF02712670

Endrizzi J.E., Turcotte E.L., Kohel R.J. Genetics, cytology and evolution of *Gossypium*. *Adv. Genet.* 1985;23:271-375. DOI 10.1016/S0065-2660(08)60515-5

Fang D.D., Thyssen G.N., Wang M., Jenkins J.N., McCarty J.C., Jones D.C. Genomic confirmation of *Gossypium barbadense* introgression into *G. hirsutum* and a subsequent MAGIC population. *Mol. Genet. Genomics*. 2023;298(1):143-152. DOI 10.1007/s00438-022-01974-3

Garg M., Tsujimoto H., Gupta R.K., Kumar A., Kaur N., Kumar R. Chromosome specific substitution lines of *Aegilops geniculate* alter parameters of bread making quality of wheat. *PLoS One*. 2016;11(10):e0162350. DOI 10.1371/journal.pone.0162350

Guo Yu., Saha S., Yu J.Z., Jenkins J.N., Kohel R.J., Scheffler B.E., Stelly D.M. BAC-derived SSR markers chromosome locations in cotton. *Euphytica.* 2008;161:361-370. DOI 10.1007/s10681-007-9585-1

Gutiérrez O.A., Stelly D.M., Saha S., Jenkins J.N., McCarty J.C., Raska D.A., Scheffler B.E. Integrative placement and orientation of non-redundant SSR loci in cotton linkage groups by deficiency analysis. *Mol. Breeding*. 2009;23:693-707. DOI 10.1007/s11032-009-9266-y

Grover C.E., Arick M.A., Thrash A., Sharbrough J., Hu G., Yuan D., Snodgrass S., Miller E.R., Ramaraj T., Peterson D.G., Udall J.A., Wendel J.F. Dual domestication, diversity, and differential introgression in Old World cotton diploids. *Genome Biol. Evol*. 2022;14(12):evac170. DOI 10.1093/gbe/evac170

Hoffman S.M., Yu J.Z., Grum D.S., Xiao J., Kohel R.J., Pepper A.E. Identification of 700 new microsatellite loci from cotton (*G. hirsutum* L.). *J. Cotton Sci.* 2007;11:208-241

Hulse-Kemp A.M., Lemm J., Plieske J., Ashrafi H., Buyyarapu R., Fang D.D., Frelichowski J., Giband M., Hague S., Hinze L.L., Kochan K.J., Riggs P.K., Scheffler J.A., Udall J.A., Ulloa M., Wang S.S., Zhu Q.H., Bag S.K., Bhardwaj A., Burke J.J., Byers R.L., Claverie M., Gore M.A., Harker D.B., Islam M.S., Jenkins J.N., Jones D.C., Lacape J.M., Llewellyn D.J., Percy R.G., Pepper A.E., Poland J.A., Mohan Rai K., Sawant S.V., Singh S.K., Spriggs A., Taylor J.M., Wang F., Yourstone S.M., Zheng X., Lawley C.T., Ganal M.W., Van Deynze A., Wilson I.W., Stelly D.M. Development of a 63K SNP array for cotton and high-density mapping of intraspecific and interspecific populations of *Gossypium* spp. *G3.* 2015;5(6):1187-1209. DOI 10.1534/g3.115.018416

International Cotton Advisory Committee-ICAC-2019. https://www.researchgate.net/publication/228581277_International_Cotton_Advisory_Committee

International Cotton Advisory Committee-ICAC-2021. https://www.icac.org

Jenkins J.N., Wu J., McCarty J.C., Saha S., Gutiérrez O., Hayes R., Stelly D.M. Genetic effects of thirteen *Gossypium barbadense* L. chromosome substitution lines in top crosses with upland cotton cultivars: I. Yield and yield components. *Crop Sci*. 2006;46(3):1169-1178. DOI 10.2135/cropsci2005.08-0269

Jenkins J.N., McCarty J.C., Wu J., Saha S., Gutierrez O., Hayes R., Stelly D.M. Genetic effects of thirteen *Gossypium barbadense* L. chromosome substitution lines in top crosses with upland cotton cultivars: II. Fiber quality traits. *Crop Sci*. 2007;47(2):561-570. DOI 10.2135/cropsci2006.06.0396

Lacape J.M., Jacobs J., Arioli T., Derijcker R., Forestier C.N., Llewellyn D., Jean J., Thomas E., Viot C. A new interspecific, *Gossypium hirsutum* × *G. barbadense*, RIL population: towards a unified consensus linkage map of tetraploid cotton. *Theor. Appl. Genet.* 2009;119(2):281-292. DOI 10.1007/s00122-009-1037-y

Liu S., Saha S., Stelly D.M., Burr B., Cantrell R.G. Chromosomal assignment of microsatellite loci in cotton. *J. Hered.* 2000;91(4):326-332. DOI 10.1093/jhered/91.4.326

Rawat N., Neelam K., Tiwari V.K., Randhawa G.S., Friebe B., Gill B.S., Dhaliwal H.S. Development and molecular characterization of wheat – *Aegilops kotschyi* addition and substitution lines with high grain protein, iron, and zinc. *Genome.* 2011;54(11):943-953. DOI 10.1139/G11-059

Reddy K.R., Bheemanahalli R., Saha S., Singh K., Lokhande S.B., Gajanayake B., Read J.J., Jenkins J.N., Raska D.A., Santiago L.M., Hulse-Kemp A.M., Vaughn R.N., Stelly D.M. High-temperature and drought-resilience traits among interspecific chromosome substitution lines for genetic improvement of upland cotton. *Plants.* 2020;9(12):1747. DOI 10.3390/plants9121747

Saha S., Wu J., Jenkins J.N., McCarty J.C. Jr., Gutierrez O.A., Stelly D.M., Percy R.G., Raska D.A. Effect of chromosome substitutions from *Gossypium barbadense* L. 3-79 into *G. hirsutum* L. TM-1 on agronomic and fiber traits. *J. Cotton Sci.* 2004;8(3):162-169

Saha S., Raska D.A., Stelly D.M. Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) × Hawaiian cotton (*G. tomentosum* Nutt. ex Seem.) F_1 hybrid hypoaneuploid chromosome substitution series. *J. Cotton Sci*. 2006;10(4):263-272

Saha S., Wu J., Jenkins J.N., McCarty J.C., Hayes R., Stelly D.M. Genetic dissection of chromosome substitution lines of cotton to discover novel *Gossypium barbadense* L. alleles for improvement of agronomic traits. *Theor. Appl. Genet*. 2010;120(6):1193-1205. DOI 10.1007/s00122-009-1247-3

Saha S., Raska D.A., Stelly D.M., Manchali Sh., Gutierrez O.A. Hypoaneuploid chromosome substitution F_1 hybrids of *Gossypium hirsutum* L. × *G. mustelinum* Miers ex Watt. *J. Cotton Sci*. 2013;17(2):102-114

Saha S., Stelly D.M., Makamov A.K., Ayubov M.S., Raska D., Gutiérrez O.A., Shivapriya M., Jenkins J.N., Dewayne D., Abdurakhmonov I.Y. Molecular confirmation of *Gossypium hirsutum* chromosome substitution lines. *Euphytica.* 2015;205:459-473. DOI 10.1007/s10681-015-1407-2

Saha S., Jenkins J.N., McCarty J.C., Hayes R.W., Stelly D.M., Campbell B.T. Registration of two CS-B17-derived Upland cotton recombinant inbred lines with improved fiber micronaire. *J. Plant Regist.* 2018;12(1):97-100. DOI 10.3198/jpr2015.09.0061crg

Saha S., Bellaloui N., Jenkins J.N., McCarty J.C., Stelly D.M. Effect of chromosome substitutions from *Gossypium barbadense* L., *G. tomentosum* Nutt. ex Seem and *G. mustelinum* Watt into *G. hirsutum* L. on cotton seed protein and oil content. *Euphytica*. 2020;216:118. DOI 10.1007/s10681-020-02644-4

Sanamyan M.F., Petlyakova J., Rakhmatullina E.M., Sharipova E. Cytogenetic collection of Uzbekistan. In: Abdurakhmonov I.Y. (Ed.). World Cotton Germplasm Resources. InTech, 2014;247-287. DOI 10.5772/58589

Sanamyan M.F., Makamov A.K., Bobokhujaev Sh.U., Usmonov D.E., Buriev Z.T., Saha S., Stelly D.M. The Utilization of translocation

lines and microsatellite markers for the identification of unknown cotton monosomic lines. In: Abdurakhmonov I.Y. (Ed.). Cotton Research. InTech, 2016;167-183. DOI 10.5772/64558

Sanamyan M.F., Bobokhujaev Sh.U., Abdukarimov Sh.S., Makamov Kh.A., Silkova O.G. Features of chromosome introgression from *Gossypium barbadense* L. into *G. hirsutum* L. during the development of alien substitution lines. *Plants.* 2022;11(4):542. DOI 10.3390/plants11040542

Sarr D., Lacape J.-M., Rodier-Goud M., Jacquemi N.J.-M., Benbouza H., Toussaint A., Palm R., Ahoton L., Baudoin J.-P., Mergeai G. Isolation of five new monosomic alien addition lines of *Gossypium australe* F. Muellin *G. hirsutum* L. by SSR and GISH analyses. *Plant Breed*. 2011;130(1):60-66. DOI 10.1111/j.1439-0523.2010.01819.x

Schneider A., Molnár I., Molnár-Láng M. Utilisation of *Aegilops* (goatgrass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. *Euphytica.* 2008;163(1):1-19. DOI 10.1007/s10681-007-9624-y

Schneider A., Molnár I., Molnár-Láng M. Selection of U and M genome-specific wheat SSR markers using wheat–*Aegilops biuncialis* and wheat–*Ae. geniculate* addition lines. *Euphytica.* 2010;175:357-364. DOI 10.1007/s10681-010-0180-5

Shchapova A., Kravtsova L. The production of wheat-rye substitution lines by using the Giemsa staining technique. *Cereal Res. Commun.* 1982;10(1-2):33-39

Si Z., Chen H., Zhu X., Cao Z., Zhang T. Genetic dissection of lint yield and fiber quality traits of *G. hirsutum* in *G. barbadense* background. *Mol. Breed*. 2017;37:9. DOI 10.1007/s11032-016-0607-3

Stelly D.M., Saha S., Raska D.A., Jenkins J.N., McCarty J.C. Jr., Gutiérrez O.A. Registration of 17 upland (*Gossypium hirsutum*) cotton germplasm lines disomic for different *G. barbadense* chromosome or arm substitutions. *Crop Sci*. 2005;45(6):2663-2665. DOI 10.2135/cropsci2004.0642

Tiwari V.K., Rawat N., Neelam K., Kumar S., Randhawa G.S., Harcharan S.D. Substitutions of 2S and 7U chromosomes of *Aegilops kotschyi* in wheat enhance grain iron and zinc concentration. *Theor. Appl. Genet.* 2010;121(2):259-269. DOI 10.1007/s00122-010-1307-8

Ulloa M., Wang C., Saha S., Hutmacher R.B., Stelly D.M., Jenkins J.N., Burke J., Roberts P.A. Analysis of root-knot nematode and fusarium wilt disease resistance in cotton (*Gossypium* spp.) using chromosome substitution lines from two alien species. *Genetica.* 2016;144(2):167-179. DOI 10.1007/s10709-016-9887-0

Wang B., Liu L., Zhang D., Zhuang Zh., Guo Hui., Qiao Xin., Wei L., Rong J.O., May L., Paterson A.H., Chee P.W. A genetic map between *Gossypium hirsutum* and the Brazilian endemic *G. mustelinum* and its application to QTL mapping. *G3.* 2016;6(6):1673-1685. DOI 10.1534/g3.116.029116

Wendel J.F., Brubaker C.L., Alvarez I., Cronn R., Stewart J.M. Evolution and natural history of the cotton genus. In: Paterson A.H. (Ed.). Genetics and Genomics of Cotton, Plant Genetics and Genomics: Crops and Models. Vol. 3. New York: Springer, 2009;3-22. DOI 10.1007/978-0-387-70810-2_1

Zhang J., Percy R.G., McCarty J.C. Introgression genetics and breeding between Upland and Pima cotton: a review. *Euphytica*. 2014;98:1-12. DOI 10.1007/s10681-014-1094-4

ORCID
O.G. Silkova orcid.org/0000-0003-3299-2975

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства высшего образования, науки и инноваций Республики Узбекистан в рамках проекта Ф-ОТ-2021-155.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 27.01.2023. После доработки 29.09.2023. Принята к публикации 29.09.2023.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023;27(8):971-979
DOI 10.18699/VJGB-23-112

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

Инактивация компонентов комплекса TIM приводит к снижению уровня импорта ДНК в митохондрии арабидопсиса

Т.А. Тарасенко[1], К.Д. Елизова[1], В.И. Тарасенко[1] ✉, М.В. Кулинченко[1, 2], Ю.М. Константинов[1]

[1] Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия
[2] Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, Казань, Россия
✉ vslav@inbox.ru

Аннотация. Феномен импорта ДНК в митохондрии показан для всех основных групп эукариот. В растениях и животных импорт ДНК, по-видимому, происходит различными путями. Известно, что в растительные органеллы нуклеиновые кислоты попадают по альтернативным каналам в зависимости от размера импортируемых молекул. Импорт ДНК небольшого размера (до 300 п. н.) частично перекрывается с механизмом импорта тРНК, по крайней мере, на уровне внешней мембраны. Примечательно, что у растений в импорт тРНК вовлечены компоненты аппарата импорта белков, чья роль в транспорте ДНК до настоящего времени оставалась неизученной. В настоящей работе мы провели исследование роли отдельных компонентов транслоказы внутренней мембраны TIM в процессе импорта ДНК в изолированные митохондрии арабидопсиса и их возможной связи с порином VDAC1. С использованием нокаут-мутантов по генам, кодирующим изоформы белков Tim17 или Tim23, мы впервые показали участие этих белков в импорте фрагментов ДНК разной длины. Кроме того, ингибирование транспортных каналов специфическими антителами к VDAC1 приводило к снижению уровня импорта ДНК в митохондрии дикого типа, что позволило установить специфическое участие этой изоформы порина в импорте ДНК. В нокаут-мутанте *tim17-1* происходило дополнительное снижение эффективности импорта ДНК в присутствии антител к VDAC1 в сравнении с линией дикого типа. Полученные результаты указывают на участие белков Tim17-1 и Tim23-2 в аппарате импорта ДНК в растительные митохондрии. При этом Tim23-2 может быть частью канала, формируемого при участии VDAC1, в то время как Tim17-1, по-видимому, вовлечен в альтернативный, независимый от VDAC1, путь импорта ДНК. Выявление мембранных белков-переносчиков, участвующих в различных путях импорта ДНК, позволит использовать природную способность митохондрий к поглощению ДНК в качестве удобного биотехнологического инструмента для трансформации митохондриального генома.
Ключевые слова: митохондрии; импорт ДНК; Tim17; Tim23; VDAC1; транспортный канал; нокаут-мутант; *Arabidopsis thaliana*.

Для цитирования: Тарасенко Т.А., Елизова К.Д., Тарасенко В.И., Кулинченко М.В., Константинов Ю.М. Инактивация компонентов комплекса TIM приводит к снижению уровня импорта ДНК в митохондрии арабидопсиса. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(8):971-979. DOI 10.18699/VJGB-23-112

Inactivation of the TIM complex components leads to a decrease in the level of DNA import into *Arabidopsis* mitochondria

T.A. Tarasenko[1], K.D. Elizova[1], V.I. Tarasenko[1] ✉, M.V. Koulintchenko[1, 2], Yu.M. Konstantinov[1]

[1] Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia
[2] Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia
✉ vslav@inbox.ru

Abstract. The phenomenon of DNA import into mitochondria has been shown for all major groups of eukaryotes. In plants and animals, DNA import seems to occur in different ways. It has been known that nucleic acids enter plant organelles through alternative channels, depending on the size of the imported molecules. Mitochondrial import of small DNA (up to 300 bp) partially overlaps with the mechanism of tRNA import, at least at the level of the outer membrane. It is noteworthy that, in plants, tRNA import involves components of the protein import apparatus, whose role in DNA transport has not yet been studied. In this work, we studied the role of individual components of the TIM inner membrane translocase in the process of DNA import into isolated *Arabidopsis* mitochondria and their possible association with the porin VDAC1. Using knockout mutants for the genes encoding Tim17 or Tim23 protein isoforms, we demonstrated for the first time the involvement of these proteins in the import of DNA fragments of different lengths. In addition, inhibition of transport channels with specific antibodies to VDAC1 led to a decrease in the level of DNA import into wild-type mitochondria, which made it possible to establish the specific involvement of this porin isoform in DNA import. In the *tim17-1* knockout mutant, there was an additional decrease in the efficiency of DNA import in the presence of antibodies to VDAC1 compared to the wild type line. The results obtained indicate the involvement of the Tim17-1 and Tim23-2 proteins in the mechanism of DNA import into plant mitochondria. At the same time, Tim23-2 may be part of the channel formed with the participation of VDAC1, while Tim17-1, apparently, is involved in an alterna-

© Тарасенко Т.А., Елизова К.Д., Тарасенко В.И., Кулинченко М.В., Константинов Ю.М., 2023
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

tive DNA import pathway independent of VDAC1. The identification of membrane carrier proteins involved in various DNA import pathways will make it possible to use the natural ability of mitochondria to import DNA as a convenient biotechnological tool for transforming the mitochondrial genome.
Key words: mitochondria; DNA import; Tim17; Tim23; VDAC1; transport channel; knock-out mutant; *Arabidopsis thaliana*.

For citation: Tarasenko T.A., Elizova K.D., Tarasenko V.I., Koulintchenko M.V., Konstantinov Yu.M. Inactivation of the TIM complex components leads to a decrease in the level of DNA import into *Arabidopsis* mitochondria. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(8):971-979. DOI 10.18699/VJGB-23-112

Введение

Митохондрии – двумембранные органеллы аэробных эукариот, которые отвечают за энергетическое обеспечение клетки и обладают собственной генетической системой. Митохондриальная ДНК (мтДНК), представляющая собой наследие эндосимбиотического события (Martin et al., 2015), кодирует рРНК, тРНК, рибосомальные белки и белки окислительного фосфорилирования (Morley, Nielsen, 2017). Способность модифицировать митохондриальный геном может стать удобным инструментом для внесения направленных изменений в мтДНК с целью получения растений с ценными сельскохозяйственными характеристиками и решения вопросов генно-терапевтического лечения митохондриальных заболеваний человека.

Методология трансформации митохондрий экзогенной ДНК находится на начальных стадиях развития (Larosa, Remacle, 2013), поскольку пока не найдено эффективных способов манипуляции митохондриальным геномом с помощью направленной доставки молекул нуклеиновых кислот. Одним из перспективных подходов к трансформации митохондриального генома может стать манипуляция процессом импорта ДНК – природной способностью митохондрий поглощать ДНК из внешней среды.

Феномен импорта ДНК первоначально был продемонстрирован для растений (Koulintchenko et al., 2003; Konstantinov et al., 2016), но в дальнейшем описан для митохондрий млекопитающих (Koulintchenko et al., 2006) и дрожжей (Weber-Lotfi et al., 2009). Следует отметить, что до настоящего момента нет полного понимания того, как осуществляется трансмембранный перенос ДНК в митохондриальный матрикс. По-видимому, в растениях и у млекопитающих импорт ДНК происходит различными путями (Koulintchenko et al., 2006). Более того, в растительных митохондриях перенос ДНК может совершаться посредством нескольких альтернативных механизмов при участии разнообразных белковых комплексов (Weber-Lotfi et al., 2015; Tarasenko et al., 2021).

На уровне внешней мембраны импорт ДНК в митохондрии растений происходит с участием порина (VDAC, от англ. *voltage-dependent anion channel*) (Koulintchenko et al., 2003). Роль VDAC показана также и в импорте тРНК (Salinas-Giegé et al., 2015) – клеточном процессе, обеспечивающем функционирование генетической системы этих органелл (Morley, Nielsen, 2017). В клетках растений присутствует несколько изоформ VDAC (Tateda et al., 2011), в частности у *Arabidopsis thaliana* существует четыре функциональные изоформы (Tateda et al., 2011), выполняющие различные роли. Так, белок VDAC1 более важен для роста растений и их устойчивости к болезням (Tateda et al., 2011), в то время как VDAC3, по-видимому, вовлечен в ответную реакцию на стресс (Hemono et al., 2020). На основании данных об интенсивности связывания отдельных изоформ VDAC с тРНК предполагают, что из четырех изоформ арабидопсиса именно VDAC4 вовлечена в импорт тРНК в митохондрии (Hemono et al., 2020).

Дифференциальное взаимодействие поринов митохондрий с тРНК свойственно и другим растениям. Так, у картофеля из двух мажорных изоформ, по-видимому, только VDAC34 участвует в импорте тРНК, поскольку именно для этой изоформы показано образование прочной связи с молекулой тРНК (Salinas et al., 2014). Изоформы VDAC арабидопсиса потенциально могут иметь специализацию также и в транспорте ДНК в зависимости от длины импортируемых молекул (Tarasenko et al., 2021). В линиях арабидопсиса, лишенных VDAC1, VDAC2 или VDAC4, происходило усиление импорта ДНК на фоне активации экспрессии VDAC3, что могло быть частью клеточного механизма, направленного на компенсацию отсутствия транспортного белка митохондриальной мембраны.

На уровне внутренней мембраны митохондрий импорт ДНК небольшого размера (до 300 п. н.) может происходить с участием переносчиков адениновых нуклеотидов (ADNT1), АТФ-Mg/Pi (APC) (Tarasenko et al., 2021) и/или переносчика фосфата MPT (Weber-Lotfi et al., 2015). В импорте ДНК среднего размера (400–7000 п. н.) участвует переносчик аденин-нуклеотидов AAC (англ. *ADP/ATP carrier*) (Koulintchenko et al., 2003). Участие CuBP, субъединицы дыхательного комплекса I, в переносе ДНК среднего и большого размера (Weber-Lotfi et al., 2015), по всей видимости, связано со стабилизацией канала, через который транспортируются более крупные молекулы.

Методом конкурентного ингибирования было показано вероятное пересечение путей импорта тРНК и ДНК небольшого размера (Weber-Lotfi et al., 2015), что неудивительно, учитывая участие VDAC в импорте как тРНК (Salinas et al., 2006), так и ДНК (Koulintchenko et al., 2003; Tarasenko et al., 2021). Примечательно, что у растений в процесс импорта тРНК вовлечены также и компоненты аппарата импорта белков (Verechshagina et al., 2018). Этот факт указывает на наличие мультифункциональных свойств у некоторых мембранных транспортеров растительных митохондрий. Исходя из этих данных, логично предположить, что компоненты белковых комплексов, участвующих в протекающих в митохондриях растений процессах транслокации тРНК и/или белков, могут быть вовлечены и в механизм импорта ДНК.

Наиболее очевидным кандидатом на роль мультифункционального транспортера представляется комплекс TIM, известный также как TIM17:23, отвечающий за перенос белков в митохондриальный матрикс. Этот мембранный комплекс непосредственно связан в единый канал с транслоказой белков внешней митохондриальной мембраны

TOM (от англ. *translocase of the outer membrane*), отдельные компоненты которой принимают участие в импорте тРНК у растений (Salinas et al., 2006).

Транслоказа внутренней мембраны TIM17:23, один из наиболее крупных белковых комплексов митохондрий, состоит из двух главных субъединиц – Tim17 и Tim23. Эти белки закреплены во внутренней мембране четырьмя трансмембранными спиралями, формирующими транслокационный канал (Ryan et al., 1998; Truscott at al., 2001). Известно, что субъединица Tim23 ответственна за образование поры, а Tim17 – за стабилизацию и регуляцию этой поры (Verechshagina et al., 2018). В растениях арабидопсиса для каждого из этих компонентов характерно наличие трех изоформ (Murcha et al., 2007), однако степень участия их в импорте белка, по-видимому, различна, что указывает на их потенциальную роль в других клеточных процессах.

Известно, что в комплексе TIM17:23 преобладает субъединица Tim23-2, для которой характерен наиболее высокий уровень экспрессии во всех тканях (Murcha et al., 2003). Учитывая высокую степень гомологии изоформ Tim23, указывающую на их потенциально взаимозаменяемые свойства, нельзя исключать наличие у преобладающей изоформы Tim23-2 мультифункциональной роли в клеточных процессах, подобно тому, как это было установлено для главных компонентов комплекса TOM (Salinas-Giegé et al., 2015). Субъединица Tim23-2 примечательна еще и тем, что присутствует, помимо TIM17:23, в дыхательном комплексе I (Murcha et al., 2005; Wang et al., 2012). Субъединица Tim23-3, напротив, обладает низким уровнем экспрессии, при этом в наибольшей степени отличаясь по последовательности от двух других изоформ (Murcha et al., 2007), что может указывать на выполнение этим белком дополнительных функций.

Наиболее распространенной изоформой белка Tim17 арабидопсиса является Tim17-2, для которой характерен стабильно высокий уровень экспрессии на протяжении всего развития. Довольно высокой (75 %) степенью сходства с Tim17-2 обладает изоформа Tim17-1 (Wang et al., 2014). Следует отметить, что к настоящему моменту не существует однозначного ответа на вопрос о роли Tim17-1 в растениях (Wang et al., 2014). В отличие от Tim17-2, изоформе Tim17-1 свойственны изменения уровня экспрессии в зависимости от стадии развития, с наиболее выраженным повышением на этапе развития семян, но постепенным снижением по мере развития (Wang et al., 2014). Очевидно, что во взрослом растении импорт белков обеспечивают преобладающие изоформы, в то время как минорный Tim17-1 потенциально может специализироваться на выполнении функций, не связанных с биогенезом митохондрий.

В нашей работе показано, что белки Tim23-2 и Tim17-1 принимают участие в трансмембранном переносе ДНК в митохондриальный матрикс, при этом Tim23-2, по-видимому, отвечает за импорт исключительно фрагментов малой длины. Кроме того, как оказалось, изоформа порина VDAC1 непосредственно вовлечена в процесс импорта ДНК и, вероятно, является частью канала, формируемого при участии белка Tim23-2. Полученные данные открывают перспективы для дальнейших исследований роли компонентов транслоказы внутренней мембраны белков в импорте нуклеиновых кислот в митохондрии.

Материалы и методы

Растительный материал и условия выращивания. В работе использованы растения арабидопсиса дикого типа *A. thaliana* (L.) Heynh. экотип Columbia (Col-0) и линии инсерционных мутантов GABI_689C11 (*tim23-2*, ген At1g72750), SALK_129386 (*tim23-3*, ген At3g04800) и SALK_092885 (*tim17-1*, ген At1g20350), семена которых были предоставлены M. Murcha (ARC Centre of Excellence in Plant Energy Biology, Perth, Australia). Семена подвергали стратификации в течение трех суток при 4 °C и затем выращивали при 22 °C в ростовой камере KBW720 (Binder, Германия) в горшках, наполненных смесью компост/вермикулит в соотношении 2:1 при плотности потока фотосинтетических фотонов 150 мкмоль · $м^{-2}$ · $с^{-1}$ и 16-часовом фотопериоде.

Получение субстратов импорта ДНК. Для амплификации ДНК использовали Taq-полимеразу (Thermo Scientific, США) в соответствии с рекомендациями изготовителя. В качестве ПЦР-матрицы взяли генетическую конструкцию pCK/GFP/PRmt (Koulintchenko et al., 2003), содержащую последовательность гена *GFP*.

Амплификацию фрагментов ДНК длиной 2732 п. н. (Forward: 5′-CCAACCACCACATACCGAAA-3′; Reverse: 5′-ACGCTCTGTAGGATTTGAACC-3′) и 265 п. н. (Forward: 5′-ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACT-3′; Reverse: 5′-CGGGGCATGGCACTCTTGA-3′) проводили с применением специфических пар праймеров, захватывающих последовательность гена *GFP*, при температуре отжига 60 °C. ДНК очищали на колонках GeneJET™PCR Purification Kit (Thermo Scientific) согласно инструкции производителя. Качество ПЦР-продуктов оценивали электрофоретически с использованием Gel Doc XR System (Bio-Rad, США), количество ДНК определяли с помощью спектрофотометра NanoPhotometer NP80 (IMPLEN, Германия).

Выделение митохондрий. Грубый митохондриальный экстракт получали из трехнедельных растений *A. thaliana* согласно описанному ранее протоколу (Sweetlove et al., 2007) методом дифференциального центрифугирования. Очищенную митохондриальную фракцию получали путем разделения грубой фракции митохондрий в ступенчатом градиенте плотности перколла (50–28–20 %) в течение 40 мин при 40000 g. Суспензию митохондрий отбирали на границе слоев с 50 и 28 % концентрацией перколла.

Импорт субстратов ДНК в митохондрии арабидопсиса *in organello*. Импорт ДНК проводили как описано ранее (Tarasenko et al., 2019). К 200 мкл буфера импорта (0.4 М сахарозы, 40 мМ фосфата калия, pH 7.0), содержащего 500 нг ДНК, добавляли 200 мкг очищенных митохондрий, затем инкубировали при 25 °C в течение 30 мин. Обработку митохондрий ДНКазой I (1 ед/мкл) (Thermo Scientific) выполняли в 100 мкл буфера импорта в присутствии 10 мМ $MgCl_2$ в течение 20 мин при 25 °C. Затем пробы подвергали отмывке в среде промывания, содержащей дополнительно 10 мМ ЭДТА и 10 мМ ЭГТА, и осуществляли экстракцию мтДНК для дальнейшего анализа эффективности импорта ДНК. В качестве контроля

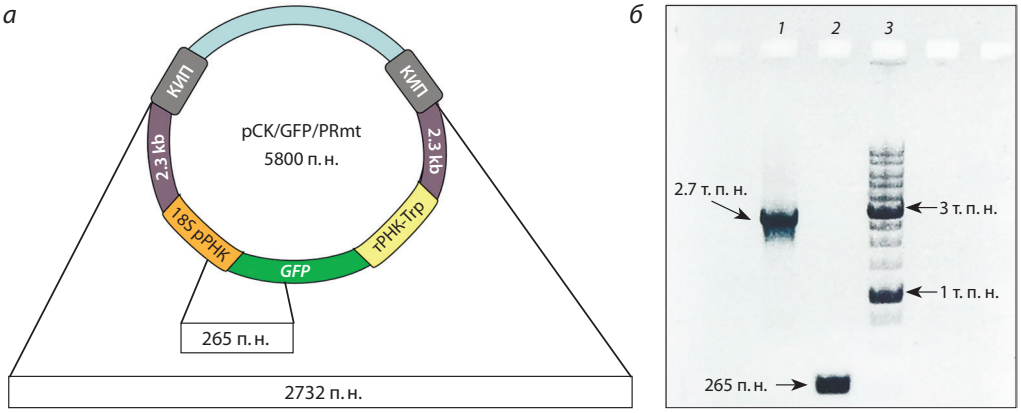


Рис. 1. ДНК-субстраты, использованные для импорта в митохондрии арабидопсиса.

а – схема генетической конструкции pCK/GFP/PRmt (Koulintchenko et al., 2003), которая служила матрицей для синтеза субстратов импорта ДНК. 2.3 kb – последовательность плазмиды 2.3 т. п. н. из митохондриального генома *Zea mays*; КИП – концевые инвертированные повторы плазмиды 11.6 т. п. н. из мт-генома *Brassica rapa*; *б* – электрофоретический анализ ДНК-субстратов импорта (200 нг каждого), полученных на основе pCK/GFP/PRmt. *1* – 2732 п. н.; *2* – 265 п. н., *3* – маркер молекулярного веса ДНК.

эффективности работы ДНКазы использовали пробу без добавления митохондрий. Уровень фонового сигнала, полученного с такой пробы, всегда был как минимум на два порядка ниже уровня сигнала с проб импорта.

Получение протопластов, трансфекция их ДНК и выделение митохондрий. Протопласты получали из листьев *A. thaliana* согласно описанному ранее протоколу (Wu et al., 2009) с модификациями (Tarasenko et al., 2019). В суспензию выделенных и очищенных протопластов вносили раствор ДНК-субстрата (5 мкг), после чего к пробам добавляли 300 мкл раствора, содержащего 20 % PEG-2000, 0.2 M маннитол, 100 мМ $CaCl_2$. Протопласты инкубировали в течение 5 мин, затем суспензию протопластов подвергали трем циклам центрифугирования в 1.5 мл среды промывания в течение 1 мин при 100 g и 20 °C. Дальнейшую инкубацию протопластов проводили в среде W5 (154 мМ NaCl, 125 мМ $CaCl_2$, 5 мМ KCl, 5 мМ глюкозы, 2 мМ MES, pH 5.7) при 22 °C и слабом освещении в течение 20 ч. Суспензию протопластов центрифугировали в течение 1 мин при 100 g и 20 °C и выделяли митохондрии, как описано ранее (Tarasenko et al., 2019).

Анализ импорта ДНК. Количество импортированной в митохондрии ДНК определяли методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с применением набора qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия) согласно инструкции производителя. Данные анализировали при помощи программного обеспечения CFX Manager (Bio-Rad). Были использованы пары праймеров, специфичные для последовательности гена *GFP* (Forward: 5′-GATGTGGAAAA CAAGACAGGGGTTT-3′; Reverse: 5′-TGGTGAACCG GGCGTACTATTT-3′) и последовательности гена *NAD4* из митохондриального генома арабидопсиса (Forward: 5′-GCATTTCAGTGGGTTGGTCTGGT-3′; Reverse: 5′-AG GGATTGGCACGCTTTCGG-3′). Соотношение содержания импортированной ДНК к мтДНК рассчитывали, основываясь на отношении абсолютных значений сигнала от импортированной ДНК и от гена *NAD4* с учетом разницы между размерами импортированных фрагментов (265 п. н. и 2.7 т. п. н.) и мт-генома (367 т. п. н.) с допущением, что мт-геном представлен исключительно мастер-хромосомой.

Статистическая обработка результатов. Эксперименты проводили не менее чем в трех биологических повторностях. Построение диаграмм выполняли с помощью пакета программ Microsoft Excel. Степень достоверности различий оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты

Известно, что импорт ДНК в митохондрии осуществляется посредством различных транспортных путей, эффективность которых зависит от размера импортируемых молекул (Weber-Lotfi et al., 2015; Tarasenko et al., 2021). Исходя из этого, для исследования роли отдельных белковых компонентов митохондриальной мембраны в импорте ДНК использовали фрагменты ДНК двух размерных классов – малой (265 п. н.) и средней (2732 п. н.) длин (рис. 1).

Полученные с помощью ПЦР (см. рис. 1, *б*) фрагменты ДНК размером 265 п. н. и 2.7 т. п. н. были импортированы в митохондрии, изолированные из растений арабидопсиса (*in organello*) дикого типа (Col-0) и нокаут-мутантов по белкам Tim23-2 (*tim23-2*), Tim23-3 (*tim23-3*) и Tim17-1 (*tim17-1*), представляющим собой изоформы ключевых белков комплекса TIM17:23. Для митохондрий мутанта *tim23-2* было показано значительное снижение уровня импорта фрагмента малой длины в сравнении с линией дикого типа (рис. 2, *а*), тогда как уровень импорта фрагмента среднего размера достоверно не отличался. В митохондриях мутанта *tim23-3* зависимости эффективности импорта ДНК этих двух размерных классов от отсутствия в мембране функционального Tim23-3 не обнаружено (см. рис. 2, *б*). Таким образом, очевидно, что изоформа белка Tim23-2 является частью аппарата импорта ДНК, выполняя при этом специфическую роль в переносе молекул ДНК преимущественно малой длины.

При исследовании импорта в митохондрии мутанта *tim17-1* наблюдалось снижение эффективности транспорта ДНК, приблизительно сходное для фрагментов как малой,

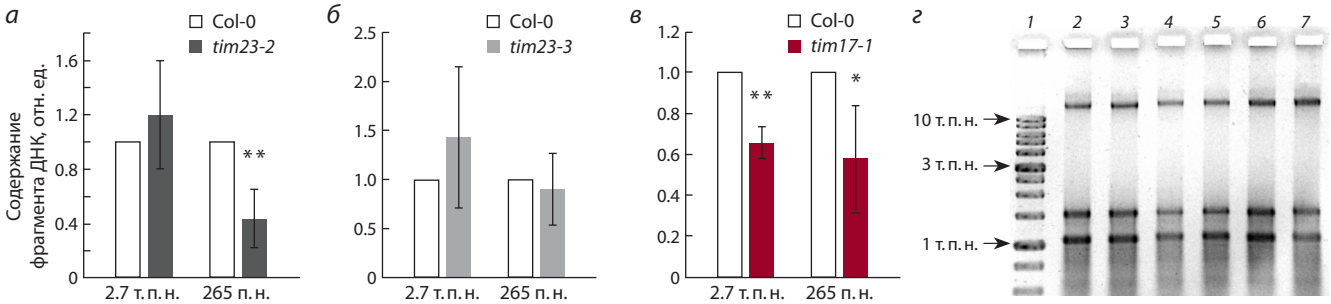


Рис. 2. Анализ импорта чужеродной ДНК в изолированные митохондрии арабидопсиса.

Фрагменты ДНК размером 265 п. н. и 2.7 т. п. н. были импортированы в митохондрии дикого типа и мутантных линий арабидопсиса: *tim23-2* (*а*), *tim23-3* (*б*) и *tim17-1* (*в*). Митохондриальная ДНК, экстрагированная из митохондрий после импорта (*г*), была использована для анализа при помощи ПЦР-РВ. Показано количество фрагмента гена *GFP* (импортированная ДНК), нормированное к содержанию фрагмента гена *NAD4* (мтДНК). Уровень импорта в Col-0 принят за относительную единицу. Допуски на диаграммах обозначают стандартное отклонение. * и ** – статистически значимые различия при $p \leq 0.05$ и $p \leq 0.01$ соответственно. (*г*) – препарат нуклеиновых кислот митохондрий, использованный для анализа: *1* – маркер молекулярного веса ДНК, *2*, *3* – мтДНК из *tim23-2*; *4*, *5* – мтДНК из *tim23-3*; *6*, *7* – мтДНК из *tim17-1*.

так и средней длины (см. рис. 2, *в*). Эти результаты позволяют предположить, что белок Tim17-1 также может быть важным участником аппарата транслокации ДНК в митохондрии.

С целью верификации данных по импорту фрагмента ДНК средней длины (2.7 т. п. н.) в митохондрии, изолированные из линий, мутантных по белкам Tim17 и Tim23 (см. рис. 2, *а*, *в*), мы провели эксперименты с использованием протопластов арабидопсиса, полученных из этих линий (*in vivo*) (рис. 3, *а*). Протопласты сохраняли свою структурную целостность на протяжении 20 ч (см. рис. 3, *б*). Обнаружено, что уровень импорта чужеродной ДНК из цитоплазмы протопластов в митохондрии нокаут-мутанта *tim17-1* действительно снижен, но в меньшей степени, чем это отмечено *in organello*. Из этих наблюдений следует, что недостаток митохондриального Tim17-1, по-видимому, частично компенсируется *in vivo* теми или иными клеточными факторами. В сравнении с *tim17-1* уровень импорта в митохондрии *tim23-2* не отличался от линии дикого типа аналогично тому, как это было показано в системе изолированных органелл (см. рис. 3, *а*). В совокупности результаты импорта ДНК, полученные *in organello* с использованием мутантных линий, лишенных транспортных белков Tim23-2 либо Tim17-1, отражают закономерности переноса ДНК *in vivo* в митохондрии протопластов этих линий.

Далее нами была поставлена задача – исследовать возможную взаимосвязь белка наружной мембраны митохондрий VDAC с Tim17-1 и Tim23-2 в импорте молекул ДНК малой длины. Использование антител к VDAC1 потенциально позволяет исключить изоформу этого белка из участия в формировании канала для переноса ДНК. Показано (Koulintchenko et al., 2003), что связывание антител, специфичных к определенному белку-переносчику внешней митохондриальной мембраны, должно ингибировать его транспортную активность. Мы применили этот методический подход для анализа эффективности импорта фрагментов ДНК размером 265 п. н. в изолированные митохондрии дикого типа и мутантных линий *tim17-1* или *tim23-2* (рис. 4).

На начальном этапе с целью исключения неспецифического ингибирования мы провели оценку влияния антител, специфично связывающих митохондриальный апоцитохром *b* (Cob). Этот белок внутренней мембраны представляет собой центральную каталитическую субъединицу убихинол-цитохром *c* оксидоредуктазы (Islas-Osuna et al., 2006). Внешняя мембрана митохондрий непроницаема для антител, поэтому ингибирование транспортных процессов при использовании антител к Cob происходить не должно. Уровень импорта фрагмента 265 п. н. в митохондрии дикого типа после их обработки антителами к Cob не отличался от контрольной пробы (см. рис. 4, *а*). Исходя из этого, были проведены эксперименты, в которых фрагменты ДНК размером 265 п. н. импортировали в изолированные митохондрии мутантных линий *tim17-1* или *tim23-2*, предварительно

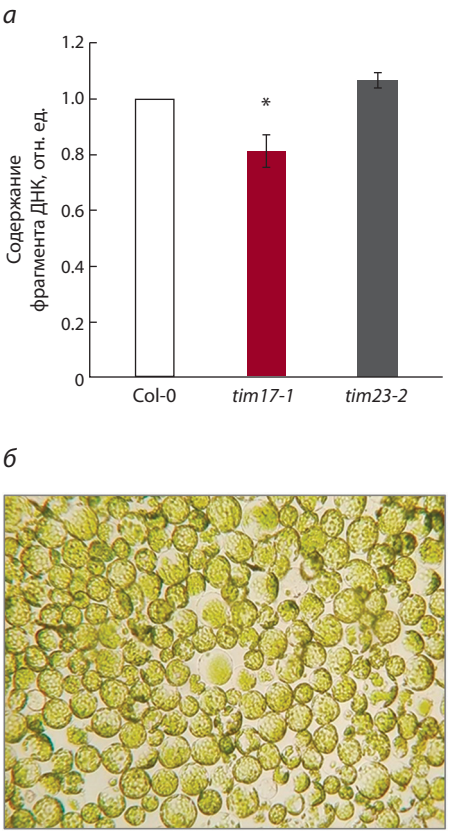


Рис. 3. Определение уровня импорта ДНК в митохондрии протопластов, полученных из листьев арабидопсиса, при помощи ПЦР-РВ.

а – фрагмент ДНК размером 2.7 т. п. н. импортирован в митохондрии протопластов дикого типа и мутантных линий арабидопсиса *tim17-1* и *tim23-2*. После трансфекции интактных протопластов проведено выделение митохондрий с последующей экстракцией мтДНК. Показано количество детектированного фрагмента гена *GFP*, нормированное к содержанию фрагмента гена *NAD4*. Уровень импорта в Col-0 принят за относительную единицу. Допуски на диаграммах обозначают стандартное отклонение. * Статистически значимые различия при $p \leq 0.05$; *б* – световая микроскопия целостности протопластов после трансформации фрагментом ДНК и инкубации в течение 20 ч.

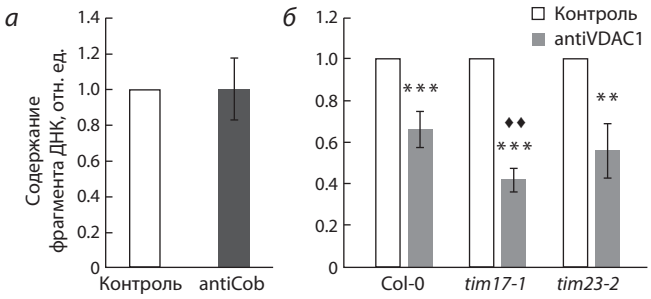


Рис. 4. Анализ эффективности импорта ДНК малой длины в изолированные митохондрии арабидопсиса в присутствии антител к мембранным белкам.

а – определение степени неспецифического ингибирования транспортных каналов, предположительно, вовлеченных в импорт ДНК, антителами к Cob; *б* – оценка эффективности импорта ДНК в митохондрии Col-0 и мутантных линий *tim17-1* и *tim23-2* в присутствии специфических антител к VDAC1 (antiVDAC1). Показано количество фрагмента гена *GFP*, нормированное к содержанию фрагмента гена *NAD4*. Уровень импорта фрагмента 265 п. н. в митохондрии арабидопсиса без предварительной обработки антителами (контроль) принят за относительную единицу. Допуски на диаграммах обозначают стандартные отклонения. ** (♦♦) и *** – статистически значимые различия при $p \leq 0.01$ и $p \leq 0.001$ соответственно; * – отличия от контроля; ♦ – отличия от уровня импорта в митохондрии Col-0, предварительно обработанные antiVDAC1 (*б*).

обработанные антителами к белку внешней мембраны VDAC1 (см. рис. 4, *б*).

Согласно полученным данным, уровень импорта ДНК малой длины в митохондрии дикого типа в присутствии антител к VDAC1 был достоверно снижен (см. рис. 4, *б*). Очевидно, что эта изоформа порина непосредственно вовлечена в транспорт ДНК данной длины в митохондрии арабидопсиса. Анализ импорта в митохондрии, в мембране которых отсутствует функциональный Tim23-2, показал, что в присутствии антител к VDAC1 эффективность этого процесса не отличалась от таковой в линии дикого типа в тех же условиях (см. рис. 4, *б*). Учитывая, что отсутствие Tim23-2 в мембране митохондрий приводит к снижению уровня импорта ДНК малой длины приблизительно в той же степени (см. рис. 2, *а*), что и при ингибировании VDAC1 в Col-0 или в нокаут-мутанте *tim23-2*, полученные результаты позволяют предположить, что VDAC1 образует с Tim23-2 один транспортный канал. Кроме того, степень снижения практически не меняется при одновременной инактивации этих двух белков-переносчиков, находящихся в разных митохондриальных мембранах (см. рис. 4, *б*). При этом в митохондриях линии *tim17-1*, обработанных антителами к VDAC1, мы отметили дополнительное снижение уровня импорта фрагмента 265 п. н. (см. рис. 4, *б*), что указывает на участие Tim17-1 в формировании канала импорта ДНК, не зависимого от VDAC1.

Из полученных данных следует, что VDAC1 является компаньоном Tim23-2, но не Tim17-1, в процессе транслокации фрагментов малой длины через двойную мембрану митохондрий. При этом белок Tim17-1, в отличие от Tim23-2, участвует в процессе импорта фрагментов как малой, так и средней длины, что служит дополнительным аргументом в пользу независимости Tim17-1 от канала, образуемого Tim23-2 и VDAC1.

С целью получения информации о фактической эффективности процесса импорта двух использованных фрагментов ДНК в митохондрии различных линий нами был произведен расчет содержания импортированной ДНК в митохондриях по отношению к содержанию митохондриальной ДНК (см. таблицу). В результате показано, что эффективность проникновения фрагмента малой длины чрезвычайно высока, составляя до 5 % от количества мтДНК. Импорт фрагмента 2.7 т. п. н. гораздо менее эффективен – количество проникшей в органеллы ДНК меньше количества импортированного фрагмента 265 п. н. примерно в 30 раз. Полученные результаты хорошо соотносятся с известными данными об эффективности импорта (Koulintchenko et al., 2003), а также являются дополнительным аргументом в пользу существования отдельных путей импорта для фрагментов малой и средней длины, отличающихся по интенсивности транспорта ДНК через мембрану.

Обсуждение

Роль субъединиц Tim23 и Tim17 в импорте белка в митохондрии хорошо изучена (Murcha et al., 2003, 2014; Lister et al., 2004), однако исследования потенциального вовлечения комплекса TIM17:23 или его отдельных субъединиц в процесс импорта ДНК в митохондрии до настоящего времени не проводили. Ранее показано, что разные изоформы белков Tim17 и Tim23 (Murcha et al., 2007) различаются своей способностью комплементировать нокаутные мутанты по ортологичным субъединицам у дрожжей, что предполагает некоторую функциональную специализацию разных изоформ (Murcha et al., 2003). Это исследование было сфокусировано на мажорной изоформе Tim23-2 и минорной Tim17-1, роль которой в митохондриях растений остается малоизученной. Для импорта фрагментов чужеродной ДНК разной длины мы использовали митохондрии, выделенные из линий арабидопсиса, мутантных по белкам Tim23-2 и Tim17-1.

В системе *in organello* нами показано, что оба белка принимают участие в импорте ДНК, при этом Tim23-2 более специфичен в отношении размера переносимой молекулы (см. рис. 2, *а*). Эти данные были подтверждены в системе импорта ДНК в митохондрии протопластов, полученных из линий арабидопсиса, мутантных по данным белкам

Содержание импортированных фрагментов ДНК в митохондриях относительно содержания мтДНК

Линия арабидопсиса	265 п. н., % от содержания мтДНК		2.7 т. п. н., % от содержания мтДНК
	–antiVDAC1	+antiVDAC1	
Col-0	5.76 ± 1.68	3.53 ± 0.75	0.176 ± 0.011
tim17-1	2.84 ± 0.56	1.44 ± 0.47	0.119 ± 0.044
tim23-2	2.31 ± 1.02	1.47 ± 0.64	0.173 ± 0.021

(Wu et al., 2009). Ранее нами разработан эффективный способ изучения импорта фрагментов ДНК в митохондрии после трансформации этими молекулами протопластов арабидопсиса, т. е. в условиях сохранения нативного клеточного окружения митохондрий (Tarasenko et al., 2019). В этой работе установлен ряд закономерностей, главная из которых – соответствие результатов, полученных на протопластах, данным исследований механизма импорта ДНК в митохондрии, изолированные из растений арабидопсиса.

Полученные с использованием протопластов результаты позволяют сделать вывод о том, что наблюдаемое снижение импорта ДНК в митохондрии, в мембране которых отсутствует Tim17-1, происходит *in vivo*. Таким же образом с использованием протопластов подтверждено, что Tim23-2 не играет роли в импорте ДНК средней длины. Этот белок, тем не менее, по данным экспериментов *in organello*, проявляет активность, специфичную в отношении переноса фрагментов ДНК малой длины. Это свойство Tim23-2 – еще один аргумент в пользу существования нескольких путей переноса ДНК через внутреннюю мембрану специфичных в определенной степени в отношении размера импортируемых молекул.

Другой исследованный в работе белок, представляющий минорную изоформу Tim17-1, напротив, оказался способен к импорту фрагментов ДНК как малой, так и средней длины. Для изоформы Tim17-1 характерен высокий уровень экспрессии во время прорастания семян, поэтому предполагается, что Tim17-1 может принимать участие в митохондриальном биогенезе на этой стадии развития (Wang et al., 2014). Неочевидна роль этой изоформы в импорте белка во взрослом растении арабидопсиса ввиду ее низкого уровня экспрессии, особенно на фоне постепенного повышения экспрессии двух других изоформ по мере роста и развития растения. Постепенное снижение уровня экспрессии субъединицы Tim17-1 после прорастания (Wang et al., 2014) может указывать на потенциальную специализацию этой изоформы в альтернативных и менее важных для биогенеза митохондрий процессах.

Помимо использования нокаут-мутантов, другой подход для изучения роли белков митохондриальной мембраны в транспортных процессах митохондрий – применение специфических антител к белкам митохондриальной мембраны (Koulintchenko et al., 2003; Murcha et al., 2005). Исследования роли VDAC в импорте ДНК в изолированные митохондрии картофеля и крысы ранее проводили с использованием антител, распознающих консервативный домен белков VDAC (Koulintchenko et al., 2003, 2006). Однако ни для одной из групп организмов до настоящего времени нет данных о роли в этом процессе конкретной изоформы митохондриального порина. Ранее нами была предпринята попытка изучения участия в импорте ДНК той или иной изоформы VDAC с помощью инсерционных мутантов по этим белкам, однако снижение уровня импорта не выявлено ни в одной из этих линий, очевидно, вследствие компенсации отсутствия белка другими изоформами/транспортными механизмами на протяжении развития растения (Tarasenko et al., 2021).

Известно, что четыре функциональные изоформы VDAC арабидопсиса, несмотря на высокую степень гомологии (от 68 до 50 %), очевидно, обладают функциональной специализацией (Tateda et al., 2011; Hemono et al., 2020). При оценке уровня белка в митохондриях арабидопсиса обнаружено, что наиболее распространенная изоформа митохондриального порина – это VDAC1, у которой насчитывается примерно 44 400 копий на митохондрию (Fuchs et al., 2020). В нашей работе мы использовали изоформо-специфичные антитела к VDAC1 арабидопсиса (AT3G01280), взаимодействующие с N-концом этого белка. Обнаружено, что ингибирование активности VDAC1 антителами приводит к снижению интенсивности импорта ДНК. Данный факт свидетельствует о том, что использование специфических антител для подавления работы порина оказалось более продуктивным подходом к изучению роли изоформ VDAC в импорте, чем применение нокаут-мутантов. Таким образом, нами впервые показано вовлечение конкретной изоформы порина, VDAC1, в перенос ДНК в митохондрии (рис. 5, *а*, *б*). В то время как в механизме импорта тРНК в митохондрии арабидопсиса предполагается специфическая функция изоформы VDAC4 (Hemono et al., 2020), в данной работе продемонстрировано участие изоформы VDAC1 в импорте ДНК. Исходя из этого, не исключена функциональная специализация различных изоформ VDAC в отношении типа нуклеиновых кислот (ДНК/РНК) и их размера.

Нами исследована также возможность взаимодействия VDAC1 с Tim17-1 или Tim23-2 в процессе транслокации ДНК. Ввиду того, что в импорт фрагмента малой длины 265 п. н. вовлечены, как оказалось, как Tim17-1, так и Tim23-2, мы использовали ДНК-субстрат именно этого размерного класса. В результате впервые установлено, что изоформа митохондриального порина 1, по-видимому, образует с Tim23-2 один транспортный канал: мы наблюдали равное снижение уровня импорта ДНК малой длины при ингибировании одного из этих компонентов и отсутствие дополнительного снижения при одновременной инактивации двух белков, локализующихся в разных мембранах (см. рис. 5, *в*, *г*).

Дополнительное снижение импорта ДНК, отмеченное в митохондриях мутантной линии *tim17-1* при ингибировании VDAC1 антителами, позволяет сделать вывод о том, что белки Tim17-1 и VDAC1, по-видимому, принадлежат к двум независимым транспортным каналам (см. рис. 5, *д*, *е*). Мы предполагаем, что белком-компаньоном внешней мембраны для Tim17-1 может быть одна из других изоформ порина (см. рис. 5, *а*, *д*). Отсутствие полного ингибирования импорта ДНК в митохондрии арабидопсиса в любом из исследованных случаев инактивации мембранных белков согласуется с гипотезой о наличии у этих органелл множественных путей, обеспечивающих механизм этого процесса (Weber-Lotfi et al., 2015; Tarasenko et al., 2021).

В какой степени участвуют в импорте ДНК другие изоформы VDAC и компоненты транслоказы белков внутренней мембраны Tim17:23 митохондрий арабидопсиса, существует ли для них специфичность в отношении размера переносимой молекулы, а также какие взаимоотношения между изоформами VDAC и белками Tim17-2, Tim17-3, Tim23-1, Tim23-3 – предстоит установить в дальнейших исследованиях.

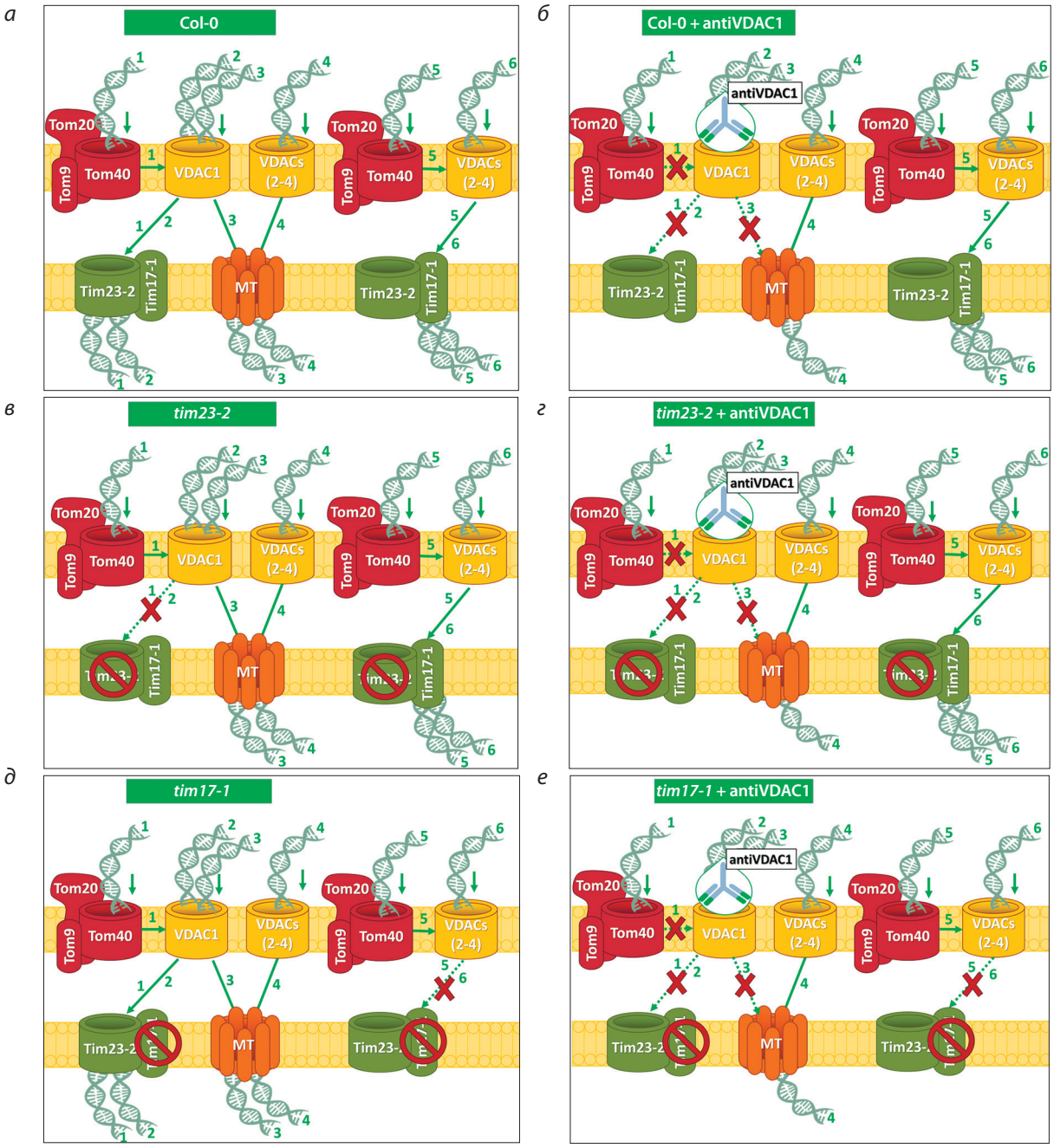


Рис. 5. Гипотетическая схема влияния инактивации белков митохондриальной мембраны на уровень импорта ДНК в митохондрии.

Инактивацию транспортного процесса обеспечивали (*а*, *в*, *д*) применением нокаут-мутантов арабидопсиса, в мембране митохондрий которых отсутствует функциональный белок Tim17-1 или Tim23-2, и/или (*б*, *г*, *е*) ингибированием белка VDAC1 внешней митохондриальной мембраны специфическими антителами. В случае одновременного исключения из транспортного процесса VDAC1 и Tim23-2 (*г*) происходило снижение уровня импорта, сопоставимое по интенсивности наблюдаемому в условиях инактивации только одного транспортера (*б* или *в*). При одновременном исключении из транспортного процесса VDAC1 и Tim17-1 (*е*) наблюдалось дополнительное снижение эффективности в сравнении с инактивацией одного белка (*б* или *д*), указывающее на принадлежность этих белков к двум разным каналам.
1–6 – пути переноса молекул ДНК в матрикс; стрелки – направление переноса ДНК; прерывистые стрелки, перечеркнутые красным крестом, – блокирование транспортного пути; перечеркнутый круг – отсутствие в мембране митохондрий функционального белка в результате инсерционного мутагенеза. МТ – комплекс, формируемый с участием митохондриальных транспортеров.

Заключение

Исследование роли в механизме импорта ДНК отдельных белков комплекса TIM17:23 внутренней митохондриальной мембраны позволило установить их участие в этом процессе, а также определить потенциал их совместного функционирования с VDAC1. Учитывая, что специфичность импорта ДНК в отношении размера переносимой молекулы, вероятно, определяется на уровне внутренней мембраны, полученные нами данные углубили понимание механизма импорта и расширили возможности для разработки системы трансформации митохондриального генома.

Список литературы / References

Fuchs P., Rugen N., Carrie C., Elsasser M., Finkemeier I., Giese J., Hildebrandt T.M., Kuhn K., Maurino V.G., Ruberti C., Schallenberg-Rüdinger M., Steinbeck J., Braun H.P., Eubel H., Meyer E.H., Müller-Schüssele S.J., Schwarzländer M. Single organelle function and organization as estimated from Arabidopsis mitochondrial proteomics. *Plant J.* 2020;101(2):420-441. DOI 10.1111/tpj.14534

Hemono M., Ubrig É., Azeredo K., Salinas-Giegé T., Drouard L., Duchêne A.-M. *Arabidopsis* voltage-dependent anion channels (VDACs): overlapping and specific functions in mitochondria. *Cells*. 2020;9(4):1023. DOI 10.3390/cells9041023

Islas-Osuna M.A., Silva-Moreno B., Caceres-Carrizosa N., García-Robles J.M., Sotelo-Mundo R.R., Yepiz-Plascencia G.M. Editing of the grapevine mitochondrial cytochrome *b* mRNA and molecular modeling of the protein. *Biochimie*. 2006;88(5):431-435. DOI 10.1016/j.biochi.2005.10.003

Konstantinov Y.M., Dietrich A., Weber-Lotfi F., Ibrahim N., Klimenko E.S., Tarasenko V.I., Bolotova T.A., Koulintchenko M.V. DNA import into mitochondria. *Biochemistry (Mosc.)*. 2016;81(10):1044-1056. DOI 10.1134/S0006297916100035

Koulintchenko M., Konstantinov Y., Dietrich A. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex. *EMBO J*. 2003;22(6):1245-1254. DOI 10.1093/emboj/cdg128

Koulintchenko M., Temperley R.J., Mason P.A., Dietrich A., Lightowlers R.N. Natural competence of mammalian mitochondria allows the molecular investigation of mitochondrial gene expression. *Hum. Mol. Genet*. 2006;15(1):143-154. DOI 10.1093/hmg/ddi435

Larosa V., Remacle C. Transformation of the mitochondrial genome. *Int. J. Dev. Biol*. 2013;57(6-8):659-665. DOI 10.1387/ijdb.130230cr

Lister R., Chew O., Lee M.N., Heazlewood J.L., Clifton R., Parker K.L., Millar A.H., Whelan J. A transcriptomic and proteomic characterization of the Arabidopsis mitochondrial protein import apparatus and its response to mitochondrial dysfunction. *Plant Physiol*. 2004;134(2):777-789. DOI 10.1104/pp.103.033910

Martin W.F., Garg S., Zimorski V. Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci*. 2015;370(1678): 20140330. DOI 10.1098/rstb.2014.0330

Morley S.A., Nielsen B.L. Plant mitochondrial DNA. *Front. Biosci*. 2017;22(6):1023-1032. DOI 10.2741/4531

Murcha M.W., Lister R., Ho A.Y., Whelan J. Identification, expression, and import of components 17 and 23 of the inner mitochondrial membrane translocase from Arabidopsis. *Plant Physiol*. 2003; 131(4):1737-1747. DOI 10.1104/pp.102.016808

Murcha M.W., Elhafez D., Millar A.H., Whelan J. The C-terminal region of TIM17 links the outer and inner mitochondrial membranes in *Arabidopsis* and is essential for protein import. *J. Biol. Chem*. 2005;280(16):16476-16483. DOI 10.1074/jbc.M413299200

Murcha M.W., Elhafez D., Lister R., Tonti-Filippini J., Baumgartner M., Philippar K., Carrie C., Mokranjac D., Soll J., Whelan J. Characterization of the *preprotein and amino acid transporter* gene family in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 2007;143(1):199-212. DOI 10.1104/pp.106.090688

Murcha M.W., Wang Y., Narsai R., Whelan J. The plant mitochondrial protein import apparatus: the differences make it interesting. *Biochim. Biophys. Acta*. 2014;1840(4):1233-1245. DOI 10.1016/j.bbagen.2013.09.026

Ryan K.R., Leung R.S., Jensen R.E. Characterization of the mitochondrial inner membrane translocase complex: the Tim23p hydrophobic domain interacts with Tim17p but not with other Tim23p molecules. *Mol. Cell. Biol*. 1998;18(1):178-187. DOI 10.1128/MCB.18.1.178

Salinas T., Duchêne A.M., Delage L., Nilsson S., Glaser E., Zaepfel M., Maréchal-Drouard L. The voltage-dependent anion channel a major component of the tRNA import machinery in plant mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006;103:18362-18367.DOI 10.1073/pnas.0606449103

Salinas T., El Farouk-Ameqrane S., Ubrig E., Sauter C., Duchene A.M., Marechal-Drouard L. Molecular basis for the differential interaction of plant mitochondrial VDAC proteins with tRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(15):9937-9948. DOI 10.1093/nar/gku728

Salinas-Giegé T., Giegé R., Giegé P. tRNA biology in mitochondria. *Int. J. Mol. Sci*. 2015;16(3):4518-4559. DOI 10.3390/ijms16034518

Sweetlove L.J., Taylor N.L., Leaver C.J. Isolation of intact, functional mitochondria from the model plant *Arabidopsis thaliana*. In: Leister D., Herrmann J.M. (Eds.). Mitochondria. Methods in Molecular Biology™. Vol. 372. Humana Press, 2007;125-136. DOI 10.1007/978-1-59745-365-3_9

Tarasenko T.A., Tarasenko V.I., Koulintchenko M.V., Klimenko E.S., Konstantinov Y.M. DNA import into plant mitochondria: complex approach for *in organello* and *in vivo* studies. *Biochemistry (Mosc.)*. 2019;84(7):817-828. DOI 10.1134/S0006297919070113

Tarasenko T.A., Klimenko E.S., Tarasenko V.I., Koulintchenko M.V., Dietrich A., Weber-Lotfi F., Konstantinov Y.M. Plant mitochondria import DNA *via* alternative membrane complexes involving various VDAC isoforms. *Mitochondrion*. 2021;60:43-58. DOI 10.1016/j.mito.2021.07.006

Tateda C., Watanabe K., Kusano T., Takahashi Y. Molecular and genetic characterization of the gene family encoding the voltage-dependent anion channel in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot*. 2011;62(14):4773-4785. DOI 10.1093/jxb/err113

Truscott K.N., Kovermann P., Geissler A., Merlin A., Meijer M., Driessen A.J., Rassow J., Pfanner N., Wagner R. A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nat. Struct. Biol*. 2001;8(12):1074-1082. DOI 10.1038/nsb726

Verechshagina N.A., Konstantinov Y.M., Kamenski P.A., Mazunin I.O. Import of proteins and nucleic acids into mitochondria. *Biochemistry (Mosc.)*. 2018;83(6):643-661. DOI 10.1134/S0006297918060032

Wang Y., Carrie C., Giraud E., Elhafez D., Narsai R., Duncan O., Whelan J., Murcha M.W. Dual location of the mitochondrial preprotein transporters B14.7 and Tim23-2 in complex I and the TIM17:23 complex in *Arabidopsis* links mitochondrial activity and biogenesis. *Plant Cell*. 2012;24(6):2675-2695. DOI 10.1105/tpc.112.098731

Wang Y., Law S.R., Ivanova A., van Aken O., Kubiszewski-Jakubiak S., Uggalla V., van der Merwe M., Duncan O., Narsai R., Whelan J., Murcha M.W. The mitochondrial protein import component, TRANSLOCASE OF THE INNER MEMBRANE17-1, plays a role in defining the timing of germination in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 2014;166(3):1420-1435. DOI 10.1104/pp.114.245928

Weber-Lotfi F., Ibrahim N., Boesch P., Cosset A., Konstantinov Y., Lightowlers R.N., Dietrich A. Developing a genetic approach to investigate the mechanism of mitochondrial competence for DNA import. *Biochim. Biophys. Acta*. 2009;1787(5):320-327. DOI 10.1016/j.bbabio.2008.11.001

Weber-Lotfi F., Koulintchenko M.V., Ibrahim N., Hammann P., Mileshina D.V., Konstantinov Y.M., Dietrich A. Nucleic acid import into mitochondria: New insights into the translocation pathways. *Biochim. Biophys. Acta*. 2015;1853(12):3165-3181. DOI 10.1016/j.bbamcr.2015.09.011

Wu F.-H., Shen S.-C., Lee L.-Y., Chan M.-T., Lin C.-S. Tape-*Arabidopsis* sandwich – a simpler *Arabidopsis* protoplast isolation method. *Plant Methods*. 2009;5:16. DOI 10.1186/1746-4811-5-16

ORCID

T.A. Tarasenko orcid.org/0000-0002-2830-4175
V.I. Tarasenko orcid.org/0000-0001-8208-6941
M.V. Koulintchenko orcid.org/0000-0003-0931-2863
Yu.M. Konstantinov orcid.org/0000-0002-0601-2788

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-74-00114 (https://rscf.ru/project/22-74-00114/). В работе использовано оборудование ЦКП «Биоаналитика» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 31.07.2023. После доработки 14.09.2023. Принята к публикации 02.10.2023.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023;27(8):980-987
DOI 10.18699/VJGB-23-113

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

Фотохимическая активность формирующихся семядолей гороха (*Pisum sativum* L.) зависит от светопропускания покровных тканей и спектрального состава света

Г.Н. Смоликова[1, 2] ✉, Н.В. Степанова[1, 2], А.М. Камионская[2], С.С. Медведев[1]

[1] Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
[2] Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия
✉ g.smolikova@spbu.ru

Аннотация. У многих сельскохозяйственных растений для формирования семян необходимы не только фотосинтез листьев, но также фотохимические реакции, происходящие в семенах. Цель нашей работы заключалась в сравнительном анализе светопропускания и фотохимической активности листьев, перикарпия, кожуры и семядолей *Pisum sativum* L. на ранней, средней и поздней стадиях созревания семян. Спектральный состав света измеряли при помощи спектрорадиометра в области 390–760 нм. Светопропускание растительных тканей оценивали, разместив растительную ткань между источником освещения и датчиком спектрорадиометра. Фотохимическую активность растительных тканей определяли методом PAM-флуориметрии, позволяющим оценить эффективность преобразования световой энергии в химическую путем анализа кинетики возбуждения и гашения флуоресценции хлорофиллов. Фотохимически активный зеленый лист гороха пропускал в среднем 15 % солнечной радиации в диапазоне 390–760 нм; при этом синий свет задерживался полностью, а количество проходящего красного света составляло не более 5 %. Фотохимически активная радиация, проходящая сквозь перикарпий и кожуру и достигающая семядолей на ранней и средней стадиях созревания семян, характеризовалась высокой долей зеленого и дальнего красного света, при этом синий свет отсутствовал, а количество красного света составляло около 2 %. Однако, несмотря на низкую энергетическую освещенность и спектральные диапазоны, не характерные для фотосинтеза листа, семядоли были фотохимически активными. На ранней и средней стадиях созревания максимальный квантовый выход фотосистемы II (*Fv/Fm*) в среднем составлял 0.5 на периферии семядолей и 0.3 в центре семядолей. Поскольку интенсивность эмбриональных фотохимических реакций в значительной степени влияет на эффективность накопления запасных питательных веществ, этот параметр является перспективным маркером для селекции семян гороха с улучшенными пищевыми качествами.
Ключевые слова: *Pisum sativum* L.; созревание семян; светопропускание тканей; интенсивность освещения; фотохимически активная радиация; фотохимическая активность; PAM-флуориметрия.

Для цитирования: Смоликова Г.Н., Степанова Н.В., Камионская А.М., Медведев С.С. Фотохимическая активность формирующихся семядолей гороха (*Pisum sativum* L.) зависит от светопропускания покровных тканей и спектрального состава света. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023; 27(8):980-987. DOI 10.18699/VJGB-23-113

Photochemical activity in developing pea (*Pisum sativum* L.) cotyledons depends on the light transmittance of covering tissues and the spectral composition of light

G.N. Smolikova[1, 2] ✉, N.V. Stepanova[1, 2], A.M. Kamionskaya[2], S.S. Medvedev[1]

[1] Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia
[2] Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
✉ g.smolikova@spbu.ru

Abstract. Many crops require not only leaf photosynthesis for their seed development but also the photochemical reactions that occur in the seeds. The purpose of this work was a comparative analysis of light transmittance and photochemical activity in the leaves of *Pisum sativum* L. and its pericarp, seed coat, and cotyledons at the early, middle, and late maturation stages. The spectral composition of light was measured using a spectroradiometer in the range of 390–760 nm. We assessed the light transmittance of plant tissues by placing the plant tissue between the light source and the spectroradiometer's sensor. PAM fluorometry was used to quantify the photochemical activity in plant tissues: this technique is handy for evaluating the efficiency of converting light energy into chemical energy through the analysis of the kinetics of chlorophyll fluorescence excitation and quenching. On average, a photochemically active green leaf of pea transmitted 15 % of solar radiation in the 390–760 nm, blue light was delayed entirely, and the transmitted red light never exceeded 5 %. Photochemically active radiation passing through the pericarp and coat and reaching the cotyledons at the early and middle seed maturation stages manifested a high proportion of green and far-red light; there was no blue light, and the percentage of red light was about 2 %. However, the cotyledons were photochemically active regardless of low irradiance and spectral ranges untypical of leaf photosynthesis. At the early and middle maturation

© Смоликова Г.Н., Степанова Н.В., Камионская А.М., Медведев С.С., 2023
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

stages, the maximum quantum yield of photosystem II (*Fv*/*Fm*) averaged 0.5 at the periphery of cotyledons and 0.3 at their center. Since the intensity of embryonic photochemical reactions significantly affects the efficiency of reserve nutrient accumulation, this parameter is a promising marker in pea breeding for seeds with improved nutritional qualities.
Key words: *Pisum sativum* L.; seed maturation; light transmittance of tissues; illumination intensity; photochemically active radiation; photochemical activity; PAM fluorometry.

For citation: Smolikova G.N., Stepanova N.V., Kamionskaya A.M., Medvedev S.S. Photochemical activity in developing pea (*Pisum sativum* L.) cotyledons depends on the light transmittance of covering tissues and the spectral composition of light. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(8):980-987. DOI 10.18699/VJGB-23-113

Введение

Почти три четверти продуктов питания мы получаем из семян, поэтому производство семян высокого качества – основа пищевой безопасности страны (Mattana et al., 2022). Важным фактором семенной продуктивности растений является фотосинтез, который происходит в листьях и обеспечивает формирующиеся семена необходимыми ассимилятами (Simkin et al., 2019, 2020; Walter, Kromdijk, 2021). Поэтому большинство исследований, посвященных разработке подходов, связанных с повышением продуктивности и урожайности культурных растений, сосредоточено на анализе процессов фотосинтеза на уровне листа. Однако в других органах растений (черешках листьев, стеблях, внутренней коре, плодах) также могут синтезироваться хлорофиллы и формироваться активно работающие хлоропласты, в которых происходит так называемый нелистовой фотосинтез (non-foliar photosynthesis) (Aschan, Pfanz, 2003; Тихонов и др., 2017; Hu L. et al., 2019; Henry et al., 2020; Simkin et al., 2020; Yanykin et al., 2020).

О наличии зеленых пигментов в зародышах, а также в перикарпии и семенной кожуре у покрытосеменных растений, известно уже с середины XIX в. (Hofmeister, 1859; Flahault, 1879; Монтеверде, Любименко, 1909). Анализ пигментов созревающих семян рапса показал, что в них содержатся хлорофилл *a*, хлорофилл *b*, феофитин *a* и феофитин *b*, а также в более низком количестве феофорбид *a*, метилфеофорбид *a* и пирофеофорбид (Ward et al., 1994). При этом общее содержание хлорофиллов в расчете на единицу сырой массы, а также соотношение хлорофиллов *a*/*b* в зеленых зародышах ниже, чем в листьях (Булда и др., 2008; Смоликова и др., 2011; Smolikova et al., 2018, 2020). Интересно, что при сравнении содержания хлорофиллов и каротиноидов в листьях растений, адаптированных к условиям затенения, и в зеленых зародышах масличных семян оказалось, что их уровни приблизительно равны (Ruuska et al., 2004).

Показано, что у C_3-растений зеленые нелистовые ткани способны реассимилировать CO_2, который выделяется при дыхании, при этом его уровень может составлять 15–48 % от всего ассимилированного при фотосинтезе углекислого газа (Hu L. et al., 2019). Однако их вклад в общее количество синтезированных на свету ассимилятов часто игнорируется. Нелистовой фотосинтез осуществляют также формирующиеся семена многих видов растений (Borisjuk et al., 2003; Allorent et al., 2015; Смоликова, Медведев, 2016; Smolikova et al., 2017, 2018, 2020; Brazel, Ó'Maoiléidigh, 2019; Hu L. et al., 2019; Grulichova et al., 2022; Shackira et al., 2022).

Впервые в мире генезис и структура пластид зародышей более 1000 видов растений были изучены эмбриологами Ботанического института им. В.Ф. Комарова РАН (Яковлев, Жукова, 1973; Yakovlev, Zhukova, 1980). Выявлено 428 видов растений, у которых формирующиеся зародыши содержат хлорофиллы и пластиды с развитыми тилакоидными мембранами. Эти виды было предложено называть хлороэмбриофитами. Позднее было установлено, что функционирование фотосинтетического аппарата семян направлено не на синтез моносахаридов, как в листьях, а на синтез запасных соединений (в первую очередь, жирных кислот) (Neuhaus, Emes, 2000; Ruuska et al., 2004; Weber et al., 2005; Allen et al., 2009; Hu Y. et al., 2018).

Установлено, что начиная с глобулярной стадии развития в зародышах арабидопсиса и рапса наблюдалась экспрессия ядерных генов, отвечающих за процессы фотосинтеза (Spencer et al., 2007; Le et al., 2010; Belmonte et al., 2013; Kremnev et al., 2014). Приоритетная функция хлоропластов семян – быстрый синтез НАДФН и АТФ, которые расходуются на превращение поступающей из материнского растения сахарозы в ацетил-CoA, жирные кислоты и далее в триглицериды (Ruuska et al., 2004; Allen et al., 2009; Puthur et al., 2013; Wu et al., 2014; Allorent et al., 2015; Shackira et al., 2022). То есть эффективность накопления запасных питательных веществ в семенах напрямую зависит от эффективности эмбриональных фотохимических реакций. Так, например, у растений рапса (*Brassica napus* L.), формирующиеся стручки которых были экранированы от света, значительно снижались масса семян, а также содержание белков и жирных кислот (Wang et al., 2023).

Как правило, зародыши семян покрыты семенной и плодовой оболочками, которые экранируют их от солнечного света и затрудняют обмен углекислого газа и кислорода. В связи с этим существенной особенностью эмбриональных фотозависимых синтетических реакций у семян является то, что источником углерода служат не CO_2 воздуха, а сахароза, поступающая из материнского растения, а также CO_2, выделяющийся при дыхании (Ruuska et al., 2004). При этом O_2, образующийся при фотоокислении воды, предотвращает гипоксию и поддерживает митохондриальное дыхание развивающихся семян (Borisjuk et al., 2003; Weber et al., 2005; Borisjuk, Rolletschek, 2009; Tschiersch et al., 2011; Shackira et al., 2022). Недавно на растениях сои (*Glycine max*) показано, что нелистовой фотосинтез, происходящий в перикарпе и семенах, обеспечивает до 9 % от общего суточного усвоения углерода и может компенсировать до 81 % углерода, который эти же ткани теряют в процессе дыхания (Cho et al., 2023). Однако механизмы протекания фотозависимых синтетических реакций, связанные с накоплением запасных питательных веществ, требуют более глубокого изучения.

Необходим также ответ на вопрос, как, несмотря на условия низкой освещенности, формирующиеся семена получают достаточное количество света для обеспечения энергией фотохимических реакций. Детальные исследования, посвященные выяснению спектральных характеристик света, при которых происходят фотохимические процессы в зародышах, ранее не проводили.

Целью настоящей работы был сравнительный анализ светопроницаемости и фотохимической активности листьев, перикарпа, кожуры и семядолей формирующихся семян гороха (*Pisum sativum* L.).

Материалы и методы

Объектом исследования был горох посевной (*Pisum sativum* L.) овощного сорта Прима. Сорт включен в Госреестр по Центральному и Северо-Кавказскому регионам в 2015 г. Семена морщинистые, крупные, семядоли зеленые (Беседин, 2015). Растения гороха выращивали в течение летнего сезона 2022 г. в открытом грунте в условиях естественного освещения на делянках Санкт-Петербургского государственного университета. Изучали семена на ранней, средней и поздней стадиях созревания (рис. 1). Ранняя стадия характеризуется окончанием эмбриогенеза и началом накопления запасных питательных веществ в семядолях формирующихся семян (Smolikova et al., 2018, 2020). На средней стадии активно синтезируются запасные питательные вещества, семядоли занимают весь внутренний объем семени. На поздней стадии начинаются процесс обезвоживания и переход семени в состояние покоя.

Спектральный состав света измеряли при помощи спектрорадиометра ТКА «Спектр» (г. Санкт-Петербург). Принцип действия спектрорадиометра основан на измерении спектральной плотности энергетической яркости источника непрерывного оптического излучения в видимой области спектра 390–760 нм. Регистрировали спектральную плотность энергетической освещенности, которая выражается в единицах энергии на м^2 (мВт/м^2).

Светопропускание растительных тканей оценивали, разместив растительную ткань между источником света и датчиком спектрорадиометра. При этом источником света служила естественная солнечная радиация.

Фотохимическую активность растительных тканей оценивали методом флуориметрии, основанной на импульсной амплитудной модуляции (PAM, Pulse Amplitude Modulation), с использованием импульсного флуориметра Walz MINI-PAM-II/B (Heinz Walz Gmbh, Германия) согласно протоколу производителя (MINI-PAM-II: Manual for Standalone Use, 2018). Прибор оснащен источниками измерительного и актиничного (действующего света) с максимумом эмиссии 470 нм и детекцией флуоресценции при длинах волн > 630 нм. Интенсивность измерительного и действующего света составляла 0.05 и 190 мкМ фотонов/(м$^2 \cdot$ с) соответственно. Интенсивность вспышки насыщающего света составляла 5000 мкМ фотонов/(м$^2 \cdot$ с) с длительностью 0.6 с. Растительные ткани (листья, перикарп, кожура и семядоли) изолировали от материнского растения, помещали на влажную фильтровальную бумагу (для предотвращения подсыхания) и выдерживали в светонепроницаемых боксах для темновой адаптации в течение 20 мин. Для фиксации тканей использовали зажим 2060-B. Оценивали следующие показатели:

Fv/Fm – максимальный фотохимический квантовый выход фотосистемы II (ФС II) в момент, когда переносчики электронов в электронно-транспортной цепи хлоропластов окислены. Измеряется сразу после темновой адаптации тканей. Рассчитывается как соотношение количества квантов, используемых в разделении зарядов, к общему количеству квантов, поглощенных светособирающими комплексами (ССК):

$$Fv/Fm = (Fm - Fo)/Fm,$$

где *Fo* – базовый уровень флуоресценции при освещении измерительным светом, который не приводит к инициации потока электронов по электрон-транспортной цепи хлоропластов; *Fm* – максимальный уровень флуоресценции, вызванный сильным световым импульсом, при котором все реакционные центры (РЦ) фотосистем заполняются электронами; *Fv* – вариабельность флуоресценции, которая рассчитывается путем вычитания *Fo* из *Fm*.

$Y(II)$ – эффективный квантовый выход фотохимического тушения, который измеряется на адаптированных к свету образцах: $Y(II) = (Fm' - Fo)/Fm'$.

NPQ – нефотохимическое тушение флуоресценции. Рассчитывается по уравнению Штерна–Фолмера, согласно которому тушение флуоресценции пропорционально количеству центров тушения в ССК: $NPQ = Fm/Fm' - 1$.

Статистическая обработка данных и программное обеспечение. Все измерения выполняли в трех биологических повторностях. Количественные параметры флуоресценции хлорофиллов и соответствующие расчетные коэффициенты были получены с помощью программы WinControl-3 (Heinz Walz Gmbh, Германия). Статистическую обработку проводили в Microsoft Excel 2023 с использованием стандартного пакета анализа данных. На графиках и в таблицах представлены средние арифметические значения величин и стандартные отклонения. Все данные выражены как среднее арифметическое ± стандартное отклонение и обработаны при помощи Excel для Microsoft 365 с использованием встроенных инструментов статистического анализа данных. Осуществлен двухфакторный дисперсионный анализ с повторениями (ANOVA). Различия считались значимыми при доверительном уровне $p \leq 0.05$.

Результаты

Мы изучили динамику светопропускания тканей перикарпия, кожуры и семядолей при формировании семян гороха сорта Прима. Внешний вид плодов, семян и зародышей показан на рис. 1.

Светопропускание оценивали, разместив растительную ткань между солнечным светом и датчиком спектрорадиометра. При этом солнечная радиация была контролем и принималась за 100 %. Для сравнения использовали фотосинтетически активные зеленые листья гороха, стареющие желтые листья гороха, перикарпий, кожуру, а также перикарпий и кожуру, сложенные вместе. Спектр солнечной радиации, достигающий ткани плодов, показан в Приложении (*a*)[1]. Фотосинтетически активные зеленые

[1] Приложение см. по адресу:
https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2023-27/appx32.pdf

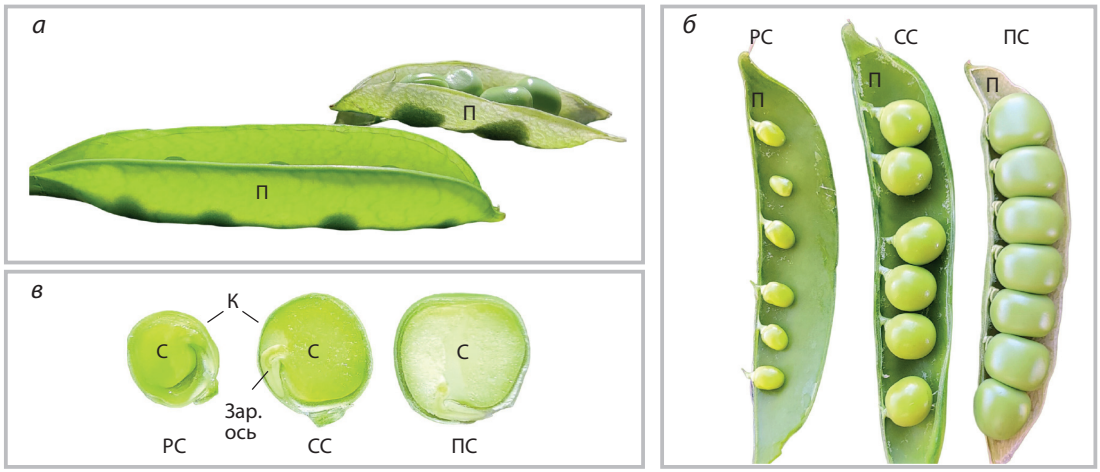


Рис. 1. Внешний видов плодов и семян гороха на ранней, средней и поздней стадиях созревания (РС, СС и ПС соответственно).

а – рисунок демонстрирует высокое светопропускание перикарпия; *б* – плоды с семенами; *в* – семена в продольном разрезе. П – перикарп; К – кожура; С – семядоли; зар. ось – зародышевая ось, включающая корень, гипокотиль, эпикотиль и почечку.

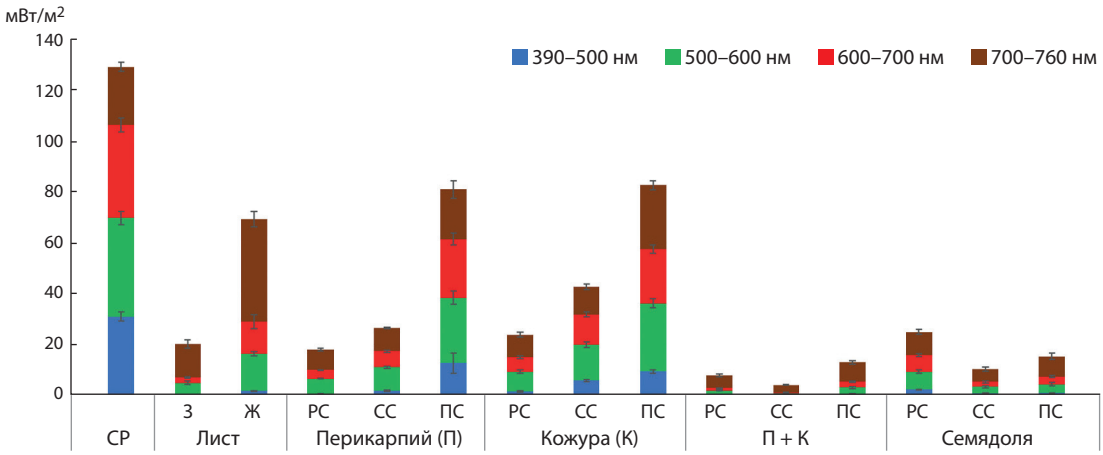


Рис. 2. Динамика светопропускания растительных тканей гороха на ранней (РС), средней (СС) и начале поздней стадиях (ПС) созревания семян.

Синие, зеленые, красные и коричневые столбики показывают спектральную плотность энергетической освещенности (мВт/ м^2) в диапазоне 390–500, 500–600, 600–700 и 700–760 нм соответственно. СР – солнечная радиация. Данные представлены как среднее арифметическое и его стандартное отклонение, полученные в трех биологических повторностях.

листья гороха полностью задерживали синий и красный свет в диапазонах, соответствующих максимумам поглощения хлорофиллов и каротиноидов, частично пропускали зеленый и желтый свет и полностью пропускали дальний красный свет (см. Приложение, *б*). При старении хлорофиллы разрушались и количество проходящего сквозь желтые листья синего и красного света увеличивалось (см. Приложение, *в*).

Зеленые ткани перикарпия и кожуры на средней стадии созревания по отдельности пропускали синий и красный свет (см. Приложение, *г*, *д*). Однако вместе они его задерживали, и в результате до семядолей в основном доходил свет в диапазоне 500–650 и 700–770 нм и небольшое количество света в диапазоне – 600–700 нм (см. Приложение, *е*). Высокое светопропускание («прозрачность») перикарпия можно визуально оценить на рис. 1, *а*.

Далее мы оценивали динамику светопропускания (рис. 2) и сопряженную с ней фотохимическую активность (рис. 3) при созревании семян гороха на ранней, средней и начале поздней стадиях созревания. Спектральная плотность энергетической освещенности солнечной радиации, которая достигала поверхности листьев и перикарпия плодов, составляла в среднем 136 мВт/м^2 (см. рис. 2). При этом количество синего и красного света (фотосинтетически активного спектрального диапазона) было равно 32 и 39 мВт/м^2 (1:1). Эти значения принимали за 100 % и далее рассчитывали в процентах количество «проходящего» света.

Листья. Фотохимическая активность зеленого листа была высокой ($Fv/Fm = 0.71 \pm 0.01$, $Y(II) = 0.65 \pm 0.01$) (см. рис. 3). Сквозь зеленый лист проходило 20 мВт/м^2 (15 %) (см. рис. 2). При этом синий свет не проходил совсем, а интенсивность проходящего красного света составляла 2 мВт/м^2 (5 %). При старении листа хлорофиллы разрушались и фотохимическая активность снижалась ($Fv/Fm = 0.33 \pm 0.03$, $Y(II) = 0.18 \pm 0.03$). В результате сквозь ста-

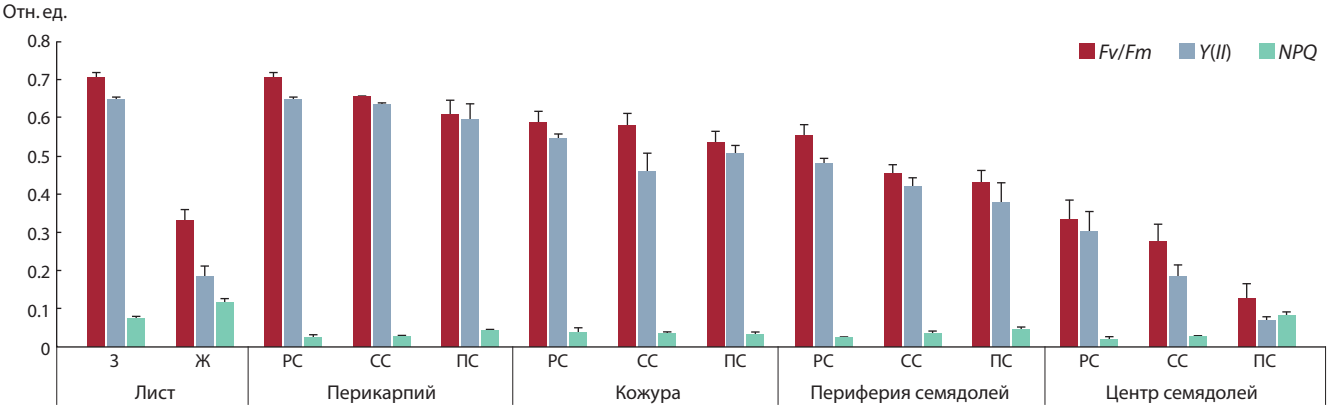


Рис. 3. Фотохимическая активность растительных тканей гороха на ранней (РС), средней (СС) и начале поздней стадиях (ПС) созревания семян. *Fv/Fm* и *Y(II)* – максимальный и эффективный квантовый выход ФС II соответственно. *NPQ* – нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофиллов. Данные представлены как среднее арифметическое и его стандартное отклонение, полученные в трех биологических повторностях. Двухфакторный дисперсионный анализ с повторениями (ANOVA) показал достоверные изменения по главному фактору «фотохимическая активность» ($F(2) = 1282$, $p < 0.001$), по главному фактору «растительные ткани» ($F(13) = 63$, $p < 0.001$) и по взаимодействию двух факторов ($F(26.84) = 19$, $p < 0.001$).

реющий желтый лист проходило уже 69 мВт/м^2 (51 %) с повышением доли синего и красного света до 1.7 мВт/м^2 (5 %) и 12.7 мВт/м^2 (32 %). Старение листа сопровождалось повышением показателя *NPQ*, характеризующего нефотохимическое тушение флуоресценции, с 0.07 ± 0.01 до 0.12 ± 0.01.

Перикарпий. На ранней стадии созревания семян перикарпий пропускал 18 мВт/м^2 (13 %), что близко к показателям зеленого фотосинтезирующего листа (см. рис. 2). Но доля синего и красного света, которые проходили сквозь перикарпий, была выше и составляла 0.5 мВт/м^2 (1.5 %) и 3.5 мВт/м^2 (8.9 %). Фотохимическая активность была высокой (на уровне зеленого листа) и была равна для $Fv/Fm = 0.69 \pm 0.02$ и для $Y(II) = 0.68 \pm 0.01$ (см. рис. 3). На средней стадии созревания семян количество света, проходящего через перикарпий, повышалось до 26 мВт/м^2 (19 %), а синего и красного света – до 1.8 мВт/м^2 (5.6 %) и 6.4 мВт/м^2 (16.4 %). Фотохимическая активность при этом снижалась незначительно ($Fv/Fm = 0.65 \pm 0.01$, $Y(II) = 0.64 \pm 0.01$). Более существенное снижение Fv/Fm происходило при переходе к поздней стадии созревания ($Fv/Fm = 0.61 \pm 0.04$, $Y(II) = 0.60 \pm 0.04$). При этом ткань перикарпия становилась еще более светопроницаемой: количество проходящего света повышалось до 81 мВт/м^2 (60 %), а синего и красного света – до 12.6 мВт/м^2 (39 %) и 23.1 мВт/м^2 (59 %).

Кожура. У кожуры от ранней к поздней стадии созревания семян показатели *Fv/Fm* и *Y(II)* существенно не менялись, но были немного ниже, чем у перикарпия (см. рис. 3). Общее количество проходящего света при этом увеличивалось от 24 до 83 мВт/м^2 (от 18 до 61 %), синего света – от 1.5 до 9.4 мВт/м^2 (от 4.6 до 24.1 %), красного света – от 5.7 до 21.4 мВт/м^2 (от 17.8 до 54.8 %) (см. рис. 2).

Семядоли. Вариант перикарпий + кожура (П + К) характеризует количество и спектральный состав света, который проходит через перикарпий, кожуру и достигает семядолей. На фотохимически активных ранней и средней стадиях созревания семян количество проходящего света составляло не более 8 мВт/м^2 (6 %), синий свет не поступал совсем, а красный был менее 1 мВт/м^2 (менее 2 %) (см. рис. 2). Удивительно, но даже при таких малых количествах световой энергии в семядолях, пусть и с низкой эффективностью, осуществлялись фотохимические процессы. Фотохимическую активность семядолей оценивали снаружи (на периферии) и внутри (для этого их разрезали продольно). На ранней стадии Fv/Fm был равен 0.55 ± 0.03 на периферии семядолей и 0.33 ± 0.05 внутри семядолей (см. рис. 3). На поздней стадии Fv/Fm снижался до 0.43 ± 0.03 на периферии семядолей и 0.13 ± 0.04 в центре семядолей, $Y(II)$ показывал сходную динамику, но был ниже, чем Fv/Fm. На этой стадии также наблюдалось повышение показателя *NPQ*, характеризующего нефотохимическое тушение флуоресценции, с 0.02 ± 0.01 до 0.08 ± 0.01.

Интересно, что семядоли также были проницаемы для солнечного света. На ранней стадии созревания они пропускали 25 мВт/м^2 (18 %), примерно столько же, сколько перикарпий и кожура (см. рис. 2). Но через них проходило больше синего (2.2 мВт/м^2, 6.9 %) и красного света (6.4 мВт/м^2, 16.4 %). Однако далее, по мере накопления запасных питательных веществ, количество проходящего света снижалось до 10–15 мВт/м^2 (8–10 %).

Обсуждение

Семена производят большое количество разнообразных запасных соединений, обеспечивая до 70 % необходимого человеку количества калорий прямо (в виде пищи) или косвенно (в форме кормов для животных) (Sreenivasulu, Wobus, 2013; Ingram et al., 2018; Mattana et al., 2022). Синтез запасных соединений, ограниченный низкой скоростью диффузии кислорода в плотных тканях семени, требует значительного количества энергии и ассимилятов, которые обеспечиваются за счет фотосинтеза (Walter, Kromdijk, 2021). При этом у многих видов растений, так называемых хлороэмбриофитов, для формирования семян необходимы не только фотосинтез листьев материнского растения, но и фотохимические процессы, обеспечивающие синтез АТФ и восстановление НАДФН$^+$ (Borisjuk et al., 2005; Weber et al., 2005; Puthur et al., 2013; Смоликова,

Медведев, 2016; Smolikova et al., 2018, 2020; Sela et al., 2020; Shackira et al., 2022; Cho et al., 2023).

Ранее мы показали, что синтез хлорофиллов и появление хлоропластов с хорошо развитой гранальной структурой в зародышах семян *P. sativum* происходят на самых ранних этапах эмбриогенеза (Smolikova et al., 2018, 2020). То есть, несмотря на то что формирующиеся семена покрыты семенной и плодовой оболочками, которые экранируют их от солнечного света, они получают достаточное количество света для синтеза хлорофиллов и формирования хлоропластов с развитой гранальной структурой. Однако оставался открытым вопрос о спектральном диапазоне светового потока, достигающего зеленого зародыша, и интенсивности освещения, при котором происходит их фотохимическая активность.

Объектом нашего исследования являлись семена гороха на ранней, средней и поздней стадиях созревания (см. рис. 1). С использованием спектрорадиометра и PAM-флуориметра мы провели сравнительный анализ светопропускания (см. рис. 2) и фотохимической активности (см. рис. 3) листьев, перикарпия, кожуры и семядолей формирующихся семян.

Известно, что в диапазоне от 400 до 700 нм зеленые листья растений в среднем поглощают около 85 % света, отражают около 10 % и пропускают около 5 % (Atwell et al., 1999). Однако эти показатели могут сильно варьировать в зависимости от вида растений и условий их произрастания. В наших экспериментах фотохимически активный зеленый лист гороха пропускал в среднем 15 % солнечной радиации (в диапазоне 390–760 нм); при этом синий свет задерживался листом полностью, а количество проходящего красного света составляло не более 5 %.

Фотохимически активная ткань перикарпия на ранней и средней стадиях созревания семян гороха пропускала к семенной кожуре от 13 до 19 % солнечной радиации; доля синего света составляла от 1.5 до 6 %, а доля красного света – от 9 до 16 %. К периферии формирующихся семядолей поступал свет в диапазоне 500–650 и 700–770 нм (6 % от солнечной радиации), при этом синий свет отсутствовал совсем, а количество красного света (620–700 нм) составляло около 2 %. При старении покровных тканей на поздней стадии созревания семян хлорофиллы в покровных тканях разрушались и количество проходящего красного света, достигающего семядолей, возрастало.

Интересно, что несмотря на низкую энергетическую освещенность, фотохимические процессы протекают даже в центре семядолей, хотя их эффективность невысока. При этом фотохимическая активность семядолей регистрируется при практически полном отсутствии синего света, низком уровне красного света и сравнительно высоком уровне желтого и зеленого света. На ранней стадии созревания семян показатель Fv/Fm был равен 0.55 ± 0.03 на периферии семядолей и 0.33 ± 0.05 внутри семядолей (см. рис. 3).

Чем можно объяснить фотохимическую активность семядолей при низких плотностях светового потока и спектральных диапазонах, которые не характерны для фотосинтеза листа? Мы предполагаем, что в семядолях формирующихся семян зеленый свет может частично компенсировать отсутствие синего света и тем самым повышать количество световой энергии. Эта компенсация может происходить в диапазоне 500–550 нм, световую энергию которого могут поглощать присутствующие в зародышах каротиноиды (Смоликова, Медведев, 2015).

Долгое время считалось, что свет в диапазоне 500–600 нм имеет второстепенное значение в биологии растения. Действительно, листья растений не поглощают фотоны равномерно по всему диапазону фотосинтетически активной радиации (ФАР), а спектральное поглощение зеленого света фотосистемами хлоропластов намного ниже по сравнению с синим и красным светом (Kume, 2017). Однако в последние годы появились доказательства того, что зеленый свет не только поглощается тканями растений, но и участвует в регуляции ряда физиологических реакций (Головацкая, Карначук, 2015; Smith et al., 2017). Предполагается, что синий и красный спектры преимущественно поглощаются поверхностными клетками столбчатого мезофилла листа, в то время как зеленый свет может проникать в более глубокие слои тканей листа, способствуя возбуждению фотосистем в клетках губчатого мезофилла (Nishio, 2000; Terashima et al., 2009; Brodersen, Vogelmann, 2010).

В работе (Liu, van Iersel, 2021) проведена оценка квантового выхода ассимилированного CO_2 (QY) в листьях салата, выращиваемого при разных спектральных диапазонах освещения (синий, зеленый, красный) и разной плотности фотосинтетического фотонного потока (PPFD, photosynthetic photon flux density) (30–1300 ммоль фотонов/м^2/с). Оказалось, что при высоком PPFD и освещении зеленым светом показатель QY был выше, чем при освещении синим и красным светом. Авторы предполагают, что это связано с тем, что при сильном освещении зеленый свет более равномерно распределяется внутри листа. В опытах на листьях подсолнечника также было показано, что при умеренном или сильном белом свете добавление зеленого света более эффективно стимулирует фотосинтез, чем добавление красного света (Terashima et al., 2009).

В недавно опубликованной работе X. Lv с коллегами (2022), выполненной на растениях *Zingiber officinale* Roscoe, показано, что добавление к белому спектру зеленого света не только способствовало увеличению фотохимических показателей Fv/Fm и $Y(II)$, но и приводило к увеличению количества крахмальных зерен и толщины листа. Интенсивный зеленый свет, с одной стороны, способствовал увеличению скорости потока электронов по электрон-транспортной цепи ФС II, а с другой стороны, не вызывал накопления АФК (что обычно происходит при световом стрессе, вызываемом красным светом). Авторы связывают это с более эффективным тепловым рассеиванием излишков энергии зеленого света.

В наших опытах установлено, что к периферии формирующихся семядолей поступает ФАР, который включает практически всю зеленую часть спектра, а также небольшое количество красного света. Не исключено, что проникающий сквозь толщу тканей зародышей зеленый свет может влиять на эффективность усвоения углерода и служить хорошим аргументом в пользу использования зеленых длин волн при выращивании сельскохозяйственных культур. Однако это гипотеза требует проведения дополнительных исследований.

Заключение

Полученные данные позволяют глубже понять механизмы протекания фотохимических процессов в зародышах семян в условиях низкой интенсивности света. Мы считаем, что интенсивность эмбриональных фотохимических реакций в значительной степени влияет на эффективность накопления запасных питательных веществ и поэтому может рассматриваться как маркер для селекции семян с улучшенными пищевыми качествами. Перспективными также являются исследования по оптимизации получения семян высокого качества путем усиления фотохимической активности их зародышей за счет варьирования параметров освещения.

Список литературы / References

Беседин А.Г. Прима – новый сорт гороха овощного. *Овощи России*. 2015;3(28):96-97
[Besedin A.G. Prima is a new cultivar of vegetable pea. *Ovoshchi Rossii = Vegetable Crops of Russia*. 2015;3(28):96-97 (in Russian)]

Булда О.В., Рассадина В.В., Алексейчук Г.Н., Ламан Н.А. Спектрофотометрический метод определения содержания каротиноидов, ксантофиллов и хлорофиллов в экстрактах семян растений. *Физиология растений*. 2008;55(4):604-611
[Bulda O.V., Rassadina V.V., Alekseichuk H.N., Laman N.A. Spectrophotometric measurement of carotenes, xanthophylls, and chlorophylls in extracts from plant seeds. *Russ. J. Plant Physiol*. 2008; 55(4):544-551. DOI 10.1134/S1021443708040171]

Головацкая И.Ф., Карначук Р.А. Роль зеленого света в жизнедеятельности растений. *Физиология растений*. 2015;62(6):776-791. DOI 10.7868/S0015330315060081
[Golovatskaya I.F., Karnachuk R.A. Role of green light in physiological activity of plants. *Russ. J. Plant Physiol*. 2015;62(6):727-740. DOI 10.1134/S1021443715060084]

Монтеверде Н.А., Любименко В.Н. О зеленом пигменте внутренней оболочки семян *Cucurbitaceae* и его отношении к хлорофиллу. *Изв. Санкт-Петербургского бот. сада*. 1909;9:2-3
[Monteverde N.A., Lyubimenko V.N. On the green pigment of the inner coat of *Cucurbitaceae* seeds and its relation to chlorophyll. *Izvestiya Sankt-Peterburgskogo Botanicheskogo Sada = Proceeding of the St. Petersburg Botanical Garden*. 1909;9:2-3 (in Russian)]

Смоликова Г.Н., Ламан Н.А., Борискевич О.В. Роль хлорофиллов и каротиноидов в устойчивости семян к абиотическим стрессорам. *Физиология растений*. 2011;58(6):817-825
[Smolikova G.N., Laman N.A., Boriskevich O.V. Role of chlorophylls and carotenoids in seed tolerance to abiotic stressors. *Russ. J. Plant Physiol*. 2011;58(6):965-973. DOI 10.1134/S1021443711060161]

Смоликова Г.Н., Медведев С.С. Каротиноиды семян: синтез, разнообразие и функции. *Физиология растений*. 2015;62(1):3-16. DOI 10.7868/S0015330315010133
[Smolikova G.N., Medvedev S.S. Seed carotenoids: Synthesis, diversity, and functions. *Russ. J. Plant Physiol*. 2015;62(1):1-13. DOI 10.1134/S1021443715010136]

Смоликова Г.Н., Медведев С.С. Фотосинтез в семенах хлороэмбриофитов. *Физиология растений*. 2016;63(1):3-16. DOI 10.7868/S0015330315060160
[Smolikova G.N., Medvedev S.S. Photosynthesis in the seeds of chloroembryophytes. *Russ. J. Plant Physiol*. 2016;63(1):1-12. DOI 10.1134/S1021443715060163]

Тихонов К.Г., Христин М.С., Климов В.В., Сундырева М.А., Креславский В.Д., Сидоров Р.А., Цыдендамбаев В.Д., Савченко Т.В. Структурные и функциональные особенности фотосинтетического аппарата хлорофилл-содержащих тканей виноградной лозы. *Физиология растений*. 2017;64(1):69-80. DOI 10.7868/S0015330316060117
[Tikhonov K.G., Khristin M.S., Klimov V.V., Sundireva M.A., Kreslavski V.D., Sidorov R.A., Tsidendambayev V.D., Savchenko T.V. Structural and functional characteristics of photosynthetic apparatus of chlorophyll-containing grape vine tissue. *Russ. J. Plant Physiol*. 2017;64(1):73-82. DOI 10.1134/S102144371606011X]

Яковлев М.С., Жукова Г.Я. Покрытосеменные растения с зеленым и бесцветным зародышем (хлоро- и лейкоэмбриофиты). Ленинград: Наука, 1973
[Yakovlev M.S., Zhukova G.Ya. Angiosperms with Green and Colorless Embryos (Chloro- and Leucoembryophytes). Leningrad: Nauka Publ., 1973 (in Russian)]

Allen D.K., Ohlrogge J.B., Shachar-Hill Y. The role of light in soybean seed filling metabolism. *Plant J.* 2009;58(2):220-234. DOI 10.1111/j.1365-313X.2008.03771.x

Allorent G., Osorio S., Ly Vu J., Falconet D., Jouhet J., Kuntz M., Fernie A.R., Lerbs-Mache S., Macherel D., Courtois F., Finazzi G. Adjustments of embryonic photosynthetic activity modulate seed fitness in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 2015;205(2):707-719. DOI 10.1111/nph.13044

Aschan G., Pfanz H. Non-foliar photosynthesis – A strategy of additional carbon acquisition. *Flora*. 2003;198(2):81-97. DOI 10.1078/0367-2530-00080

Atwell B.J., Kriedemann P.E., Turnbull C.G.N. (Eds.). Light use and leaf gas exchange. In: Plants in Action: Adaptation in Nature, Performance in Cultivation. Melbourne: Macmillan Education Australia, 1999;23-44

Belmonte M.F., Kirkbride R.C., Stone S.L., Pelletier J.M., Bui A.Q., Yeung E.C., Hashimoto M., Fei J., Harada C.M., Munoz M.D., Le B.H., Drews G.N., Brady S.M., Goldberg R.B., Harada J.J. Comprehensive developmental profiles of gene activity in regions and subregions of the Arabidopsis seed. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(5):E435-E444. DOI 10.1073/pnas.1222061110

Borisjuk L., Rolletschek H. The oxygen status of the developing seed. *New Phytol.* 2009;182(1):17-30. DOI 10.1111/j.1469-8137.2008.02752.x

Borisjuk L., Rolletschek H., Walenta S., Panitz R., Wobus U., Weber H. Energy status and its control on embryogenesis of legumes: ATP distribution within *Vicia faba* embryos is developmentally regulated and correlated with photosynthetic capacity. *Plant J.* 2003;36(3): 318-329. DOI 10.1046/j.1365-313X.2003.01879.x

Borisjuk L., Nguyen T.H., Neuberger T., Rutten T., Tschiersch H., Claus B., Feussner I., Webb A.G., Jakob P., Weber H., Wobus U., Rolletschek H. Gradients of lipid storage, photosynthesis and plastid differentiation in developing soybean seeds. *New Phytol.* 2005; 167(3):761-776. DOI 10.1111/j.1469-8137.2005.01474.x

Brazel A.J., Ó'Maoiléidigh D.S. Photosynthetic activity of reproductive organs. *J. Exp. Bot.* 2019;70(6):1737-1754. DOI 10.1093/jxb/erz033

Brodersen C.R., Vogelmann T.C. Do changes in light direction affect absorption profiles in leaves? *Funct. Plant Biol.* 2010;37(5):403. DOI 10.1071/FP09262

Cho Y.B., Stutz S.S., Jones S.I., Wang Y., Pelech E.A., Ort D.R. Impact of pod and seed photosynthesis on seed filling and canopy carbon gain in soybean. *Plant Physiol.* 2023;193(2):966-979. DOI 10.1093/plphys/kiad324

Flahault M.C. Sur la présence de la matiére verte dans les organes actuellement soustraits a l'influence de la lumiére. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 1879;26:249-259

Grulichova M., Sedlakova V., Trojan V., Hanacek P., Vyhnanek T. Correlation of photosynthetic pigments content with indicators of seed quality in the seeds of carrot, celery, dill, parsley, and parsnip. *J. Seed Sci.* 2022;44(3):e202244031. DOI 10.1590/2317-1545v44260767

Henry R.J., Furtado A., Rangan P. Pathways of photosynthesis in non-leaf tissues. *Biology (Basel).* 2020;9(12):438. DOI 10.3390/biology9120438

Hofmeister W. Neue Beiträge zur Kenntniss der Embryobildung der Phanerogamen. I. Dikotyledonen mit ursprünglich einzelligem, nur durch Zellteilung waschsendem Endosperm. *Abhandl. Königl. Sächs. Ges. Wiss*. 1859;6:535-672

Hu L., Zhang Y., Xia H., Fan S., Song J., Lv X., Kong L. Photosynthetic characteristics of non-foliar organs in main C_3 cereals. *Physiol. Plant.* 2019;166(1):226-239. DOI 10.1111/ppl.12838

Hu Y., Zhang Y., Yu W., Hänninen H., Song L., Du X., Zhang R., Wu J. Novel insights into the influence of seed sarcotesta photosynthesis on accumulation of seed dry matter and oil content in *Torreya grandis* cv. "Merrillii". *Front. Plant Sci.* 2018;8:2179. DOI 10.3389/fpls.2017.02179

Ingram G., North H., Lepiniec L. Seeds as perfect factories for developing sustainable agriculture. *Plant Reprod.* 2018;31(3):201-202. DOI 10.1007/s00497-018-0340-7

Kremnev D., Strand Ã. Plastid encoded RNA polymerase activity and expression of photosynthesis genes required for embryo and seed development in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* 2014;5. DOI 10.3389/fpls.2014.00385

Kume A. Importance of the green color, absorption gradient, and spectral absorption of chloroplasts for the radiative energy balance of leaves. *J. Plant Res.* 2017;130(3):501-514. DOI 10.1007/s10265-017-0910-z

Le B.H., Cheng C., Bui A.Q., Wagmaister J.A., Henry K.F., Pelletier J., Kwong L., Belmonte M., Kirkbride R., Horvath S., Drews G.N., Fischer R.L., Okamuro J.K., Harada J.J., Goldberg R.B. Global analysis of gene activity during Arabidopsis seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107(18):8063-8070. DOI 10.1073/pnas.1003530107

Liu J., van Iersel M.W. Photosynthetic physiology of blue, green, and red light: light intensity effects and underlying mechanisms. *Front. Plant Sci.* 2021;12:619987. DOI 10.3389/fpls.2021.619987

Lv X., Gao S., Li N., Lv Y., Chen Z., Cao B., Xu K. Comprehensive insights into the influence of supplemental green light on the photosynthesis of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Protoplasma*. 2022;259(6):1477-1491. DOI 10.1007/s00709-022-01748-z

Mattana E., Ulian T., Pritchard H.W. Seeds as natural capital. *Trends Plant Sci.* 2022;27(2):139-146. DOI 10.1016/j.tplants.2021.08.008

MINI-PAM-II: Manual for Standalone Use, 3rd ed. Effeltrich (Germany): Heinrich Walz GmbH, 2018

Neuhaus H.E., Emes M.J. Nonphotosynthetic metabolism in plastids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2000;51:111-140. DOI 10.1146/annurev.arplant.51.1.111

Nishio J.N. Why are higher plants green? Evolution of the higher plant photosynthetic pigment complement. *Plant Cell Environ.* 2000;23(6):539-548. DOI 10.1046/j.1365-3040.2000.00563.x

Puthur J.T., Shackira A.M., Saradhi P.P., Bartels D. Chloroembryos: A unique photosynthesis system. *J. Plant Physiol.* 2013;170(13):1131-1138. DOI 10.1016/j.jplph.2013.04.011

Ruuska S.A., Schwender J., Ohlrogge J.B. The capacity of green oilseeds to utilize photosynthesis to drive biosynthetic processes. *Plant Physiol.* 2004;136:2700-2709. DOI 10.1104/pp.104.047977.green

Sela A., Piskurewicz U., Megies C., Mène-Saffrané L., Finazzi G., Lopez-Molina L. Embryonic photosynthesis affects post-germination plant growth. *Plant Physiol.* 2020;182(4):2166-2181. DOI 10.1104/PP.20.00043

Shackira A.M., Sarath N.G., Aswathi K.P.R., Pardha-Saradhi P., Puthur J.T. Green seed photosynthesis: What is it? What do we know about it? Where to go? *Plant Physiol. Rep*. 2022;27(4):573-579. DOI 10.1007/s40502-022-00695-4

Simkin A.J., López-Calcagno P.E., Raines C.A. Feeding the world: improving photosynthetic efficiency for sustainable crop production. *J. Exp. Bot.* 2019;70(4):1119-1140. DOI 10.1093/jxb/ery445

Simkin A.J., Faralli M., Ramamoorthy S., Lawson T. Photosynthesis in non-foliar tissues: implications for yield. *Plant J.* 2020;101(4):1001-1015. DOI 10.1111/tpj.14633

Smith H.L., McAusland L., Murchie E.H. Don't ignore the green light: exploring diverse roles in plant processes. *J. Exp. Bot.* 2017;68(9):2099-2110. DOI 10.1093/jxb/erx098

Smolikova G., Dolgikh E., Vikhnina M., Frolov A., Medvedev S. Genetic and hormonal regulation of chlorophyll degradation during maturation of seeds with green embryos. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(9):1993. DOI 10.3390/ijms18091993

Smolikova G., Kreslavski V., Shiroglazova O., Bilova T., Sharova E., Frolov A., Medvedev S. Photochemical activity changes accompanying the embryogenesis of pea (*Pisum sativum*) with yellow and green cotyledons. *Funct. Plant Biol.* 2018;45(2):228-235. DOI 10.1071/FP16379

Smolikova G., Shiroglazova O., Vinogradova G., Leppyanen I., Dinastiya E., Yakovleva O., Dolgikh E., Titova G., Frolov A., Medvedev S. Comparative analysis of the plastid conversion, photochemical activity and chlorophyll degradation in developing embryos of green-seeded and yellow-seeded pea (*Pisum sativum*) cultivars. *Funct. Plant Biol.* 2020;47(5):409-424. DOI 10.1071/FP19270

Spencer M.W.B.B., Casson S.A., Lindsey K. Transcriptional profiling of the Arabidopsis embryo. *Plant Physiol.* 2007;143(2):924-940. DOI 10.1104/pp.106.087668

Sreenivasulu N., Wobus U. Seed-development programs: a systems biology-based comparison between dicots and monocots. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2013;64(1):189-217. DOI 10.1146/annurev-arplant-050312-120215

Terashima I., Fujita T., Inoue T., Chow W.S., Oguchi R. Green light drives leaf photosynthesis more efficiently than red light in strong white light: revisiting the enigmatic question of why leaves are green. *Plant Cell Physiol.* 2009;50(4):684-697. DOI 10.1093/pcp/pcp034

Tschiersch H., Borisjuk L., Rutten T., Rolletschek H. Gradients of seed photosynthesis and its role for oxygen balancing. *BioSystems*. 2011;103(2):302-308. DOI 10.1016/j.biosystems.2010.08.007

Walter J., Kromdijk J. Here comes the sun: How optimization of photosynthetic light reactions can boost crop yields. *J. Integr. Plant Biol.* 2021;64(2):564-591. DOI 10.1111/jipb.13206

Wang C., Yang J., Chen W., Zhao X., Wang Z. Contribution of the leaf and silique photosynthesis to the seeds yield and quality of oilseed rape (*Brassica napus* L.) in reproductive stage. *Sci. Rep.* 2023;13(1):4721. DOI 10.1038/s41598-023-31872-6

Ward K., Scarth R., Daun J.K., Thorsteinson C.T. Characterization of chlorophyll pigments in ripening canola seed (*Brassica napus*). *J. Am. Oil Chem. Soc*. 1994;71(12):1327-1331. DOI 10.1007/BF02541349

Weber H., Borisjuk L., Wobus U. Molecular physiology of legume seed development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2005;56:253-279. DOI 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144201

Wu X.L., Liu Z.H., Hu Z.H., Huang R.Z. BnWRI1 coordinates fatty acid biosynthesis and photosynthesis pathways during oil accumulation in rapeseed. *J. Integr. Plant Biol.* 2014;56(6):582-593. DOI 10.1111/jipb.12158

Yakovlev M.S., Zhukova G.Y. Chlorophyll in embryos of angiosperm seeds, a review. *Bot. Notiser.* 1980;133:323-336

Yanykin D., Sundyreva M., Khorobrykh A., Semenova G., Savchenko T. Functional characterization of the corticular photosynthetic apparatus in grapevine. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 2020;1861(11):148260. DOI 10.1016/j.bbabio.2020.148260

ORCID
G.N. Smolikova orcid.org/0000-0001-5238-1851
A.M. Kamionskaya orcid.org/0000-0001-9815-9578
S.S. Medvedev orcid.org/0000-0003-1127-1343

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-26-00273 (https://rscf.ru/project/22-26-00273).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 02.08.2023. После доработки 10.09.2023. Принята к публикации 28.09.2023.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023;27(8):988-999
DOI 10.18699/VJGB-23-114

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

Изучение устойчивости к бурой ржавчине, урожайности и качества зерна у образцов коллекции мягкой пшеницы в экологических условиях Новосибирской области

Л.П. Сочалова[1], В.А. Апарина[1], Н.И. Бойко[1], Е.В. Зуев[3], Е.В. Морозова[1], К.К. Мусинов[1], Н.А. Виниченко[2], И.Н. Леонова[2, 4], В.В. Пискарев[1] ✉

[1] Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции – филиал Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, р.п. Краснообск, Новосибирская область, Россия
[2] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[3] Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия
[4] Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия
✉ piskaryov_v@mail.ru

Аннотация. К основным факторам, влияющим на формирование высокого урожая, относятся связь генотипа сорта с условиями произрастания и фитопатогенная нагрузка, что необходимо учитывать в селекции для поиска доноров устойчивости и высокой выраженности ценных признаков. Изучение устойчивости 49 образцов мягкой пшеницы к поражению бурой ржавчиной проведено в полевых условиях естественного инфекционного фона и в лабораторных условиях к монопустульным изолятам с вирулентностью к генам *Lr9* и *Lr24*. Показано, что сорта, несущие чужеродные гены *Lr6Agi2* (Тулайковская 10) и *Lr6Agi1* (Воевода), устойчивы к поражению бурой ржавчиной как в полевых условиях, так и при заражении в лаборатории. Сорта KWS Buran, KWS Akvilon, KW 240-3-13 и Этюд, которые формировали урожайность от 417 до 514 г/м^2 – на уровне лучшего стандарта Сибирской 17, целесообразно использовать в условиях Западной Сибири в качестве доноров гена устойчивости *Lr24*. Донором генов устойчивости *Lr19* и частично эффективного *Lr26* может служить сорт Омская 44, характеризующийся урожайностью 440 г/м^2. Сорта Тулеевская и Алтайская 110, в геноме которых содержится ген *Lr9*, рекомендуется использовать при создании генотипов с пирамидой генов устойчивости. Наиболее высокие показатели содержания белка и клейковины выявлены у образца CS2A/2M, наименьшие – у сортообразцов KWS Buran, Алтайская 110, Волгоуральская и KWS Akvilon. Сравнение коллекции образцов мягкой пшеницы по микро- (Cu, Mn, Zn, Fe) и макроэлементам (Ca, Mg, K) продемонстрировало наиболее высокие показатели у группы, состоящей из образцов CS2A/2M, Тулайковская 10, Pavon и Тулеевская. Наименьшие показатели большинства элементов определены у сортов KWS Buran, Новосибирская 15 и Волгоуральская. Озимые сорта, характеризующиеся устойчивостью к поражению бурой ржавчиной в условиях инфекционного фона, как правило, несут возрастные гены устойчивости (*Lr34*, *Lr12* и *Lr13*), в том числе в сочетании с ювенильным геном *Lr26*. У линии с озимым типом развития (KS 93 U 62) выявлен ген *Lr41*, благодаря чему линия сохраняла устойчивость к поражению клоном патогена бурой ржавчины кLr24, несмотря на наличие в ее генотипе гена *Lr24*. Сорта Дока и Чешская 17 могут быть донорами генов устойчивости *Lr26*+*Lr34* и *Lr9*+*Lr12*+*Lr13*+*Lr34* и источниками короткостебельности без снижения зимостойкости и урожайности в условиях Западной Сибири.
Ключевые слова: пшеница мягкая; бурая ржавчина; популяция; изолят; вирулентность; ген устойчивости; урожайность; микроэлемент; макроэлемент; белок; клейковина.

Для цитирования: Сочалова Л.П., Апарина В.А., Бойко Н.И., Зуев Е.В., Морозова Е.В., Мусинов К.К., Виниченко Н.А., Леонова И.Н., Пискарев В.В. Изучение устойчивости к бурой ржавчине, урожайности и качества зерна у образцов коллекции мягкой пшеницы в экологических условиях Новосибирской области. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(8):988-999. DOI 10.18699/VJGB-23-114

Studying a collection of common-wheat varieties for leaf rust resistance, crop yield and grain quality in the environmental conditions of Novosibirsk region

L.P. Sochalova[1], V.A. Aparina[1], N.I. Boyko[1], E.V. Zuev[3], E.V. Morozova[1], K.K. Musinov[1], N.A. Vinichenko[2], I.N. Leonova[2, 4], V.V. Piskarev[1] ✉

[1] Siberian Research Institute of Plant Production and Breeding – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia
[2] Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
[3] Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia
[4] Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia
✉ piskaryov_v@mail.ru

© Сочалова Л.П., Апарина В.А., Бойко Н.И., Зуев Е.В., Морозова Е.В., Мусинов К.К., Виниченко Н.А., Леонова И.Н., Пискарев В.В., 2023
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

Abstract. The relationship between a variety's genotype, environmental conditions and phytopathogenic load are the key factors contributing to high yields that should be taken into account in selecting donors for resistance and high manifestation of valuable traits. The study of leaf rust resistance in 49 common wheat varieties was carried out in the field against the natural pathogen background and under laboratory conditions using single-pustule isolates with virulence to *Lr9* and *Lr24*. It has been shown that the varieties carrying alien genes *Lr6Agi2* (Tulaikovskaya 10) and *Lr6Agi1* (Voevoda) were resistant to leaf rust infection both in the field and in the laboratory. Varieties KWS Buran, KWS Akvilon, KW 240-3-13, and Etyud producing crop yields from 417 to 514 g/m^2 comparable to the best standard variety Sibirskaya 17 can be reasonably used as *Lr24* resistance gene donors under West Siberian conditions. Omskaya 44 variety showing crop yield of 440g/m^2 can be used as a donor for *Lr19* and partially effective *Lr26*. Varieties Tuleevskaya and Altayskaya 110 with *Lr9* in their genomes are recommended for the development of resistance gene-pyramided genotypes. The highest protein and gluten contents were observed in the CS2A/2M sample, while KWS Buran, Altayskaya 110, Volgouralskaya, and KWS Akvilon showed the lowest values. Varieties CS2A/2M, Tulaikovskaya 10, Pavon, and Tuleevskaya were ranked the highest in micro- (Cu, Mn, Zn, Fe) and macronutrient (Ca, Mg, K) contents among the common wheat samples from the collection, while the lowest values for most elements were observed in KWS Buran, Novosibirskaya 15, and Volgouralskaya. Winter varieties demonstrating leaf rust resistance against the infectious background typically carry adult plant resistance genes (*Lr34*, *Lr12*, and *Lr13*), particularly combined with the juvenile *Lr26* gene. The presence of *Lr41* in a winter type line (KS 93 U 62) allowed it to maintain resistance against a leaf rust pathogen clone kLr24, despite the presence of *Lr24* in the genotype. Varieties Doka and Cheshskaya 17 may act as donors of resistance genes *Lr26*+*Lr34* and *Lr9*+*Lr12*+*Lr13*+*Lr34*, as well as sources of dwarfing without losses in winter hardiness and yield under West Siberian conditions.
Key words: common wheat; leaf rust; population; isolate; virulence; resistance gene; yield; microelement; macroelement; protein; gluten.

For citation: Sochalova L.P., Aparina V.A., Boyko N.I., Zuev E.V., Morozova E.V., Musinov K.K., Vinichenko N.A., Leonova I.N., Piskarev V.V. Studying a collection of common-wheat varieties for leaf rust resistance, crop yield and grain quality in the environmental conditions of Novosibirsk region. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(8):988-999. DOI 10.18699/VJGB-23-114

Введение

Пшеница мягкая (*Triticum aestivum* L.) – основная продовольственная культура во всем мире. Культура характеризуется сбалансированным составом белка, крахмала, клетчатки, жира, минеральных элементов, содержит витамины группы С, В, А, бета-каротин, Е, Д, К (Roshan et al., 2016), а также отличается приспособленностью к условиям произрастания (Прянишников, 2018). По данным Росстата за 2022 г., яровые сорта пшеницы в Новосибирской области занимают 222,808 га посевных площадей с урожайностью 21 ц/га. Озимые сорта выращивают на площади около 34,000 га с урожайностью 28 ц/га. К основными факторам, влияющим на формирование высокого урожая, относятся связь генотипа сорта с условиями произрастания (Мальчиков, Мясникова, 2012) и фитопатогенная нагрузка на сорт. Для создания высокоурожайного сорта необходимо учитывать эти факторы и вести поиск доноров устойчивости и высокой выраженности хозяйственно ценных признаков (Волкова и др., 2016).

Одним из главных заболеваний, поражающих посевы мягкой пшеницы в Западной Сибири, является возбудитель бурой ржавчины пшеницы, поражающий как озимые, так и яровые формы, что снижает урожайность в годы эпифитотий до 15–40 % (Kolmer et al., 2015). При создании и использовании доноров генов устойчивости предъявляются определенные требования, поскольку применение идентичных генов у яровых и озимых сортов для защиты от поражения может привести к сильным эпифитотиям в случае преодоления патогеном защитных механизмов, определяемых наличием гена (Волкова и др., 2016; Пожерукова и др., 2019). В связи с этим для защиты от поражения патогеном озимых и яровых сортов необходимо использовать различные эффективные гены устойчивости или их сочетания, что подразумевает постоянный поиск новых генов устойчивости.

В мире идентифицировано более 80 *Lr*-генов, и около 50 % из них относятся к чужеродным[1]. В коммерческих сортах мягкой пшеницы используют гены *Lr9*, *Lr19*, *Lr21*, *Lr23*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr28*, *Lr37*, *Lr39* (Aktar-Uz-Zaman et al., 2017; Леонова, 2018), *Lr6Agi1*, *Lr6Agi2* (Sibikeev et al., 2017) и *LrSp2* (Adonina et al., 2018). В России представляют практический интерес для селекции образцы, несущие частично эффективные (*Lr9*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr26*, *Lr6Agi1*, *Lr6Agi2*) и высокоэффективные (*Lr28*, *Lr29*, *Lr39*, *Lr42*, *Lr45*, *Lr47*, *Lr50*, *Lr51*, *Lr66*, *LrSp2*) для защиты от поражения гены (Гультяева, Шайдаюк, 2021; Сочалова и др., 2022).

Используя в гибридизации сорта пшеницы, несущие гены устойчивости от родственных видов (*Aegilops*, *Agropyron*, *Secale cereale* и др.), можно расширить разнообразие генов устойчивости, при этом такие гены часто связаны с факторами, снижающими урожайность или ухудшающими ее качество (Маркелова, 2007; Крупин и др., 2019). Выявлено, что наличие фрагмента, несущего ген *Lr9* (перенесен от *Aegilops umbellulata*), снижает урожайность в условиях США (Friebe et al., 1996), при этом в России имеются коммерческие сорта с этим геном (Гультяева, Шайдаюк, 2021). Наличие чужеродного материала (ген *Y*, детерминирующий увеличение синтеза желтого пигмента в эндосперме), сцепленного с геном *Lr19* (перенесен от *Agropyron elongatum*), снижало ценность первых доноров с этим геном (Knott, 1968). Позже локус, несущий *Lr19/Sr25* и ген *Y*, удалось разделить при использовании

[1] Komugi – wheat genetic resources database. Доступно: https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassListAction.do?geneClassificationId=89 (дата обращения 09.03.2023).

делеционных по локусу *ph1b* линий (Marais, 1992; Zhang et al., 2005). При этом сегмент хромосомы, несущий ген *Lr19*, положительно влияет на урожайность (Singh et al., 1998), и в России ряд сортов с ним (Гультяева, Шайдаюк, 2021) выращивается в производстве. Наличие в геноме пшеницы фрагмента генома, несущего ген *Lr38* (от *Thinopyrum intermedium*), приводит к значительному снижению урожайности (Mebrate et al., 2008), как и наличие сегмента хромосомы, содержащего ген *Lr47* (от *Aegilops speltoides*), который дополнительно негативно сказывается на качестве (Brevis et al., 2008). Введение в сорта пшенично-ржаной транслокации 1B.1R, несущей гены *Lr26*, *Pm8*, *Sr31*, приводит к ухудшению качества муки и хлеба (Kumlay et al., 2003). Значительно упрощает работу селекционера использование уже существующих линий или сортов мягкой пшеницы с чужеродными транслокациями без получения нового селекционного материала с первичным переносом от родственных видов (Тимонова и др., 2012). Это можно объяснить тем, что не все первичные переносы оказываются успешными, часть транслокаций теряется у потомства при последующей репродукции (Давоян и др., 2015).

Один из принципов подбора пар для скрещивания основан на эколого-географических различиях, что объясняется большим разнообразием генотипов, получаемых в результате трансгрессий в расщепляющихся поколениях при скрещивании двух сортообразцов, созданных и адаптированных к различным условиям (Вьюшков, 2004). При этом необходимо выявлять адаптивность инорайонных образцов к местным условиям (Давыдова, Казаченко, 2013), так как привлечение экологически отдаленных образцов с низкой адаптивностью приводит к появлению в потомстве значительного количества генотипов с низкой продуктивностью, что затрудняет создание коммерческих сортов (Souza, Sorrells, 1991). Использование в качестве доноров стародавних сортов осложняется их малой изученностью, а также полиморфностью, так как они создавались как популяции и являются многолинейными. Поэтому в качестве исходного материала лучше применять современные сорта инорайонной и иностранной селекции после предварительного всестороннего изучения в той местности, для которой планируется вести селекцию.

В связи с вышеизложенным считаем, что поиск доноров генов устойчивости к бурой ржавчине пшеницы остается актуальным в тесной связи с почвенно-климатическими условиями, для которых будут создаваться сорта, и типом развития. Цель исследования заключалась в комплексном изучении коллекционных образцов мягкой пшеницы в Новосибирской области для выявления доноров эффективных генов устойчивости к поражению *Puccinia triticina* Erikss.

Материалы и методы

Материалом исследования служили коллекционные образцы мягкой пшеницы – 24 яровой и 25 озимой, из них 41 образец из мировой коллекции ВИР и 8 новых яровых сортов, в последние годы испытываемых на госсортоучастках Новосибирской области.

Полевая устойчивость образцов к поражению распространенными в регионе листовыми патогенами была изучена в условиях естественного распространения инфекции по методике ВИР (Мережко и др., 1999) и искусственно усиленного инфекционного фона (посев восприимчивых сортов озимой пшеницы, опрыскивание посевов в ранние утренние часы водой и смесью урединиоспор при появлении заболевания). Оценку урожайности образцов и ее составляющих (масса 1000 зерен, масса зерна колоса, число зерен колоса) проводили в течение 2–4 лет (в годы изучения образцов в коллекционных питомниках в 2015–2020 гг.) по методике ВИР, разработанной для изучения новых поступлений (Мережко и др., 1999). Устойчивость образцов к поражению бурой ржавчиной пшеницы в ювенильной стадии (фаза 1-го листа) изучали в лабораторных условиях СибНИИРС (р.п. Краснообск) на отсеченных отрезках листьев (Михайлова, Квитко, 1979). Инокуляцию проводили водной суспензией урединиоспор местной (Новосибирская область) популяции *P. triticina*, собранных в 2020 г. с сортов пшеницы, выращиваемых в естественных условиях на полях СибНИИРС (вирулентность для сортов и линий с генами *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2c*, *Lr3a*, *Lr9*, *Lr16*, *Lr3ka*, *Lr11*, *Lr17*, *Lr30*, *Lr2b*, *Lr3bg*, *Lr14a*, *Lr14b*, *Lr15*, *Lr18*, *Lr20*; авирулентность – *Lr24*, *Lr19*, *Lr41*, *Lr45*, *Lr47*, *Lr28*, *Lr6Agi1*, *Lr6Agi2*, *LrSp2* и *Lr26*) и двумя тест-клонами: кLr24 (вирулентность – *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2c*, *Lr3*, *Lr3ka*, *Lr11*, ***Lr24***, *Lr17*, *Lr30*, *Lr2b*, *Lr3bg*, *Lr14a*, *Lr14b*, *Lr15*, *Lr18*, *Lr20*; авирулентность – *Lr9*, *Lr16*, *Lr26*, *Lr19*) и кLr9 (вирулентность – *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2c*, *Lr3*, ***Lr9***, *Lr16*, *Lr3ka*, *Lr11*, *Lr17*, *Lr30*, *Lr2b*, *Lr3bg*, *Lr14a*, *Lr14b*, *Lr15*, *Lr18*, *Lr20*; авирулентность – *Lr24*, *Lr26*, *Lr19*). Клон с вирулентностью *p24* был выделен с сорта Новосибирская 15 при изучении расового состава популяции Куйбышевского района Новосибирской области. Клон с вирулентностью *p9* выделен с сорта Челяба 2 (*Lr9*), выращиваемого в коллекционном питомнике в р.п. Краснообск. Тест-сортами на заражение являлись Agent (с *Lr24*) и Удача (с *Lr9*). Тип реакции на заражение патогеном определяли на 8–10-й день после инокуляции по шкале E.B. Mains и H.S. Jackson (1926). Реакции 0, 1, 2 – устойчивые, 3, 4 – восприимчивые, X – гетерогенные (Mains, Jackson, 1926). Вирулентность популяции и клонов установлена на изогенных линиях Thatcher и сортах, несущих известные гены. Поражение образцов в условиях усиленного инфекционного фона определяли в процентах по количественной шкале R.F. Peterson и коллег (1948). В качестве контроля реакции восприимчивости в поле и лаборатории использовали сорт Новосибирская 15.

Суммарную ДНК выделяли из 5–7-дневных проростков по методу J. Plaschke и коллег (1995). Генотипирование сортов пшеницы проводили с применением ДНК-маркеров, разработанных для генов устойчивости к бурой ржавчине пшеницы (Приложение 1[2]). Содержание белка и клейковины определяли на инфракрасном экспресс-анализаторе OmegAnalyzer G (Bruins Instruments, Германия). Содержание макро- и микроэлементов оценивали методом атомно-абсорбционной спектрометрии на приборе ContrAA 800 D (Analytik Jena, Германия).

Статистическая обработка результатов выполнена с использованием пакета программ Statistica 10.0 и MS Excel.

[2] Приложения 1 и 2 см. по адресу:
https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2023-27/appx33.pdf

Результаты

В результате оценки поражения сортообразцов пшеницы бурой ржавчиной на инфекционном фоне в 2020 г. были выделены 20 яровых и 21 озимый образец, поражение которых не превышало 10 % (табл. 1). Сорта Зауралочка, Удача, Алтайская 110 и Тулеевская, несущие ген *Lr9*, в условиях инфекционного участка поражались до 100 % на уровне стандарта восприимчивости (сорт Новосибирская 15). При этом в условиях естественного распространения инфекции почти все характеризовались как среднеустойчивые (5 баллов) в годы с максимальным распространением патогена (табл. 2). В ювенильной фазе устойчивость к поражению популяцией *P. triticina* сохраняли 20 яровых и лишь 10 озимых сортообразцов пшеницы (Amigo, KS 93 U 50, KS 90 WGRC 10, KS 93 U 40, KS 93 U 62, Поэма, Айвина, Коллега, Первица, Восторг), что предполагает наличие генов возрастной устойчивости у остальных 11 озимых форм (Княгиня Ольга, Дока, Лебедь, Кума, Батько, Гром, Лидия, CO 07 W 245, Ritter, Чешская 16 и Чешская 17 (см. табл. 1).

По результатам молекулярного тестирования сортов с использованием маркеров, разработанных для генов устойчивости *Lr1*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr12*, *Lr13*, *Lr16*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr28*, *Lr34*, *Lr41* и *Lr47*, подтверждено наличие постулированных по литературным данным генов у большей части изученных сортов. Кроме того, нами установлено, что сорта KWS Buran и KW 240-3-13, изучаемые в коллекционных питомниках, как и другие современные сорта из Евросоюза (KWS Akvilon и KWS Torridon), несут ген *Lr24*. Стоит отметить, что сорт KW 240-3-13 был поражен клоном кLr9, но не заразился клоном кLr24 (2 балла, тип реакции – умеренно устойчивый), тогда как сорт KWS Buran характеризовался гетерогенным поражением при заражении клоном кLr24 и был устойчив к поражению клоном кLr9.

Сорта саратовской селекции Тулайковская 10 и Воевода, несущие чужеродные гены *Lr6Agi2* и *Lr6Agi1*, сохраняли устойчивость к поражению в полевых условиях (в том числе на инфекционном фоне) и при заражении клоном с вирулентностью к гену *Lr24*. В открытых литературных источниках нами не найдена информация о генах устойчивости к бурой ржавчине пшеницы, которые несет сорт Н 15-3, при этом он характеризовался иммунностью как на инфекционном фоне, так и при лабораторном тестировании. По результатам генотипирования этого сорта с использованием молекулярных ДНК-маркеров выявлены гены устойчивости *Lr12* + *Lr16* + *Lr26* + *Lr34*.

В геномах озимых линий Канзасского университета (США) (KS 90 WGRC 10 и KS 93 U 62) обнаружен ген *Lr41*. Его наличие позволяет сохранять устойчивость линии KS 93 U 62 к поражению клоном кLr24, несмотря на то что линия кроме данного гена несет ген *Lr24*. Линия KS 93 U 40, характеризующаяся наличием двух *Lr*-генов (*Lr19* + *Lr24*), также сохраняла устойчивость к поражению клоном кLr24, как и яровые сорта, несущие ген *Lr19* (Юлия, Волгоуральская, Добрыня). При этом линия KS 93 U 50, у которой, по литературным данным, выявлены гены *Lr26* и *Lr24*, была восприимчива к клону кLr24, но сохраняла устойчивость к поражению в условиях инфекционного фона при заражении как естественной популяцией, так и клоном кLr9. Гены *Lr19* и *Lr26* в генотипе ярового сорта Омская 44 также эффективно защищали растения от поражения бурой ржавчиной как клонами, так и природной популяцией.

Любопытные результаты получены для сортообразцов с озимым типом развития, характеризующимся различными сочетаниями генов устойчивости. Так, сочетание гена возрастной устойчивости *Lr34* с геном ювенильной устойчивости *Lr26* у сортов Коллега, Поэма, Айвина и Дока позволяет им сохранять устойчивость как в условиях инфекционного фона, так и при заражении клонами (см. табл. 1). При этом сорт Лебедь, дополнительно несущий к генам *Lr26* и *Lr24* ген *Lr13* (возрастной устойчивости), поражался клонами и популяцией в ювенильной стадии и был устойчив к поражению патогеном в условиях инфекционного фона в поле. Схожая реакция наблюдалась у сортов Лидия, Чешская 16 и CO 07 W 245, в геноме которых выявлены два гена возрастной устойчивости (*Lr13* + *Lr34*).

Эффективное использование доноров устойчивости предполагает их приспособленность к условиям региона. Поэтому нами проведен анализ урожайности и выраженности количественных признаков ряда сортов, которые испытывались в различных опытах в разные годы. Для анализа взяты сорта и линии, которые были изучены не менее двух лет. По результатам полевой оценки хозяйственно ценных признаков выделялись образцы яровой пшеницы с высокой урожайностью: Воевода (509.8 г/м^2), KW 240-3-13 (514.1 г/м^2) и Алтайская 110 (580.0 г/м^2) (см. табл. 2). Сорта Воевода и Алтайская 110, кроме того, формировали высокопродуктивный колос (1.69 и 2.00 г) и большое количество зерен в колосе (41.4 и 48.5 шт. соответственно). Сорт KW 240-3-13 формировал крупное зерно с высокой массой 1000 зерен (45.1 г). Также выделялись сорта Волгоуральская (высокая озерненность колоса – 39.1 шт.) и Челяба 75 (масса 1000 зерен – 45.3 г). При высокой интенсификации земледелия особое внимание уделяют низкостебельным сортам. Для использования в селекции при создании сортов интенсивного типа в сочетании с устойчивостью к бурой ржавчине пшеницы можно рекомендовать сорта Этюд, KWS Akvilon, KWS Torridon и Тулайковская 10, которые кроме устойчивости к патогену характеризовались низкостебельностью (62.1–83.8 см) и формировали урожайность на уровне лучшего стандарта – Сибирской 17 (517.1 г/м^2). У сортов Этюд, KWS Akvilon, KW 240-3-13, Омская 44 и Тулайковская 10 определена высокая устойчивость (7–99 баллов) к поражению мучнистой росой и септориозом в годы сильного развития патогена, высокая устойчивость к поражению только септориозом отмечена у сортообразцов Н 15-3 (9 баллов), Cunningham и Pavon (7 баллов), сорта Воевода, Тулеевская и KWS Torridon были устойчивыми к поражению мучнистой росой (7 баллов), что служит дополнительным важным признаком при подборе пар для скрещивания.

Среди озимых сортов, устойчивых к поражению патогеном, высокую урожайность формировали сорта Дока (589.2 г/м^2) и Чешская 17 (547.7 г/м^2), которые также характеризовались низкорослостью (66.5 и 80.0 см соответственно) и зимостойкостью на уровне стандарта – сорта Новосибирская 40 (4.1 балла) (табл. 3). Кроме того, сорт

Таблица 1. Оценка поражения сортообразцов мягкой пшеницы с установленными *Lr*-генами устойчивости

Сорт	Ген по данным литературы / установлен методом ПЦР	Оценка на инфекционном фоне, %	Заражение в лаборатории			Литературный источник
			кLr24	кLr9	Популяция	
		Яровые сорта				
Agent	***Lr24*** / ***Lr24***	0	3	0	1–2	GRIS, 2022
KWS Akvilon	*Lr24* / *Lr24*	0	3	1	1–2	Гультяева, 2018
Квинтус	*Lr24*, *Lr1* / *Lr24*	0	3	2	1	
KWS Torridon	*Lr24* / *Lr24*	0	1–2	0	1	
KWS Buran	*LrU* / *Lr24*	0	X	1	1–2	
KW 240-3-13	*LrU* / *Lr24*	0	2	3	1	
Cunningham	*Lr24* / *Lr24*	0	3	0	0	GRIS, 2022
Этюд	*Lr24* + *Lr26* / *Lr24*	0	3	0	1–2	Гриб, 2019
Удача	***Lr9*** / ***Lr9***	80–100	0	3	3	Гультяева, 2016
Зауралочка	*Lr9* / *Lr9*	80–100	0	3	3	
Алтайская 110	*Lr9* + *Lr10* + *Lr1* / *Lr9* + *Lr10* + *Lr1*	70–100	0	3	3	
Тулеевская	*Lr9* / *Lr9*	70–100	0	3	3	GRIS, 2022
Юлия	*Lr19* / *Lr19*	0	1	1	0	
Волгоуральская	*Lr19* / *Lr19*	0	1	1	0	
Добрыня	*Lr19* / *Lr19*	0	0	1	0	
Тулайковская 10	*Lr6Agi2* / –	0	0	0	0	
Воевода	*Lr6Agi1* / –	0	0	0	0	
Челяба 75	*LrSp2* / –	0	0	0	0	Adonina et al., 2018
Одинцовская	*LrU* / –*	0	0	0	0	
Омская 44	*Lr19* + *Lr26* / *Lr1* + *Lr19* + *Lr26*	0	0	0	0	Мешкова и др., 2021
Н 15-3	*LrU* / *Lr12* + *Lr16* + *Lr26* + *Lr34*	0	0	0	0	
CS2A/2M	*Lr28* / *Lr28*	0	0	0	0	Гультяева, 2012
Pavon	*Lr47* / *Lr47*	0	0	0	0	Гультяева, 2016
Новосибирская 15	***Lr10*** + ***Lr1*** / ***Lr10***	100	3	3	3	
		Озимые сорта				
Amigo	*Lr24* + *Lr26* / *Lr24*	0	3	1	1	GRIS, 2022
KS 93 U 50	*Lr42* или *Lr24* + *Lr26* / *Lr24*	0	3	0	0	Germplasm releases…, 2022
KS 90 WGRC 10	*Lr41* + *Lr26* / *Lr41*	0	0	0	0	
KS 93 U 40	*LrU* / *Lr19* + *Lr24*	0	0	0	0	
KS 93 U 62	*Lr41* / *Lr24* + *Lr41*	0	0	0	0	Germplasm releases…, 2022
Поэма	*LrU* / *Lr26* + *Lr34*	0	0	0	0	
Айвина	*Lr10*, *Lr26*, *Lr34* / *Lr10*, *Lr26*, *Lr34*	0	1	1	1–2	GRIS, 2022
Коллега	*Lr10*, *Lr26* / *Lr10*, *Lr26*, *Lr34*	0	1	0	1	
Княгиня Ольга	*Lr24* + *Lr1* + *Lr34* / *Lr1* + *Lr34*, нет *Lr24*	1	3	1	3	
Первица	*Lr26* / *Lr26* + *Lr1*	0	3	1	1–2	
Дока	*Lr26* + *Lr34* / *Lr26* + *Lr34*	5	2	2	X	
Восторг	*Lr26* + *Lr34* / *Lr26* + *Lr34*	5	1–2	X	1	
Лебедь	*LrU* / *Lr1* + *Lr13* + *Lr26* + *Lr34*	0	3	3	3	
Кума	*Lr34* / *Lr34*	10	3	3	3	GRIS, 2022
Батько	*Lr10* + *LrU* / *Lr10* + *Lr1*	0	3	X	3	
Гром	*Lr10* + *Lr1* + *LrU* / *Lr1* + *Lr34*	0	3	X	3	
Лидия	*Lr34* + *Lr3* + *LrU* / *Lr34* + *Lr13*	0	3	3	3	Шишкин и др., 2018
CO 07 W 245 (Antero)	*LrU* / *Lr13* + *Lr34*	0	3	3	3	
Ritter	*LrU* / нет *Lr24*	5	3	0	3	
Чешская 16	*LrU* / *Lr13* + *Lr34*	5	3	X	3	
Чешская 17	*LrU* / *Lr9* + *Lr12* + *Lr13* + *Lr34*	10	0	X	3	

Примечание. Красным цветом выделены гены устойчивости, представленные по данным литературы.
* По родословной предполагается наличие гена *LrSp2*, прочерк означает, что идентификацию наличия гена с использованием метода ПЦР не проводили.

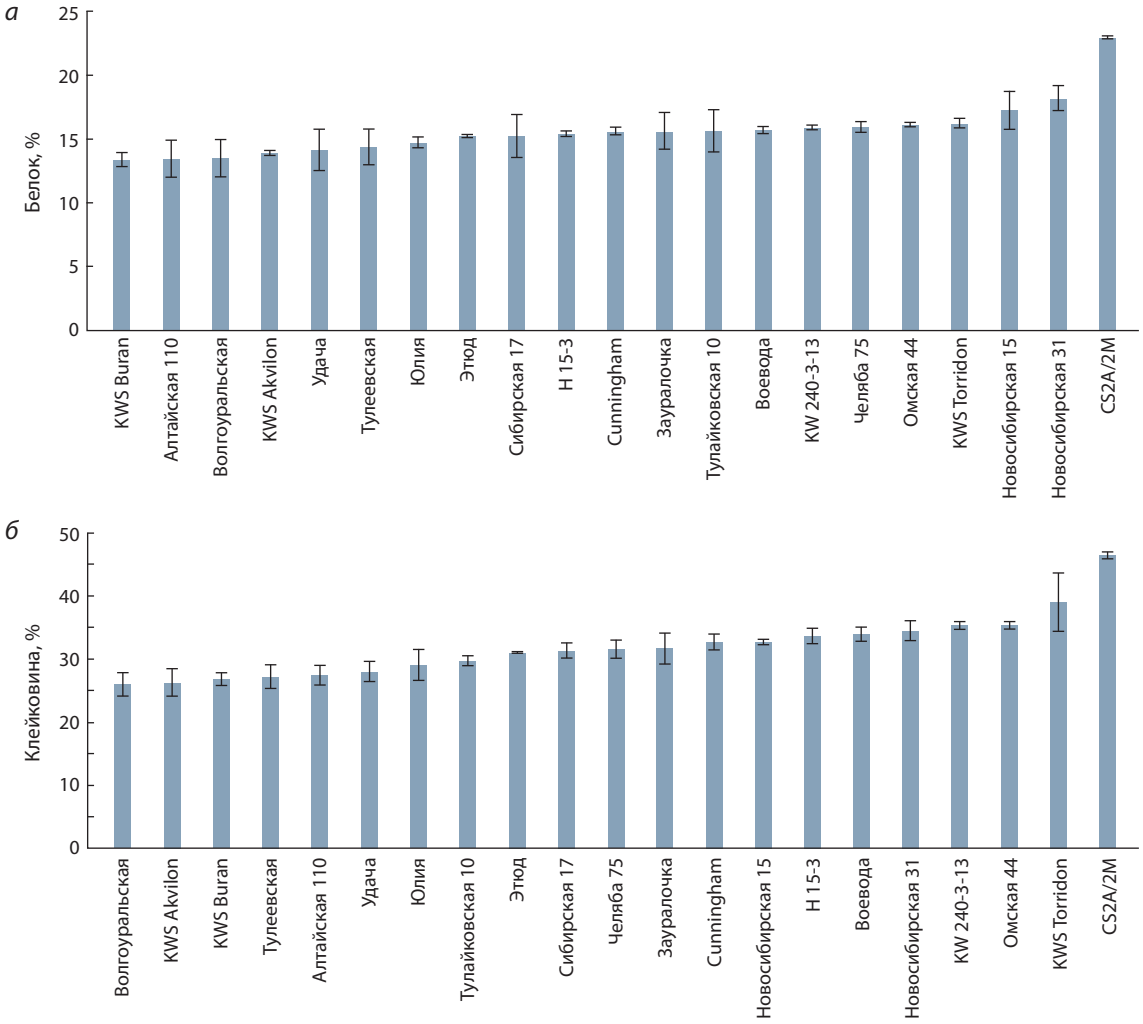
Таблица 2. Результаты полевого изучения сортов мягкой яровой пшеницы

Сортообразец	Происхождение	Средние значения за годы изучения						Устойчивость в условиях естественного распространения инфекции (минимальное значение за годы изучения), баллы		
		Вегетационный период, дни	Урожайность, г/м^2	Высота растения, см	Масса зерна колоса, г	Число зерен колоса	Масса 1000 зерен, г	Мучнистая роса	Бурая ржавчина	Септориоз
Новосибирская 15	Россия	70.0	408.7	86.8	0.91	25.9	34.8	3	1	3
Новосибирская 31	Россия	73.4	444.8	94.2	1.02	29.1	35.0	3	3	3
Сибирская 17	Россия	80.2	**517.1**	103.4	1.22	32.4	37.7	5	7	5
Этюд	Украина	75.0	428.0	60.0	0.95	25.8	36.8	7	99	5
CS2A/2M	Австралия	79.0	125.0	70.0	0.29	15.6	19.0	9	99	–
KWS Akvilon	Германия	77.5	417.2	62.1	1.16	32.1	35.2	99	99	7
KW 240-3-13	Германия	83.1	**514.1**	92.0	1.48	32.5	**45.1**	7	99	7
KWS Buran	Германия	78.8	473.3	86.0	1.33	32.3	41.5	5	99	3
KWS Torridon	Великобритания	82.3	366.5	83.8	1.33	34.0	38.9	7	9	5
Cunningham	Австралия	85.0	242.4	69.0	1.23	33.1	37.2	5	99	7
Зауралочка	Россия	76.8	356.9	93.4	1.02	29.9	33.9	1	5	3
Удача	Россия	83.0	377.0	67.3	0.75	25.5	29.2	5	5	–
Тулеевская	Россия	83.0	424.8	66.7	0.83	28.6	28.6	7	5	–
Алтайская 110	Россия	84.0	**580.0**	100.0	**2.00**	**48.5**	41.2	1	3	–
Юлия	Россия	86.5	391.6	86.0	1.14	28.2	39.2	5	9	3
Волгоуральская	Россия	83.0	380.0	98.0	1.51	**39.1**	38.6	5	9	3
Воевода	Россия	87.0	**509.8**	103.0	**1.69**	**41.4**	40.8	99	99	5
Челяба 75	Россия	81.0	404.4	103.0	1.34	29.6	**45.3**	3	99	3
Омская 44	Россия	81.3	440.8	87.5	1.41	37.9	37.6	7	99	7
Н 15-3	Германия	92.0	251.0	65.0	1.10	35.7	30.8	5	99	9
Тулайковская 10	Россия	92.5	405.3	79.9	1.14	31.9	34.6	9	99	7
Pavon	Мексика	96.0	130.0	60.0	0.59	15.9	30.0	3	99	7
Среднее		82.3	390.4	82.6	1.16	31.1	36.0	–	–	–
Стандартное отклонение		6.2	115.4	15.1	0.37	7.4	6.0	–	–	–

* В годы изучения образца устойчивость к септориозу не оценивали.

Таблица 3. Результаты полевого изучения сортов мягкой озимой пшеницы

Сорт	Происхождение	Средние значения за годы изучения						
		Вегетационный период, дни	Зимостойкость, балл	Урожайность, г/м^2	Высота растения, см	Масса зерна колоса, г	Число зерен колоса	Масса 1000 зерен, г
Новосибирская 40, ст.	Россия	319.5	4.1	396.5	107.0	1.66	86.5	27.3
Коллега	Россия	320.5	3.3	274.1	67.5	2.12	85.9	26.5
Дока	Россия	316.8	4.5	589.2	66.5	1.58	100.6	31.9
Чешская 17	Чехия	321.5	3.8	547.7	80.0	1.61	72.4	24.8
Чешская 16	Чехия	321.5	4.5	348.3	71.8	1.46	75.8	24.9
Стандартное отклонение		1.7	0.7	80.5	13.7	0.21	10.2	4.7



Содержание белка (*а*) и клейковины (*б*) в зерне яровых сортообразцов мягкой пшеницы.

Дока формировал высокое количество зерен в колосе (100.6 шт.).

Содержание белка варьировало от 13.4 до 22.95 %, клейковины – от 25.94 до 46.33 %, при этом наиболее высокие показатели выявлены у образца CS2A/2M ($p < 0.001$) (рисунок, Приложение 2). Сорта KWS Buran, Алтайская 110, Волгоуральская и KWS Akvilon характеризовались наименьшим содержанием белка, которое составило менее 14 %, и наиболее низкими показателями содержания клейковины.

Анализ содержания нутриентов в зерне изученной коллекции представлен в Приложении 2. Сравнение содержания в сортообразцах как микро- (Cu, Mn, Zn, Fe), так и макроэлементов (Ca, Mg, K) продемонстрировало наиболее высокие показатели у группы, состоящей из образцов CS2A/2M, Тулайковская 10, Pavon, Тулеевская. Наименьшие показатели большинства элементов отмечены у сортов KWS Buran, Новосибирская 15 и Волгоуральская.

Обсуждение

Основным способом создания новых сортов пшеницы, несмотря на значительные достижения в области биотехнологии, до сих пор остается гибридизация исходных родительских форм с последующим отбором интересующих селекционера морфотипов (Гультяева и др., 2020; Марченко и др., 2020), в том числе с использованием методов маркер-вспомогательной селекции (Стасюк и др., 2017; Gultyaeva et al., 2018). Одним из широко распространенных заболеваний у мягкой пшеницы в Западной Сибири является бурая ржавчина, которая может поражать как озимые сорта, так и яровые, что обязует селекционеров для предотвращения эпифитотий с резким снижением урожайности яровых сортов использовать для защиты от поражения заболеванием озимых и яровых сортов различные эффективные гены устойчивости или их сочетания (Крупин и др., 2019). Также важно в подборе доноров устойчивости учитывать их адаптивность к условиям, в которых планируется выращивать сорта, так как зачастую донорами генов устойчивости выступают сорта иностранной селекции (Грязнов, Пигорев, 2019; Конькова и др., 2022) или изогенные линии, также полученные на основе иностранных сортов (Койшыбаев, 2019), генотипы которых могут резко снижать урожайность в наших условиях из-за низкой адаптивности к неблагоприятным абиотическим факторам среды. В данном исследовании мы провели комплексную оценку сортов, характеризующихся

устойчивостью к бурой ржавчине пшеницы. Так, из набора яровых сортов, несущих ген *Lr24*, в условиях Западной Сибири целесообразно использовать в качестве доноров сорта немецкой селекции (KWS Buran, KWS Akvilon) английский сорт KWS Torridon или украинский сорт Этюд, нежели австралийский сорт Cunningham, так как данный сорт формирует значительно меньшую (242.4 г/м^2), чем у сортов-стандартов, урожайность (минимальная урожайность у стандарта Новосибирская 15 – 408.7 г/м^2). Данное снижение урожайности никак не связано с наличием чужеродной транслокации от *Thinopyrum elongatum* (*Lr24*/*Sr24*), а скорее обусловлено низкой адаптивностью генотипа в целом, что может повлиять на эффективность отбора высокопродуктивных форм при использовании сорта Cunningham в качестве донора гена *Lr24*.

Эффективность гена *Lr19*, распространенного в сортах российской селекции (Гультяева, Шайдаюк, 2021), в защите сортов пшеницы от поражения бурой ржавчиной все еще высокая на территории Западной и Восточной Сибири (Gultyaeva et al., 2018; Мешкова и др., 2019), несмотря на преодоление устойчивости в европейской части России (Гультяева и др., 2020). В качестве доноров для переноса данного гена устойчивости можно использовать сорт Омская 44 (440.8 г/м^2), так как сорт характеризовался урожайностью на уровне лучшего стандарта Сибирская 17 (517.1 г/м^2), кроме того, сорт также может быть донором гена *Lr26*, частично эффективного в защите пшеницы от поражения бурой ржавчиной в Западной (Gultyaeva et al., 2018) и Восточной (Мешкова и др., 2019) Сибири.

Сорта, несущие ген *Lr9*, несмотря на поражение в условиях инфекционного фона, также представляют интерес для селекции, так как на естественном фоне распространения инфекции данный ген защищает растения от сильного поражения. Сорта с этим геном (кроме сорта Алтайская 110) характеризуются как умеренно устойчивые в годы с максимальным поражением. Доноры гена *Lr9* могут быть использованы в создании сортов с пирамидой генов устойчивости, что позволит «продлить срок жизни» данного гена.

Селекционная ценность доноров генов устойчивости, перенесенных от *Aegilops speltoides Lr28* (CS2A/2M) и *Lr47* (Pavon), в Западной Сибири вызывает сомнения, так как их адаптивность к нашим условиям крайне низкая, что сказывается на урожайности (125.0 и 130.0 г/м^2 соответственно). Кроме того, по результатам оценки селекционного материала, отобранного из гибридных популяций F_3 и BC_1F_3, полученных нами ранее на основе двух коммерческих сортов и доноров генов *Lr28*, *Lr47* (Пискарев и др., 2021), выявлено значительное увеличение продолжительности вегетационного периода (+ 6.3 дня) в сравнении с сортом-реципиентом Сибирская 17 (44.2 дня) и высоты растения (+ 11.4 см). Также отмечены негативные эффекты урожайности, числа зерен колоса и длины стебля у рекомбинантов, несущих ген *Lr47*, полученных на основе обоих коммерческих сортов.

Несмотря на относительно высокую урожайность сорта Челяба 75 (404.4 г/м^2), несущего ген *LrSp2* от *Aegilops speltoides* Tausch, сцепленный с гаметоцидным геном (Adonina et al., 2018), что, несомненно, селекционно значимо в условиях Западной Сибири, нам не удалось получить сорт, превосходящий стандарты и несущий данный ген, даже с учетом большого объема исходного материала (более 4000 линий от скрещивания сортов Новосибирская 15, Новосибирская 31, Удача и Сибирская 17), изученного с 2015 г.

Устойчивость сорта Одинцовская (отбор из популяции Челяба 75 × АНК-17В) к поражению бурой ржавчиной пшеницы может контролироваться геном *LrSp2*, перенесенным от сорта Челяба 75, который сцеплен с гаметоцидным геном (Adonina et al., 2018), так как поражение отсутствует и продукты амплификации маркеров, сцепленных с другими генами устойчивости, не обнаружены. У сорта Омская 44, кроме выявленных Л.В. Мешковой с коллегами (2021) генов *Lr19* и *Lr26*, в результате генотипирования нами выявлен ген *Lr1*.

Сорта Воевода и Тулайковская 10 представляют интерес для создания сортов с комплексной устойчивостью к поражению листовыми патогенами в условиях Западной Сибири. Данные сорта (509.8 г/м^2 у Воеводы и 405.3 г/м^2 у Тулайковской 10) формируют урожайность не ниже лучшего стандарта, кроме того, сорт Тулайковская 10 характеризуется укороченным стеблем (79.9 см), а Воевода – высокой массой и числом зерен в колосе. С использованием сорта Тулайковская 10 уже был создан и передан с 2017 г. на госсортоиспытание сорт яровой мягкой пшеницы Новосибирская 61, который снят с испытания в связи с отсутствием преимущества перед стандартами на госсортоучастках Западной Сибири. Также при включении сорта Тулайковская 10 в гибридизацию мы получали уменьшение продолжительности вегетации линий, отобранных из комбинаций со среднепоздним сортом Сибирская 17 (Leonova et al., 2019). Сорт Воевода не привлекался к гибридизации.

При рассмотрении результатов генотипирования образцов обращает на себя внимание, что озимые сорта пшеницы, характеризующиеся устойчивостью к поражению бурой ржавчиной в условиях инфекционного фона, как правило, несут гены возрастной устойчивости (*Lr34*, *Lr12* и *Lr13*), в том числе в сочетании с геном ювенильной устойчивости *Lr26*, тогда как яровые формы в основном представлены донорами генов ювенильной устойчивости, как и в исследовании Е.И. Гультяевой и Е.Л. Шайдаюк (2021). Мы считаем, что данные механизмы защиты сортов с различным типом развития наиболее приемлемы для региона, так как до фазы колошения озимых сортов в Западной Сибири поражение бурой ржавчиной пшеницы не отмечено и это затрудняет переход патогена с озимых сортов на яровые.

Результаты изучения выраженности количественных признаков и урожайности озимых сортообразцов в нашем исследовании более скромные, так как коллекционные образцы часто характеризуются низкой зимостойкостью в наших условиях, что позволяет дать оценку лишь устойчивости к поражению заболеваниями в условиях инфекционного фона. При этом только в озимых линиях выявлен ген *Lr41* (KS 90 WGRC 10, KS 93 U 62), который позволяет сохранять устойчивость линии KS 93 U 62 к поражению клоном кLr24, несмотря на наличие в ее генотипе гена *Lr24*. Кроме того, сорта Дока (высота растения 66.5 см, урожайность 589.2 г/м^2) и Чешская 17 (80.0 см, 547.7 г/м^2)

могут быть не только донорами комплекса эффективных генов устойчивости (*Lr26* + *Lr34* и *Lr9* + *Lr12* + *Lr13* + *Lr34*), но и источником генов короткостебельности, которые не снижают зимостойкость и урожайность в условиях Западной Сибири.

Заключение

Сорта пшеницы, несущие чужеродные гены *Lr6Agi2* (Тулайковская 10) и *Lr6Agi1* (Воевода), устойчивы к поражению бурой ржавчиной как в полевых условиях, так и при заражении в лаборатории. Из всего изученного набора яровых сортов, несущих ген *Lr24*, в условиях Западной Сибири целесообразно использовать в качестве доноров сорта KWS Buran, KWS Akvilon, KW 240-3-13 и Этюд, которые формировали урожайность (417.2–514.1 г/м^2) на уровне лучшего стандарта – Сибирской 17 (517.1 г/м^2). Донором гена устойчивости *Lr19* может служить сорт Омская 44 (440.8 г/м^2), характеризующийся урожайностью на уровне лучшего стандарта, при этом сорт также несет ген *Lr26* (частично эффективный в Западной и Восточной Сибири). Доноры гена *Lr9* (Тулеевская и Алтайская 110) рекомендуется использовать в создании сортов с пирамидой генов устойчивости. Селекционная ценность доноров генов устойчивости, перенесенных от *Aegilops speltoides* *Lr28* (CS2A/2M) и *Lr47* (Pavon), в Западной Сибири низкая в связи с отсутствием адаптивности образцов к нашим условиям. Озимые сорта пшеницы, характеризующиеся устойчивостью к поражению бурой ржавчиной в условиях инфекционного фона, как правило, несут возрастные гены устойчивости (*Lr34, Lr12* и *Lr13*), в том числе в сочетании с ювенильным геном *Lr26*. В линии с озимым типом развития (KS 93 U 62) выявленный ген *Lr41* позволял сохранять устойчивость к поражению клоном кLr24, несмотря на наличие в ее генотипе гена *Lr24*. Сорта Дока (высота растения 66.5 см, урожайность 589.2 г/м^2) и Чешская 17 (80.0 см, 547.7 г/м^2) могут быть донорами генов устойчивости (*Lr26* + *Lr34* и *Lr9* + *Lr12* + *Lr13* + *Lr34*) и источниками короткостебельности, не снижающей зимостойкость и урожайность в условиях Западной Сибири.

Список литературы / References

Волкова Г.В., Кремнева О.Ю., Шумилов Ю.В., Гладкова Е.В., Ваганова О.Ф., Митрофанова О.П., Лысенко Н.С., Чикида Н.Н., Хакимова А.Г., Зуев Е.В. Иммунологическая оценка образцов пшеницы, ее редких видов, эгилопса из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова и отбор источников с групповой устойчивостью. *Вестник защиты растений*. 2016;89(3):38-39
[Volkova G.V., Kremneva O.Yu., Shumilov Yu.V., Gladkova E.V., Vaganova O.F., Mitrofanova O.P., Lysenko N.S., Chikida N.N., Hakimova A.G., Zuev E.V. Immunological assessment of wheat samples, its rare species, Aegilops from the collection Federal research center "Vavilov All-Russian Institute Of Genetic Resources" and selection of sources with group resistance. *Vestnik Zashchity Rasteniy = Plant Protection News.* 2016;89(3):38-39 (in Russian)]

Вьюшков А.А. Селекция яровой пшеницы в Среднем Поволжье. Самара, 2004
[Vyushkov A.A. Breeding of spring wheat in the Middle Volga region. Samara, 2004 (in Russian)]

Гриб С.И. Стратегия и приоритеты селекции полевых культур в Беларуси. Материалы Междунар. конф. «Оптимизация селекционного процесса – фактор стабилизации и роста продукции растениеводства Сибири». Красноярск: ИФ ФИЦ КНЦ СО РАН, 2019;23-28.
[Grib S.I. Strategy and priorities of crop breeding in Belarus. Proceedings of the International Conference "Breeding process optimization: factor of the stabilization and increase of plant production in Siberia". Krasnoyarsk, Kirenskiy Institute of Physics, 2019;23-28 (in Russian)]

Грязнов А.А., Пигорев И.Я. Исходный материал для селекции яровой пшеницы на устойчивость к бурой ржавчине. *Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии.* 2019;5: 45-52
[Gryaznov A.A., Pigorev I.Ya. Source material for breeding spring wheat for leaf rust resistance. *Vestnik Kurskoy Gosudarstvennoy Sel'skohozyaystvennoy Akademii = Bulletin of the Kursk State Agricultural Academy*. 2019;5:45-52 (in Russian)]

Гультяева Е.И. Методы идентификации генов устойчивости пшеницы к бурой ржавчине с использованием ДНК-маркеров и характеристика эффективности *Lr*-генов. СПб: ВНИИЗР, 2012
[Gultyaeva E.I. Methods for identifying wheat resistance genes to leaf rust using DNA markers and characterizing the effectiveness of *Lr*-genes. St. Petersburg: VNIIZR Publ., 2012 (in Russian)]

Гультяева Е.И. Разнообразие российских сортов мягкой пшеницы по генам устойчивости к бурой ржавчине. Материалы IV Междунар. конф. «Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам». СПб.: ВНИИЗР, РАСХН, 2016;24.
[Gultyaeva E.I. The diversity of Russian soft wheat varieties in genes for brown rust. Proceedings of the International Conference "Current issues in plant immunity against pests". St. Petersburg: All-Russia Plant Protection Institute, 2016;24 (in Russian)]

Гультяева Е.И. Генетическая структура популяций *Puccinia triticina* в России и ее изменчивость под влиянием растения-хозяина: Дис. … д-ра биол. наук. СПб., 2018.
[Gultyaeva E.I. The genetic structure of *Puccinia triticina* populations in Russia and its variability induced by the host plant. Doct. Biol. Sci. Diss. St. Petersburg, 2018 (in Russian)]

Гультяева Е.И., Шайдаюк Е.Л. Идентификация генов устойчивости к бурой ржавчине у новых российских сортов мягкой пшеницы. *Биотехнология и селекция растений*. 2021;4(2):15-27. DOI 10.30901/2658-6266-2021-2-o2
[Gultyaeva E.I., Shaydayuk E.L. Identification of leaf rust resistance genes in the new Russian varieties of common wheat. *Biotekhnologiya i Selektsiya Rasteniy = Plant Biotechnology and Breeding*. 2021; 4(2):15-27. DOI 10.30901/2658-6266-2021-2-o2 (in Russian)]

Гультяева Е.И., Сибикеев С.Н., Дружин А.Е., Шайдаюк Е.Л. Расширение генетического разнообразия сортов яровой мягкой пшеницы по устойчивости к бурой ржавчине (*Puccinia triticina* Eriks.) в Нижнем Поволжье. *Сельскохозяйственная биология*. 2020;55(1):27-44. DOI 10.15389/agrobiology.2020.1.27rus
[Gultyaeva E.I., Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Shaydayuk E.L. Enlargement of genetic diversity of spring bread wheat resistance to leaf rust (*Puccinia triticina* Eriks.) in Lower Volga region. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologia = Agricultural Biology*. 2020;55(1):27-44. DOI 10.15389/agrobiology.2020.1.27rus (in Russian)]

Давыдова Н.В., Казаченко А.О. Особенности подбора исходного материала для селекции яровой мягкой пшеницы в условиях центрального Нечерноземья. *Вестник Алтайского государственного аграрного университета.* 2013;103(5):5-9
[Davydova N.V., Kazachenko A.O. Peculiarities of selection of initial material for selection of spring soft wheat in the conditions of the Central Non-Chernozem Region. *Vestnik Altayskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of Altai State Agrarian University*. 2013;103(5):5-9 (in Russian)]

Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян Э.Р., Зинченко А.С., Зубанова Ю.С., Миков Д.С. Интрогрессивные линии мягкой пшеницы с генетическим материалом *Agropyron glaucum*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015;19(1):83-90. DOI 10.18699/VJ15.010

[Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan E.R., Zinchenko A.S., Zubanova Yu.S., Mikov D.S. Introgressive lines of common wheat with the genetic material of *Agropyron glaucum*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2015;19(1):83-90. DOI 10.18699/VJ15.010 (in Russian)]

Койшыбаев М. Реакция изогенных линий пшеницы Thatcher на североказахстанскую популяцию *Puccinia triticina* и устойчивость сортов к патогену. *Микология и фитопатология*. 2019;53(3): 162-169. DOI 10.1134/S0026364819030073
[Koyshybaev M. Reaction of isogenes thathcher wheat lines on the North-Kazakhstan population of *Puccinia triticina* and resistance of wheat cultivars. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2019;53(3):162-169. DOI 10.1134/S0026364819030073 (in Russian)]

Конькова Э.А., Лящева С.В., Сергеева А.И. Скрининг мировой коллекции озимой мягкой пшеницы по устойчивости к листостебельным болезням в условиях Нижнего Поволжья. *Зерновое хозяйство России*. 2022;14(2):36-40. DOI 10.31367/2079-8725-2022-80-2-36-40
[Kon'kova E.A., Lyashcheva S.V., Sergeeva A.I. Screening of the world winter bread wheat collection for leaf-stem disease resistance in the Lower Volga region. *Zernovoe Hozyaystvo Rossii = Grain Economy of Russia*. 2022;14(2):36-40. DOI 10.31367/2079-8725-2022-80-2-36-40 (in Russian)]

Крупин П.Ю., Дивашук М.Г., Карлов Г.И. Использование генетического потенциала многолетних дикорастущих злаков в селекционном улучшении пшеницы. *Сельскохозяйственная биология*. 2019;54(3):409-425. DOI 10.15389/agrobiology.2019.3.409rus
[Krupin P.Yu., Divashuk M.G., Karlov G.I. Gene resources of perennial wild cereals involved in breeding to improve wheat crop. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2019; 54(3):409-425. DOI 10.15389/agrobiology.2019.3.409rus (in Russian)]

Леонова И.Н. Влияние чужеродного генетического материала на проявление хозяйственно важных признаков мягкой пшеницы (*T. aestivum* L.). *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2018; 22(3):321-328. DOI 10.18699/VJ18.367
[Leonova I.N. Influence of alien genetic material on the manifestation of agronomically important traits of common wheat (*T. aestivum* L.). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(3):321-328. DOI 10.18699/VJ18.367 (in Russian)]

Мальчиков П.Н., Мясникова М.Г. Относительное развитие признаков продуктивности твердой пшеницы в процессе селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2012;16(4/2): 987-997
[Mal'chikov P.N., Myasnikova M.G. Relative development of durum wheat productivity traits in the breeding process. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2012;16(4/2):987-997 (in Russian)]

Маркелова Т.С. Использование диких видов и сородичей пшеницы для интрогрессии генов устойчивости к болезням. *АГРО XXI*. 2007;4-6:16-18
[Markelova T.S. Use of wild wheat species and relatives for introgression of disease resistance genes. *AGRO XXI.* 2007;4-6:16-18 (in Russian)]

Марченко Д.М., Иванисов М.М., Рыбась И.А., Некрасов Е.И., Романюкина И.В., Чухненко Ю.Ю. Итоги селекционной работы по озимой мягкой пшенице для непаровых предшественников в аграрном научном центре «Донской». *Зерновое хозяйство России*. 2020;72(6):3-9. DOI 10.31367/2079-8725-2020-72-6-3-9
[Marchenko D.M., Ivanisov M.M., Rybas' I.A., Nekrasov E.I., Romanyukina I.V., Chuhnenko Yu.Yu. The results of breeding work with the winter bread wheat for non-fallow forecrops in the Agricultural Research Center "Donskoy". *Zernovoe Khozyaystvo Rossii = Grain Economy of Russia*. 2020;72(6):3-9. DOI 10.31367/2079-8725-2020-72-6-3-9 (in Russian)]

Мережко А.Ф., Удачин Р.А., Зуев В.Е., Филатенко А.А., Сербин А.А., Ляпунова О.А., Косов В.Ю., Куркиев У.К., Охотникова Т.В., Наврузбеков Н.А., Богуславский Р.Л., Абдулаева А.К., Чикида Н.Н., Митрофанова О.П., Потокина С.А. Пополнение, сохранение в живом виде и изучение мировой коллекции пшеницы, эгилопса и тритикале. Санкт-Петербург: ВИР, 1999
[Merezhko A.F., Udachin R.A., Zuev V.E., Filatenko A.A., Serbin A.A., Lyapunova O.A., Kosov V.Yu., Kurkiev U.K., Okhotnikova T.V., Navruzbekov N.A., Boguslavskiy R.L., Abdulaeva A.K., Chikida N.N., Mitrofanova O.P., Potokina S.A. Replenishment, preservation in live form and study the world collection of wheat, triticale and Aegilops. St.Peterburg: VIR Publ., 1999 (in Russian)]

Мешкова Л.В., Россеева Л.П., Сидоров А.В., Сабаева О.Б., Зверовская Т.С., Белан И.А. Физиологическая специализация возбудителя бурой ржавчины пшеницы в Красноярском крае. *Вестник КрасГАУ*. 2019;142(1):29-36
[Meshkova L.V., Rosseeva L.P., Sidorov A.V., Sabaeva O.B., Zverovskaya T.S., Belan I.A. Physiological specialization of brown rust pathogen on the wheat in Krasnoyarsk region. *Vestnik KrasGAU = Bulletin of the Krasnoyarsk State Agrarian University.* 2019;142(1): 29-36 (in Russian)]

Мешкова Л.В., Россеева Л.П., Шмакова О.А., Белан И.А. Влияние сортов мягкой яровой пшеницы с геном *Lr26* на вирулентность возбудителя бурой ржавчины в Омской области. *Успехи современного естествознания*. 2021;10:20-25. DOI 10.17513/use.37693
[Meshkova L.V., Rosseeva L.P., Shmakova O.A., Belan I.A. Influence of varieties of soft spring wheat with gene *Lr26* on the virulence of the agent of brown rust in the Omsk region. *Uspekhi Sovremennogo Estestvoznaniya = Successes of Modern Natural Science*. 2021;10:20-25. DOI 10.17513/use.37693 (in Russian)]

Михайлова Л.А., Квитко К.В. Лабораторные методы культивирования возбудителя бурой ржавчины *Puccinia recondita* Rob. ex. Desm. f. tritici. *Микология и фитопатология.* 1979;4(3):269-273
[Mihaylova L.A., Kvitko K.V. Laboratory methods for cultivation of the leaf rust pathogen *Puccinia recondita* Rob. ex. Desm. f. tritici. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 1979; 4(3):269-273 (in Russian)]

Пискарев В.В., Апарина В.А., Бойко Н.И., Морозова Е.В., Тимофеев А.А. Влияние транслокаций от *Secale cereale* и *Aegilops speltoides* на проявление хозяйственно-ценных признаков пшеницы мягкой яровой. В: АГРОБИОТЕХНОЛОГИЯ-2021. Сборник статей международной научной конференции. М.: Российский государственный аграрный университет, 2021;778-782
[Piskarev V.V., Aparina V.A., Boyko N.I., Morozova E.V., Timofeev A.A. Influence translocation from *Secale cereale* and *Aegilops speltoides* to agronomic traits of spring wheat breeding lines. In: AGROBIOTECHNOLOGY-2021. Collection of articles of the international scientific conference. Moscow: Russian State Agrarian University Publ., 2021;778-782 (in Russian)]

Пожерукова В.Е., Шаманин В.П., Гладких М.С., Чурсин А.С., Гультяева Е.И. Оценка коллекции сортов сети КАСИБ в условиях южной лесостепи Западной Сибири. *Вестник Омского ГАУ*. 2019;33(1):30-37
[Pozherukova V.E., Shamanin V.P., Gladkih M.S., Chursin A.S., Gul'tyaeva E.I. Evaluation of the collection of varieties of the KASIB network in the conditions of the southern forest-steppe of Western Siberia. *Vestnik Omskogo GAU = Bulletin of the Omsk State Agrarian University*. 2019;33(1):30-37 (in Russian)]

Прянишников А.И. Научные основы адаптивной селекции в Поволжье. М.: РАН, 2018
[Pryanishnikov A.I. Scientific foundations of adaptive breeding in the Volga region. Moscow: RAS Publ., 2018 (in Russian)]

Сколотнева Е.С., Леонова И.Н., Букатич Е.Ю., Салина Е.А. Методические подходы к идентификации эффективных генов, определяющих устойчивость пшеницы к комплексу грибных заболеваний. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(7): 862-869. DOI 10.18699/VJ17.307

[Skolotneva E.S., Leonova I.N., Bukatich E.Yu., Salina E.A. Methodical approaches to identification of effective wheat genes providing broad-spectrum resistance against fungal diseases. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(7):862-869. DOI 10.18699/VJ17.307 (in Russian)]

Сочалова Л.П., Мусинов К.К., Пискарев В.В. Генофонд источников устойчивости яровой и озимой мягкой пшеницы к грибным фитопатогенам. В: Генофонд и селекция растений. Сборник материалов 6-й Международной конференции. Новосибирск, 2022;187-191

[Sochalova L.P., Musinov K.K., Piskarev V.V. Gene pool of spring and winter soft wheat resistance sources to fungal phytopathogens. In: Gene pool and plant breeding. Materials of the 6th International Conference. Novosibirsk, 2022;187-191 (in Russian)]

Стасюк А.И., Леонова И.Н., Салина Е.А. Проявление хозяйственно важных признаков у яровых гибридов мягкой пшеницы, отобранных с помощью MAS-технологии при скрещивании озимых сортов с яровыми донорами устойчивости к бурой ржавчине. *Сельскохозяйственная биология*. 2017;52(3):526-534. DOI 10.15389/agrobiology.2017.3.526rus

[Stasyuk A.I., Leonova I.N., Salina E.A. Variability of agronomically important traits in spring wheat hybrids obtained by marker-assisted selection from crosses of winter wheat with spring wheat donors of resistance genes. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2017;52(3):526-534. DOI 10.15389/agrobiology.2017.3.526rus (in Russian)]

Тимонова Е.М., Леонова И.Н., Белан И.А., Россеева Л.П., Салина Е.А. Влияние отдельных участков хромосом *Triticum timopheevii* на формирование устойчивости к болезням и количественные признаки мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2012;16(1):142-159

[Timonova E.M., Leonova I.N., Belan I.A., Rosseeva L.P., Salina E.A. Influence of individual regions of *Triticum timopheevii* chromosomes on the formation of resistance to diseases and quantitative traits of common wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2012;16(1):142-159 (in Russian)]

Шишкин Н.В., Дерова Т.Г., Гультяева Е.И., Шайдаюк Е.Л. Определение генов устойчивости к бурой ржавчине у сортов озимой мягкой пшеницы с использованием традиционных и современных методов исследований. *Зерновое хозяйство России*. 2018;59(5):63-67

[Shishkin N.V., Derova T.G., Gultyaeva E.I., Shaydayuk E.L. Determination of leaf rust resistance genes in winter soft wheat varieties using traditional and modern research methods. *Zernovoe Khozyaystvo Rossii = Grain Economy of Russia*. 2018;59(5):63-67 (in Russian)]

Aktar-Uz-Zaman M., Tuhina-Khatun M., Hanafi M.M., Sahebi M. Genetic analysis of rust resistance genes in global wheat cultivars: an overview. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 2017;31(3):431-445. DOI 10.1080/13102818.2017.1304180

Adonina I.G., Bukatich E.Y., Salina E.A., Piskarev V.V., Tyunin V.A., Shreyder E.R. Inheritance of the translocation in chromosome 2D of common wheat from *Aegilops speltoides* Tausch with leaf rust resistance gene. *Russ. J. Genet.* 2018;54(8):989-993. DOI 10.1134/S1022795418080021

Brevis J.C., Chicaiza O., Khan I.A., Jackson L., Morris C.F., Dubcovsky J. Agronomic and quality evaluation of common wheat near-isogenic lines carrying the leaf rust resistance gene *Lr47*. *Crop Sci*. 2008;48(4):1441-1451. DOI 10.2135/cropsci2007.09.0537

Chełkowski J., Golka L., Stepień Ł. Application of STS markers for leaf rust resistance genes in near-isogenic lines of spring wheat cv. Thatcher. *J. Appl. Genet.* 2003;44(3):323-338

Friebe B., Jiang J., Raupp W.J., McIntosh R.A., Gill B.S. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. *Euphytica*. 1996;91:59-87. DOI 10.1007/BF00035277

Germplasm releases from the wheat genetics resource center. Available: https://www.k-state.edu/wgrc/genetic_resources/germ_plasm_releases_from_the_wgrc.html (Accessed 07.10.2022).

GRIS. Genetic Resources Information System for Wheat and Triticale. Available: http://www.wheatpedigree.net/ (Accessed 07.10.2022).

Gultyaeva E.I., Shaydayuk E.L., Shamanin V.P., Akhmetova A.K., Tyunin V.A., Shreyder E.R., Kashina I.V., Eroshenko L.A., Sereda G.A., Morgunov A.I. Genetic structure of Russian and Kazakhstani leaf rust causative agent *Puccinia triticina* Erikss. populations as assessed by virulence profiles and SSR markers. *Agric. Biol.* 2018;53(1):85-95. DOI 10.15389/agrobiology.2018.1.85eng

Imbaby I.A., Mahmoud M.A., Hassan M.E.M., Abd-El-Aziz A.R.M. Identification of leaf rust resistance genes in selected egyptian wheat cultivars by molecular markers hindawi publishing corporation. *Sci. World J.* 2014;2014:574285. DOI 10.1155/2014/574285

Knott D.R. Translocations involving *Triticum* chromosomes and *Agropyron* chromosomes carrying leaf rust resistance. *Can. J. Genet. Cytol.* 1968;10(3):695-696. DOI 10.1139/g68-087

Kolmer J.A., Kabdulova M.G., Mustafina M.A., Zhemchuzhina N.S., Dubovoy V. Russian populations of *Puccinia triticina* in distant regions are not differentiated for virulence and molecular genotype. *Plant Pathol*. 2015;64(2):328-336. DOI 10.1111/ppa.12248

Kumlay A.M., Baenziger P.S., Gill K.S., Shelton D.R., Graybosch R.A., Lukaszewski A.J., Wesenberg D.M. Understanding the effect of rye chromatin in bread wheat. *Crop Sci.* 2003;43(5):1643-1651. DOI 10.2135/cropsci2003.1643

Leonova I.N., Piskarev V.V., Boiko N.I., Stasyuk A.I., Adonina I.G., Salina E.A. Development and study of new spring wheat lines containing aliengenetic material from *Th. intermedium* and *Ae. Speltoides.* In: Current Challenges in Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology. Proceedings of the Fifth International Scientific Conference PlantGen2019. Novosibirsk: ICG SB RAS, 2019; 61-63

Mains E.B., Jackson H.S. Physiologic specialization in leaf of wheat *Puccinia triticina* Erikss. *Phytopathology.* 1926;1(16):89-120

Marais G.F. The modification of a common wheat-*Thinopyrum distichum* translocated chromosome with a locus homeoallelic to *Lr19*. *Theor. Appl. Genet.* 1992;85(1):73-78. DOI 10.1007/BF00223847

Mebrate S.A., Oerke E.C., Dehne H.W., Pillen K. Mapping of the leaf rust resistance gene *Lr38* on wheat chromosome arm 6DL using SSR markers. *Euphytica*. 2008;162:457-466. DOI 10.1007/s10681-007-9615-z

Peterson R.F., Cambell A.B., Hannah A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals. *Can. J. Res.* 1948;26(5):496-500. DOI 10.1139/cjr48c-033

Plaschke J., Ganal M.W., Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 1995;91(6-7):1001-1007. DOI 10.1007/BF00223912

Qiu J.W., Schürch A.C., Yahiaoui N., Dong L.L., Fan H.J., Zhang Z.J., Keller B., Ling H.Q. Physical mapping and identification of a candidate for the leaf rust resistance gene *Lr1* of wheat. *Theor. Appl. Genet*. 2007;115(2):159-168. DOI 10.1007/s00122-007-0551-z

Roshan K., Rathore K.S., Bharkatiya M., Goel P.K., Naruka P.S., Saurabh S.S. Therapeutic potential of Triticumaestivum Linn. (Wheat Grass or Green Blood Therapy) in the treatment and prevention of Chronic and Acute Diseases: an overview. *PharmaTutor*. 2016;4(2):19-27

Schachermayr G., Siedler H., Gale M.D., Winzeler H., Winzeler M., Keller B. Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr9* leaf rust resistance gene of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1994;88(1):110-115. DOI 10.1007/BF00222402

Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Badaeva E.D., Shishkina A.A., Dragovich A.Y., Gultyaeva E.I., Kroupin P.Y., Karlov G.I., Khuat T.M., Divashuk M.G. Comparative analysis of *Agropyron intermedium* (host) beauv *6Agi* and *6Agi2* chromosomes in bread wheat cultivars and lines with wheat–wheatgrass substitutions. *Russ. J. Genet.* 2017;53(3):314-324. DOI 10.1134/S1022795417030115

Singh R.P., Huerta-Espino J., Rajaram S., Crossa J. Agronomic effects from chromosome translocations 7DL.7Ag and 1BL.1RS in spring wheat. *Crop Sci*. 1998;38(1):27-33. DOI 10.2135/cropsci1998.0011183X003800010005x

Singh S., Bowden R.L. Molecular mapping of adult-plant race-specific leaf rust resistance gene *Lr12* in bread wheat. *Mol. Breed*. 2011;28: 137-142. DOI 10.1007/s11032-010-9467-4

Souza E., Sorrells M.E. Prediction of progeny variation in oat from parental genetic relationships. *Theor. Appl. Genet.* 1991;82(2):233-241. DOI 10.1007/BF00226219

Tomkowiak A., Skowrońska R., Buda A., Kurasiak-Popowska D., Nawracała J., Kowalczewski P.Ł., Pluta M., Radzikowska D. Identification of leaf rust resistance genes in selected wheat cultivars and development of multiplex PCR. *Open Life Sci.* 2019;14:327-334. DOI 10.1515/biol-2019-0036

Zhang W., Lukaszewski A.J., Kolmer J., Soria M.A., Goyal S., Dubcovsky J. Molecular characterization of durum and common wheat recombinant lines carrying leaf rust resistance (*Lr19*) and yellow pigment (*Y*) genes from *Lophopyrum ponticum*. *Theor. Appl. Genet*. 2005;111(3):573-582. DOI 10.1007/s00122-005-2048-y

ORCID

L.P. Sochalova orcid.org/0000-0002-4674-6639
V.A. Aparina orcid.org/0000-0003-2714-7216
N.I. Boyko orcid.org/0000-0002-5026-4907
E.V. Zuev orcid.org/0000-0001-9259-4384
E.V. Morozova orcid.org/0000-0001-9439-9785
K.K. Musinov orcid.org/0000-0002-4500-836X
I.N. Leonova orcid.org/ 0000-0002-6516-0545
V.V. Piskarev orcid.org/0000-0001-9225-5227

Благодарности. Изучение образцов яровой мягкой пшеницы по признакам качества и содержанию микро- и макроэлементов выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 23-16-00041, https://rscf.ru/project/23-16-00041/). Генотипирование и оценка поражения образов бурой ржавчиной проведены при поддержке бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН (FWNR-2022-0037).

Прозрачность финансовой деятельности. Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 17.05.2023. После доработки 19.07.2023. Принята к публикации 19.07.2023.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023;27(8):1000-1009
DOI 10.18699/VJGB-23-115

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

Влияние салициловой и жасмоновой кислот на активность генов *SnAGO* гриба *Stagonospora nodorum* Berk. в культуре и при инфицировании растений пшеницы

М.Ю. Шеин, Г.Ф. Бурханова, И.В. Максимов ✉

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия
✉ igor.mak2011@yandex.ru

Аннотация. РНК-интерференция представляет собой механизм подавления генов, играющий важную роль в генетической регуляции у эукариот. Белки Argonaute (AGO) занимают центральное место в сложной системе явления РНК-интерференции. Однако их роль в этом механизме, как в организме растения-хозяина, так и у патогена, до сих пор полностью не исследована. Мы провели идентификацию и филогенетический анализ генов *SnAGO1*, *SnAGO2*, *SnAGO3* и *SnAGO18* патогенного гриба *Stagonospora nodorum* Berk., возбудителя септориоза пшеницы, и проанализировали их экспрессию в условиях инфицирования растений с различной степенью устойчивости к патогену. Уровень экспрессии оценивали на фоне иммунизации растений индукторами устойчивости: салициловой и жасмоновой кислотами. Также изучена активность указанных генов в культуре гриба при непосредственном воздействии индукторов устойчивости на мицелий гриба. Выявленная более ранняя активация генов *SnAGO* в культуре под влиянием салициловой и жасмоновой кислот указывает на их чувствительность к ним. В системе *in vivo* обнаружено, что иммунизация растений индуцирует накопление транскриптов *SnAGO* патогена. При этом гены *SnAGO* гриба *S. nodorum* при взаимодействии с растительными клетками реагировали в зависимости от степени устойчивости хозяина: наиболее высокий уровень транскриптов наблюдался в устойчивом сорте. Таким образом, полученные данные доказывают, что гены *SnAGO* гриба *S. nodorum* эффективно взаимодействуют с системой защиты хозяина в прямой зависимости от степени устойчивости последнего к патогену. Предложено использовать отношение транскрипционной активности грибного референсного гена *SnTub* к хозяйскому гену *TaRLI* в качестве маркера развития болезни в начальный период инфекционного процесса.
Ключевые слова: РНК-интерференция; гены *SnAGO*; гриб *Stagonospora nodorum*; мягкая пшеница; патогенез; салициловая кислота; жасмоновая кислота.

Для цитирования: Шеин М.Ю., Бурханова Г.Ф., Максимов И.В. Влияние салициловой и жасмоновой кислот на активность генов *SnAGO* гриба *Stagonospora nodorum* Berk. в культуре и при инфицировании растений пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(8):1000-1009. DOI 10.18699/VJGB-23-115

The effect of salicylic and jasmonic acids on the activity of *SnAGO* genes in the fungus *Stagonospora nodorum* Berk. in *in vitro* culture and during infection of wheat plants

M.Yu. Shein, G.F. Burkhanova, I.V. Maksimov ✉

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia
✉ igor.mak2011@yandex.ru

Abstract. RNA interference is a gene silencing mechanism that plays an important role in genetic regulation in a number of eukaryotes. Argonaute (AGO) proteins are central to the complex RNA interference system. However, their role in this mechanism, both in the host plant organism and in the pathogen, has not yet been fully elucidated. In this work, we identified and phylogenetically analyzed the *SnAGO1*, *SnAGO2*, *SnAGO3*, and *SnAGO18* genes of the pathogenic fungus *Stagonospora nodorum* Berk., and analyzed their expression under conditions of infection of plants with varying degrees of resistance to the pathogen. The expression level against the background of plant immunization with the resistance inducers salicylic and jasmonic acids was assessed. In addition, the activity of these genes in the culture of the fungus *in vitro* was studied under the direct influence of resistance inducers on the mycelium of the fungus. Earlier activation of the *SnAGO* genes in *in vitro* culture under the influence of salicylic and jasmonic acids suggests their sensitivity to it. In an *in vivo* system, plant immunization to induce the accumulation of pathogen *SnAGO* transcripts was found. At the same time, the *SnAGO* genes of the fungus *S. nodorum*, when interacting with plant cells, reacted depending on the degree of host resistance: the highest level of transcripts in the resistant variety was observed. Thus, our data prove that the *SnAGO* genes of the fungus *S. nodorum* effectively

© Шеин М.Ю., Бурханова Г.Ф., Максимов И.В., 2023
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

interact with the host defense system in direct proportion to the degree of resistance of the latter to the pathogen. It was proposed to use the ratio of the transcriptional activity of the fungal reference gene *SnTub* to the host *TaRLI* gene as a marker of disease development in the initial period of the infectious process.
Key words: RNA interference; *SnAGO* genes; fungus *Stagonospora nodorum*; common wheat; pathogenesis, salicylic acid; jasmonic acid.

For citation: Shein M.Yu., Burkhanova G.F., Maksimov I.V. The effect of salicylic and jasmonic acids on the activity of *SnAGO* genes in the fungus *Stagonospora nodorum* Berk. in *in vitro* culture and during infection of wheat plants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(8):1000-1009. DOI 10.18699/VJGB-23-115

Введение

Фитопатогенные грибы представляют огромную угрозу продовольственной безопасности, ограничивая биологический потенциал сельскохозяйственных растений и снижая качество получаемой продукции. На современном этапе разрабатываются методы защиты растений, основанные на естественном системном и клеточном фитоиммунитете, при котором особое место занимает уникальный механизм отключения экспрессии генов, описываемый термином «РНК-интерференция» (РНК-и) – эволюционно консервативный и в то же время высокоспецифичный иммунный компонент практически всех эукариот.

При создании современных подходов к защите растений необходимо учитывать, что при взаимодействии растений с патогенами, в особенности грибной природы, активируются компоненты РНК-и не только хозяина, но и патогена. Индукция активности ряда генов, ответственных за функционирование РНК-и у патогенных грибов, предполагает возможность их участия в супрессии генов фитоиммунной системы хозяина (Weiberg et al., 2013). Стоит отметить, что роль механизма РНК-и в эволюции и жизнедеятельности грибов важна и может значительно различаться в зависимости от стратегии выживания, способа инфицирования и распространения, а также от патогенов, поражающих сам гриб (Neupane et al., 2019). Например, при искусственном отключении одного или двух генов, кодирующих белки РНК-и, у фитопатогенных грибов нарушается вирулентность (Raman et al., 2017; Wang et al., 2018).

Белки Argonaute (AGO) связывают короткие микроРНК и считаются ключевыми в комплексе явления РНК-и (Feng et al., 2017; Neupane et al., 2019). Наиболее важная функция белков AGO, активно обсуждаемая в научной литературе, это участие в фитоиммунитете. Например, ранее мы наблюдали, что предварительная обработка семян салициловой кислотой (СК) формировала устойчивость пшеницы к септориозу, при этом в тканях растений, инфицированных возбудителем этой болезни, отмечено активное накопление транскриптов гена *TaAGO1* (Шеин и др., 2021). У растений табака *Nicotiana attenuata* Torr. ex S.Watson накопление белка NaAGO4 оказалось критичным при формировании устойчивости к грибу *Fusarium brachygibbosum* Padwick (1945) по жасмонатному сигнальному пути (Pradhan et al., 2020). Нарушение этого процесса отключало синтез жасмоновой кислоты (ЖК) в растениях и приводило к их инфицированию, но устойчивость к грибу восстанавливалась после обработки растений ЖК. Можно полагать, что функционирование защитной системы растений, регулируемое ЖК, опосредует работу механизма явления РНК-и. Обнаружена важность растительных белков AGO18 в процессе формирования противовирусной защиты риса (Yang et al., 2020).

Также известно, что белки AGO активно задействованы в физиологических процессах, происходящих в мицелии различных видов грибов. Так, гены, кодирующие белки AGO, были идентифицированы в геноме грибов *Fusarium graminearum* (*FgAGO1*) (Chen et al., 2015) и *Metarhizium robertsii* (*MrAGO1*) (Meng et al., 2017). На примере грибов *Verticillium dahliae* и *V. longisporum* показано участие грибных белков семейства AGO в формировании совместимости между хозяином и патогеном (Shen et al., 2014). Аналогичный эффект наблюдался у гриба *Scletotinia sclerotiorum:* мутанты по гену *AGO2* этого гриба имели замедленный рост и пониженную вирулентность (Neupane et al., 2019). Подавление экспрессии гена *AGO2* (*QDE-2*) также снижало вирулентность у грибов *Valsa mali* (Feng et al., 2017) и *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Jo et al., 2018).

Таким образом, белки семейства AGO являются ключевыми компонентами в работе не только растительной, но и грибной защитной системы, опосредованной механизмами РНК-и. Вместе с тем следует отметить, что до сих пор мало работ посвящено анализу экспрессии генов, кодирующих белки механизма РНК-и у различных патогенов, в условиях инфицирования растений и предварительной иммунизации фитогормонами СК и ЖК. В данной работе такой анализ проведен на модели фитопатогенного гриба *Stagonospora nodorum* Berk. (син. *Septoria*, *Parastagonospora*, *Phaeosphaeria*), вызывающего септориоз у мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. Основная задача заключалась в том, чтобы оценить изменения в транскрипционной активности генов *SNAGO*, кодирующих белки AGO, в культуре гриба *in vitro* и в условиях инфицирования этим грибом растений, контрастных по устойчивости к септориозу на фоне обработки СК и ЖК.

Материалы и методы

Объект исследования. В эксперименте использовали высоковирулентный в отношении мягкой пшеницы *T. aestivum* (сорт Жница) штамм фитопатогенного гриба *S. nodorum* SnB из коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН. В качестве растительного материала применяли контрастные по устойчивости сорта *T. aestivum* (BAD, 2*n* = 42): Жница (восприимчивый) и Омская 35 (устойчивый).

Культивирование гриба *in vitro*. Гриб культивировали на жидкой картофельно-глюкозной питательной среде в чашках Петри. Для этого в питательную среду вносили

суспензию спор гриба из расчета 10^5 спор/мл и культивировали в климатокамере KBW E6 (Binder GmbH, Германия) при температуре 18 °C в течение 14 сут при периодическом 16-часовом освещении. В экспериментальные варианты питательных сред предварительно добавляли растворы СК с концентрациями 10^{-4}, 10^{-5} и 10^{-6} М, а также ЖК – 10^{-5}, 10^{-6} и 10^{-7} М. Эти концентрации были выбраны как оптимальные в связи с полученными ранее в нашей лаборатории данными о влиянии СК и ЖК на степень развития септориоза у различных сортов пшеницы в патосистеме (Яруллина и др., 2011).

Постановка эксперимента. Семена пшеницы предварительно вымачивали в течение 24 ч в растворах, содержащих 10^{-5} М СК и 10^{-7} М ЖК или их композицию. Контрольные варианты в течение этого же времени выдерживали в дистиллированной воде. Затем проростки в изолированных сосудах на питательной среде Хогланда–Арнона помещали в климатостат KBW E6 (Binder GmbH, Германия) с 16-часовым световым периодом при температуре 20/24 °C (ночь/день). Отмеченные концентрации фитогормонов выбраны в результате предварительных экспериментов как наиболее эффективные в индуцировании устойчивости растений пшеницы против *S. nodorum* (Яруллина и др., 2011). Затем отрезки листьев 7-суточных контрольных и экспериментальных проростков пшеницы помещали в чашки Петри на влажную вату с добавлением бензимидазола (40 мг/л). Часть листьев инфицировали спорами гриба путем нанесения 4 мкл суспензии (10^5 спор/мл), согласно методике (Veselova et al., 2021). Инокулированные спорами гриба листья в чашках Петри помещали на 24 ч в термостат, затем переносили в климатостат KBW E6 (Binder GmbH, Германия).

Визуальная оценка степени развития гриба на листьях пшеницы. За развитием гриба *S. nodorum* на листьях наблюдали ежедневно. Площадь под кривой развития болезни в вариантах определяли согласно методике, предложенной А.А. Марченковой с коллегами (1991). Площадь зоны поражения листьев измеряли с помощью программы ImageJ (https://imagej.nih.gov/ij/download.html).

Праймеры к генам *SnAGO* гриба *S. nodorum*

Обозначение гена	Нуклеотидная последовательность
Гомолог *SnAGO1* *QDE-2*	F GCAAGTTCGCCATGAACAATAA
	R CAAACCTTCTGGACCATCTCTC
SnAGO2	F GGAGACTCACAGTTCGAAGAAG
	R TAGGAGAGGCAGAGGTTGTAA
SnAGO3	F CGTTTCCTGGGTTGACATAGAT
	R GCCAGACGTTCACTCTGATATT
SnAGO18	F GTCAGTCGATCAAGGTGGATTTA
	R CGTATAGTGCTGACGTCTCTTG
SnTub(β)	F TGGTATGGGTACGCTTTTGATCTC
	R GTAGCGACCGTTGCGGAAGTCAGA
TaRLI(a)	F TTGAGCAACTCATGGACCAG
	R GCTTTCCAAGGCACAAACAT

Выделение РНК, анализ транскрипции генов *SnAGO*. Выделение тотальной РНК из листьев пшеницы, зафиксированных в жидком азоте, а также выращенного *in vitro* мицелия гриба *S. nodorum* SnB проводили с использованием реагента «Лира» согласно протоколу «Биолабмикс» (Россия, https://biolabmix.ru). Концентрацию нуклеиновых кислот измеряли на спектрофотометре (ND1000WOC) Thermo Scientific™ NanoDrop™ 1000 при A_{260}/A_{280}. Для синтеза кДНК выполняли реакцию обратной транскрипции с использованием M-MuLV обратной транскриптазы («Синтол», Россия). Нуклеотидные последовательности исследуемых генов *SnAGO* гриба *S. nodorum* были отобраны из базы данных FunRNA (http://funrna.riceblast.snu.ac.kr/, 12.04.2023). Праймеры к этим генам сконструированы с использованием онлайн-программ Primer-Blast (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast, 12.04.2023) и PrimerQuest Tool (https://eu.idtdna.com/Primerquest, 12.04.2023) (таблица). Для оценки уровня транскрипции генов использовали метод количественной ПЦР в режиме реального времени на приборе CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad, США). В качестве интеркалирующего красителя применяли реактив SYBR Blue («Синтол», Россия). Активность транскрипции грибного патогена оценивали относительно референсного гена *SnTUB*, кодирующего белок тубулина гриба (Fraaije et al., 2002). Для оценки развития гриба на уровне РНК использовали анализ соотношения транскриптов референсных генов: патогена *SnTub* (Fraaije et al., 2002) и хозяина *TaRLI*, кодирующего белок, подобный ингибитору РНКазы L пшеницы (RNase L inhibitor-like protein) (Giménez et al., 2011) в экспериментальных растениях. Согласно работам приведенных авторов, экспрессия отмеченных генов гриба *S. nodorum* и пшеницы не подвержена воздействию средовых факторов.

Биоинформационный и статистический анализы. Эксперименты проводили в трехкратной повторности. Средние значения со стандартными ошибками (±SE) приведены на рисунках. Статистический анализ полученных данных выполнен в программе Bio-Rad CFX Maestro 1.1 Version: 4.1.2433.1219 (Bio-Rad, США). Различия в исследуемых параметрах между отдельными обработками анализировали с использованием дисперсионного анализа. Выравнивание нуклеотидных последовательностей и построение филогенетического дерева проведены в программе MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11.0.13 (Tamura et al., 2021). Для выравнивания применяли алгоритм MUSCLE, филогенетические древа были построены при помощи метода максимального правдоподобия (maximum likelihood estimation) (Tamura et al., 2021).

Результаты

На основе ранее проведенных исследований нами подобраны сорта мягкой пшеницы, контрастные по устойчивости к грибу *S. nodorum* (Veselova et al., 2021). Ранее также проведена оценка влияния обработки семян пшеницы СК и ЖК на последующее формирование у проростков

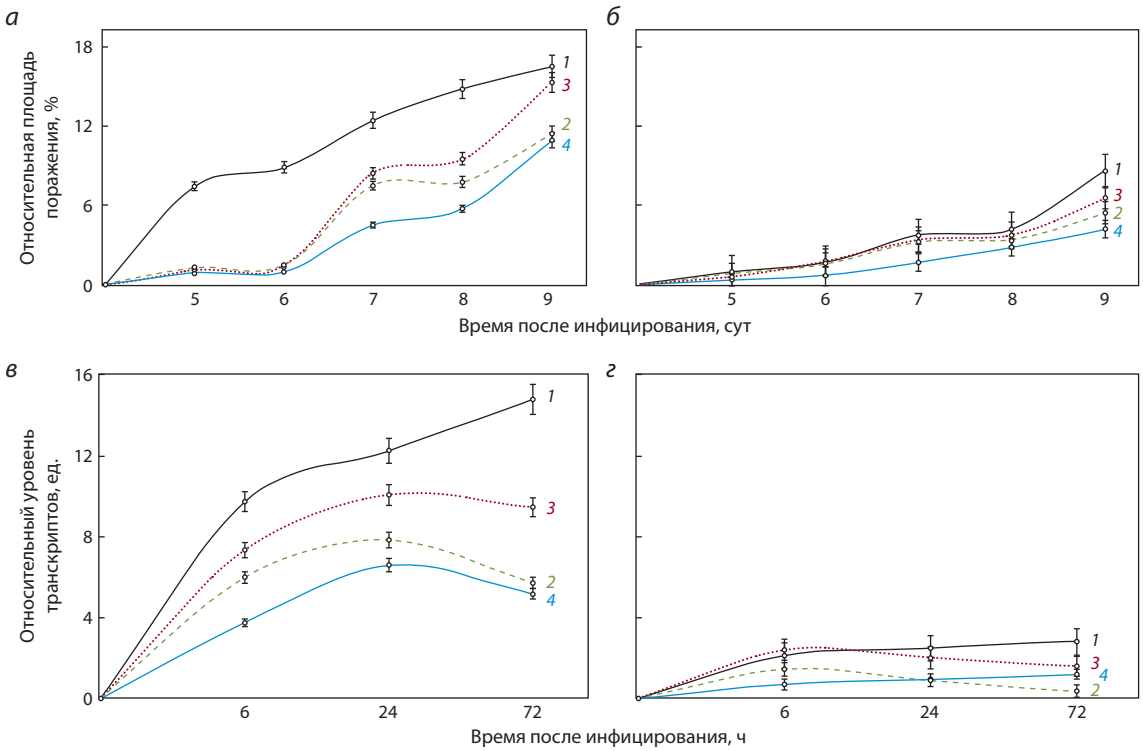


Рис. 1. Изменение площади поражения листа (*а, б*) и уровня транскриптов грибного референсного гена *SnTub* в сравнении с пшеничным геном *TaRLI* (*в, г*) в листьях восприимчивого (*а, в*) и устойчивого (*б, г*) сортов мягкой пшеницы в норме (*1*) и после предварительной обработки салициловой (*2*), жасмоновой (*3*) кислотами и их композицией (*4*).

устойчивости к грибу *S. nodorum* (Яруллина и др., 2011). Результаты этих работ показали, что СК и ЖК позволяют значительно снизить тяжесть развития септориоза у пшеницы.

В данной работе на первом этапе проанализирована степень развития гриба в тканях листа растений в норме и в условиях индуцирования защитной системы растений с использованием СК и ЖК. Интенсивность формирования инфекционного пятна и быстрое развитие некрозов в листьях восприимчивого сорта Жница показали высокую степень поражаемости этого сорта использованным нами штаммом патогена (рис. 1, *а*). У восприимчивого сорта симптомы болезни стали проявляться в виде бурых пятен уже на 4-е сут после инокуляции листьев, а на 7-е сут после инфицирования листья были поражены в значительной степени. В тех же условиях на устойчивом сорте Омская 35 септориоз развивался менее интенсивно (см. рис. 1, *б, г*). Соответственно, в ходе эксперимента подтверждены характерные для исследуемых сортов особенности по признаку устойчивости к грибу *S. nodorum.* В варианте предобработки семян СК и ЖК, как ранее и было обнаружено (Яруллина и др., 2011), наблюдалось торможение развития септориоза на инфицированных грибом листьях, что предполагает системный иммунизирующий эффект этих соединений. Наибольший защитный эффект выявлен в варианте предпосевной обработки семян пшеницы композицией СК и ЖК.

Очевидно, что успешное развитие гриба *S. nodorum* в тканях растений сопровождается накоплением его биомассы и, соответственно, изменением в соотношении белков и нуклеиновых кислот между хозяином и патогеном. Исходя из этого мы провели анализ соотношения уровня транскриптов референсных генов – патогена *SnTub* и хозяина *TaRLI* – в экспериментальных растениях. Как видно из полученных данных (см. рис. 1, *в, г*), соотношение кДНК гена *SnTub* к гену *TaRLI* у восприимчивого сорта Жница в течение наблюдаемого периода было намного выше, чем у устойчивого. Это соотношение резко снижалось у растений, предварительно обработанных СК и ЖК, а также их композицией (наиболее заметно после обработки семян СК+ЖК).

У устойчивого сорта наиболее выраженное снижение соотношения *SnTub/TaRLI* наблюдалось после обработки СК. Эти данные свидетельствуют о важном вкладе салицилат-индуцируемого пути формирования устойчивости растений пшеницы к возбудителю септориоза. Соответственно, можно говорить о том, что показатель *SnTub*/*TaRLI* является удобным маркером для ранней экспресс-диагностики устойчивости растений пшеницы к патогенному грибу *S. nodorum*, а также для оценки изменений этой устойчивости на разных этапах формирования взаимоотношений между растением-хозяином и указанным патогеном.

Для идентификации генов *SnAGO*, кодирующих в геноме *S. nodorum* белки семейства AGO, проведен анализ базы данных FunRNA (Choi et al., 2014) по аннотированной последовательности генома *S. nodorum* (Hane et al., 2007). Этот подход позволил определить локус SNOG_12157. Филогенетическое древо генов *AGO* представлено на рисунке 2. Структура одних и тех же генов

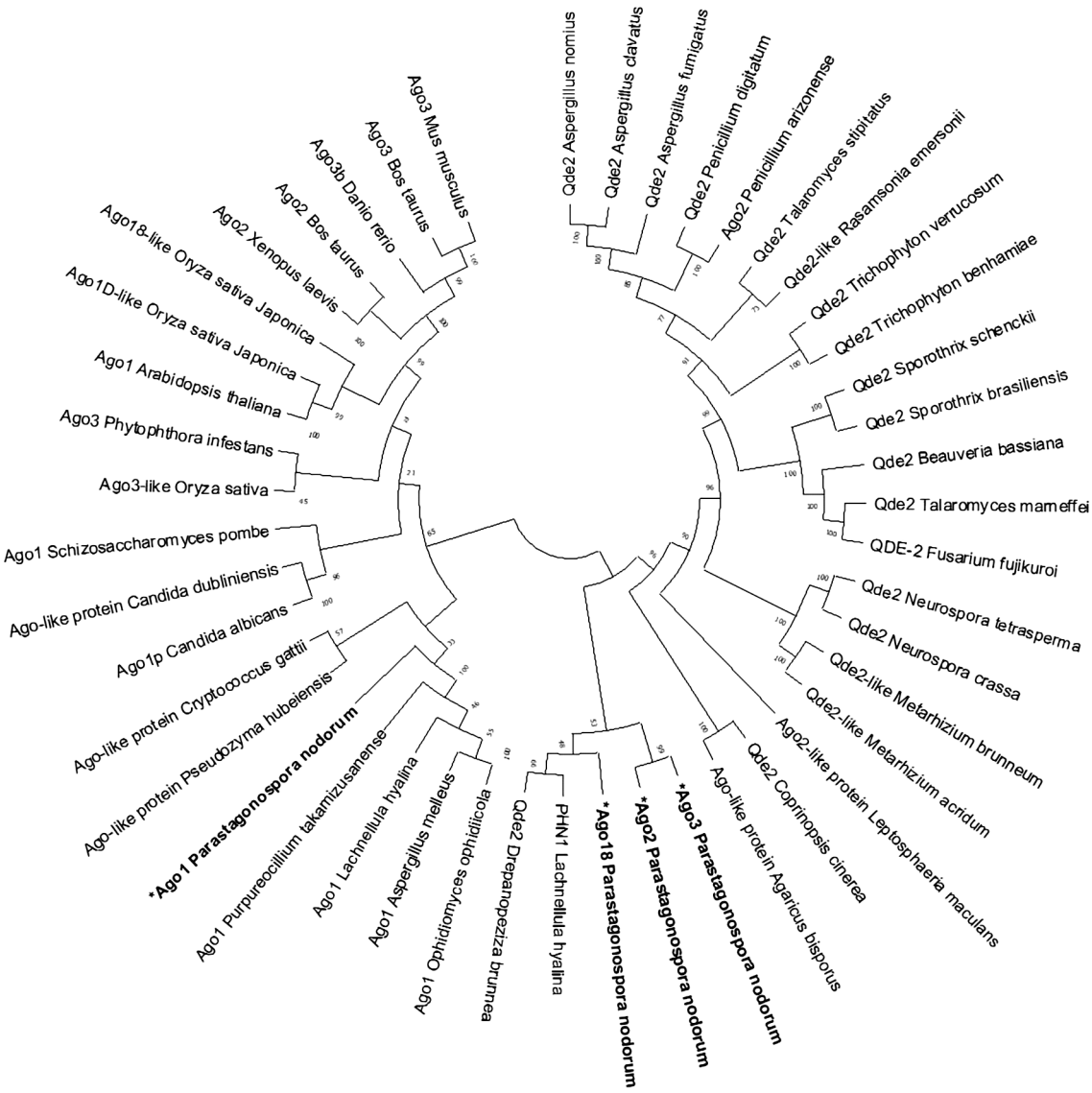


Рис. 2. Филогенетическое древо генов *AGO* и *QDE* у различных организмов. Жирным шрифтом выделены последовательности гриба, изученного в данной работе.

AGO у различных организмов имеет большую гомологию, чем структура различных генов данного семейства у представителей одного и того же рода/таксона. Так, отобранный для анализа ген *AGO1* у возбудителя септориоза *S. nodorum* оказался на одной ветви с генами *AGO1* грибов из других родов или даже отделов, а не с генами *AGO2*, *AGO3* и *AGO18* того же вида. Примечательно, что гены *Qde2*, будучи гомологами *AGO1* (Jo et al., 2018), расположены на совсем другой филогенетической ветви грибных генов. Подобное выделение *AGO1* в отдельную от *AGO2* и *AGO3* группу соотносится с аналогичными результатами, полученными в других работах (Zhang et al., 2015; Ahmed et al., 2021).

Последующий BlastP-анализ последовательности позволил выявить множество генов, предположительно кодирующих *SnAGO* грибов, на основании совпадений с известными мотивами, характерными для генов *AGO*. С учетом этого гены *SnAGO* были названы *SnAGO1*, *SnAGO2*, *SnAGO3* и *SnAGO18* соответственно и выбраны для дальнейшего анализа транскрипционной активности. Праймеры для оценки экспрессии генов *SnAGO1*, *SnAGO2*, *SnAGO3* и *SnAGO18* представлены в таблице.

Ранее не было известно, как меняется транскрипционная активность генов гриба, ответственных за формирование явления РНК-и, в условиях инфицирования восприимчивых и устойчивых сортов пшеницы. Для этого мы провели анализ уровня транскриптов генов *SnAGO*, идентифицированных у гриба *S. nodorum*, в условиях инфекции у контрастных по устойчивости к данному патогену сортов мягкой пшеницы, предобработанных СК и ЖК, а также композитом (рис. 3). Так, при инфицировании листьев пшеницы спорами гриба в течение эксперимента происходило накопление транскриптов генов *SnAGO1*, *SnAGO2* и *SnAGO3*. Обращает на себя внимание, что на устойчивом сорте Омская 35 уровень транскриптов генов становился выше в течение эксперимента.

Обработка семян СК и ЖК, а также их композицией сопровождалась локус-специфичным изменением уровня

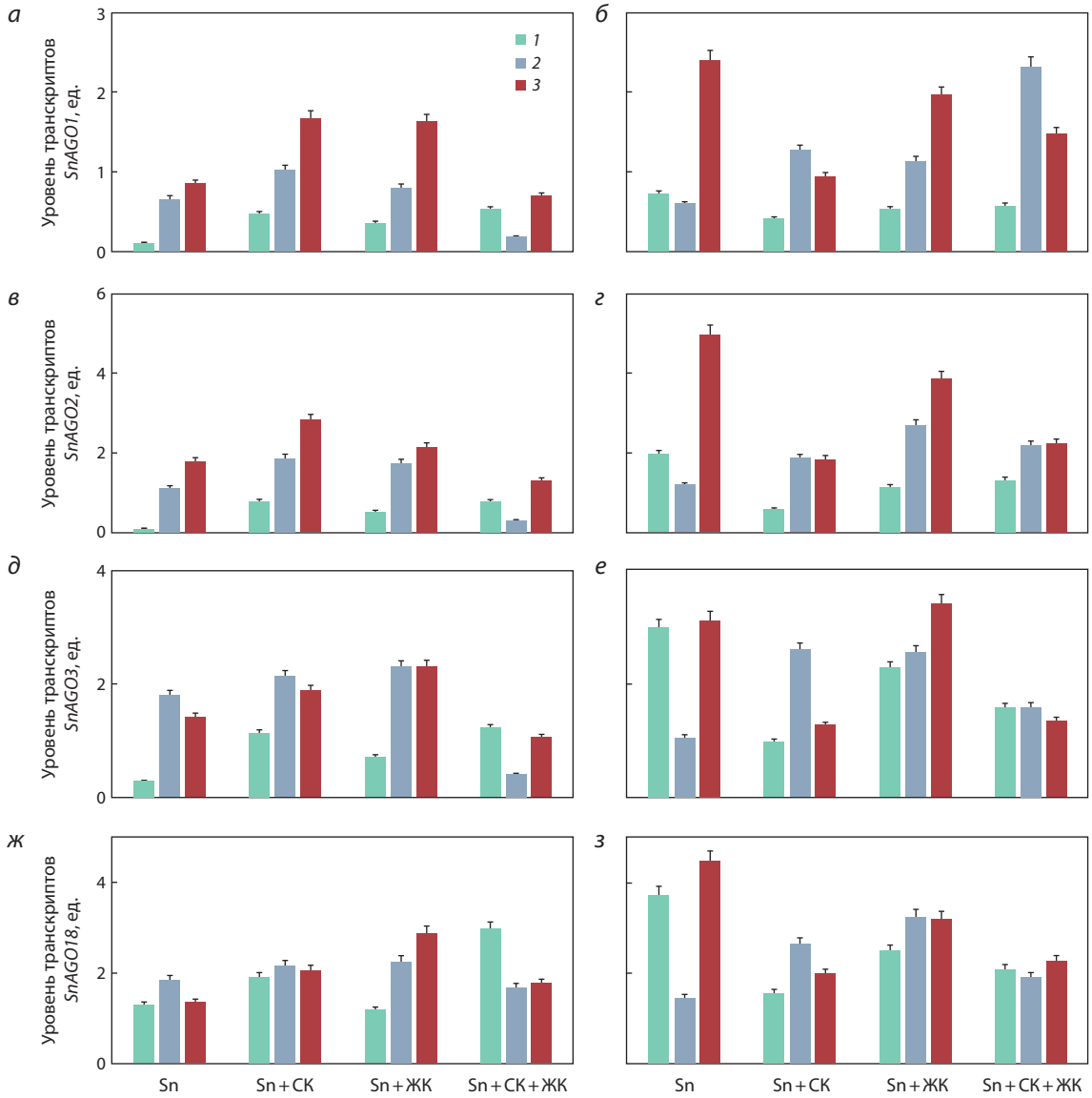


Рис. 3. Изменение уровня транскриптов генов семейства *AGO* гриба *S. nodorum* в листьях восприимчивого (Жница) (*а, в, д, ж*) и устойчивого (Омская 35) (*б, г, е, з*) сортов пшеницы, выросших из обработанных салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислотами семян, через 6 (*1*), 24 (*2*) и 72 (*3*) ч после инфицирования.

а, б – SnAGO1 (Snog_12157); *в, г – SnAGO2* (Snog_10544); *д, е – SnAGO3* (Snog_10546); *ж, з – SnAGO18* (Snog_12309).

транскриптов грибных генов *SnAGO* в патогенной системе как с устойчивым, так и восприимчивым сортами пшеницы (см. рис. 3). Большинство локусов демонстрировали накопление транскриптов, однако его степень различалась в зависимости от локуса и вида обработки. Например, гены *SnAGO1*, *SnAGO2* и *SnAGO18* на устойчивом сорте Омская 35 экспрессировались в большей степени в результате обработки семян ЖК, нежели под влиянием СК. Композиция СК и ЖК снижала активность генов *SnAGO2* и *SnAGO3* более выраженно в сравнении с необработанными и инфицированными образцами.

В инфицированных грибом тканях листа устойчивого сорта, предобработанных как СК, ЖК, так и их композицией, уровень транскрипции всех изученных генов через 24 ч эксперимента (в большей степени *SnAGO1*) был выше по сравнению с необработанными растениями после такого же времени инфицирования, но спустя 72 ч он был ниже соответствующих уровней у необработанных растений (исключение – *SnAGO3* после обработки ЖК). В восприимчивых растениях на протяжении всего эксперимента примерно в равной степени повышалась экспрессия генов *SnAGO1* и *SnAGO3* под влиянием как СК, так и ЖК, в наибольшей степени увеличивалась экспрессия генов *SnAGO2* под влиянием СК и *SnAGO18* под влиянием ЖК по сравнению с контрольными инфицированными растениями. При совместной обработке СК и ЖК семян пшеницы уровень экспрессии всех генов *SnAGO* у восприимчивого сорта повышался через 6 ч инфицирования (в 3 раза в случае с *SnAGO18*).

Таким образом, полученные результаты показывают, что гены *SnAGO*, кодирующие один из ключевых ферментов механизма РНК-и, в грибных клетках при взаимодей-

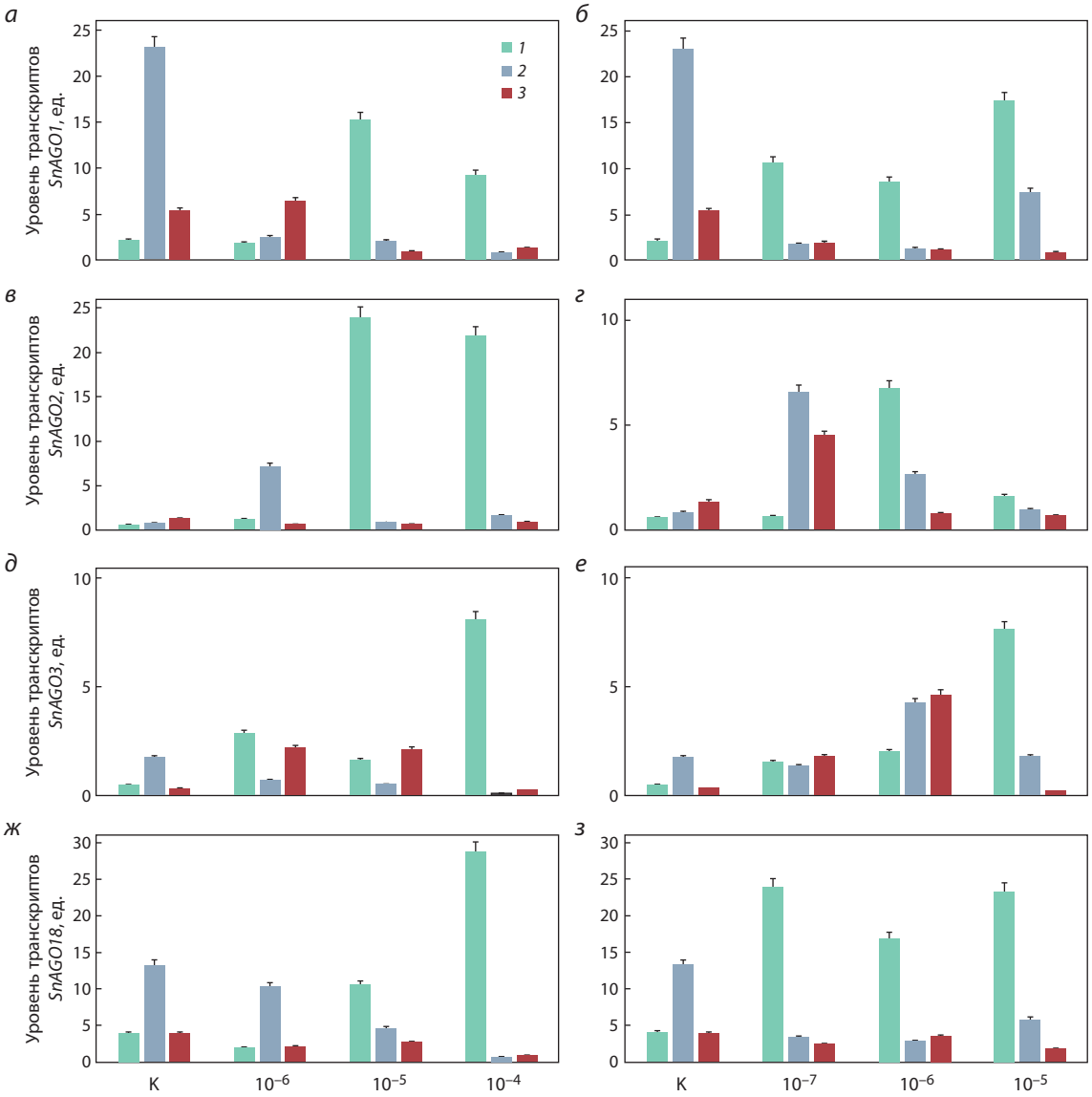


Рис. 4. Изменение уровня транскриптов генов *SnAGO* гриба *S. nodorum,* выращенного на жидкой питательной среде с добавлением салициловой (*а*, *в*, *д*, *ж*) и жасмоновой (*б*, *г*, *е*, *з*) кислот различной концентрации (М), через 5 (*1*), 7 (*2*) и 14 (*3*) сут после посадки.

а, *б* – *SnAGO1* (Snog_12157); *в*, *г* – *SnAGO2* (Snog_10544); *д*, *е* – *SnAGO3* (Snog_10546); *ж*, *з* – *SnAGO18* (Snog_12309).

ствии с растительными клетками реагируют на степень устойчивости хозяина и повышают в устойчивых сортах транскрипционную активность. Соответственно, более высокий уровень транскриптов *SnAGO* в инфицированных патогеном листьях пшеницы подтверждает ранее выдвинутые предположения о важной роли этой группы белков в формировании совместимых взаимоотношений между пшеницей и грибом *S. nodorum* (Shen et al., 2014).

Интерес, на наш взгляд, представляет оценка непосредственного ответа генома гриба на воздействие СК и ЖК в культуре. Так, с использованием выращенного в жидкой культуре мицелия гриба *S. nodorum* оценен экспрессионный статус генов *SnAGO* при добавлении растворов СК и ЖК различной концентрации на 5, 7 и 14-е сут после посадки на среду (рис. 4). Установлено, что при культивировании гриба на питательной среде активность гена *SnAGO1* у контрольных образцов возрастала на 7-е сут после начала культивирования. Активность гена *SnAGO2* в контрольных колониях гриба возрастала в течение эксперимента, но менее выраженно. При добавлении в питательную среду СК наблюдалось значительное повышение уровня транскриптов всех исследуемых генов *SnAGO* уже на 5-е сут, причем степень накопления транскриптов этих генов была прямо пропорциональна концентрации добавляемого вещества. Аналогичные данные получены при добавлении в среду ЖК. При этом добавление сигнальных молекул при всех концентрациях ЖК и относительно высоких концентрациях СК сдвигает накопление транскриптов на самый ранний срок – 5 сут. Особо следует обратить внимание на то, что наиболее чувствительными к добавлению в питательную среду ЖК оказались гены *SnAGO1 и SnAGO18.*

Обсуждение

Оценка механизмов формирования устойчивости растений, в особенности против патогенов, представляет собой актуальную задачу, решение которой позволит эффективно регулировать устойчивость и добиться более высоких продуктивных свойств. Разнообразие способов питания фитопатогенных грибов способствовало эволюционному формированию различных способов защиты растений от них (McCombe et al., 2022). Например, против биотрофных патогенов, питающихся на живых тканях растений, запускаются механизмы защиты, при которых активную роль выполняет СК-зависимый сигнальный путь, формирующий системную приобретенную устойчивость. ЖК запускает иной сигнальный путь, названный системной индуцированной устойчивостью и защищающий растения от некротрофных патогенов и насекомых. В многочисленных исследованиях показано, что возбудитель септориоза *S. nodorum* характеризуется гемибиотрофным способом питания на растениях пшеницы, сочетающим в себе биотрофную фазу развития в начале патогенеза и некротрофную впоследствии, однако он способен и к сапротрофному росту на питательных средах (Oliver et al., 2012). Соответственно, в зависимости от сроков развития патогена в тканях растений хозяйские защитные системы должны четко распознавать эти переходные этапы.

Ранее нами показано, что высоковирулентный штамм патогенного гриба *S. nodorum* SnB может преодолеть защиту пшеницы, связанную с про- и антиоксидантной системой, включающей активацию каталаз (Трошина и др., 2010) и хитиндезацетилаз (Maksimov et al., 2011), а также накопление различных эффекторных молекул (Veselova et al., 2021). В этой работе мы провели анализ ряда генов *S. nodorum*, кодирующих белки-нуклеазы SnAGO, вовлеченные в механизм РНК-и, с использованием его в качестве модельного объекта.

Явление РНК-и представляет уникальный и древний механизм защиты генома эукариот, в том числе грибов, от чужеродной генетической информации, а также служащий для регуляции физиологических процессов. Ключевые компоненты этого сложного механизма иммунитета – РНК-нуклеазы AGO, функционально охарактеризованные на модельных организмах (Choi et al., 2014). Показано, что механизм РНК-и в системе иммунитета эукариот при взаимодействии хозяев со своими паразитами является «обоюдоострым инструментом», с одной стороны, защищающим хозяина от патогена, с другой, способствующим отключению патогеном накопления наиболее существенных защитных белков хозяина в целях использования его ресурсов для своего функционирования. Вместе с тем на сегодняшний день механизмы работы РНК-и в грибных системах, особенно при развитии болезней, изучены недостаточно, что ограничивает наше понимание этого явления.

Например, показано формирование совместимости между хозяином и патогеном с участием растительных белков AGO1 *Brassica napus* в условиях инфицирования растений грибами *V. dahliae* и *V. longisporum* (Shen et al., 2014). В растениях томата и арабидопсиса микроРНК, секретируемые грибом *Botrytis cinerea*, использовали хозяйские белки AGO1 для избирательного подавления трансляции хозяйских митоген-активируемых протеинкиназ (MAPKs), пероксиредоксина, а также ассоциированной с клеточной стенкой киназы, а подавление накопления этого белка в мутантных растениях арабидопсиса приводило к снижению их восприимчивости к грибу (Weiberg et al., 2013). F. Dunker с коллегами (2020) на растениях арабидопсиса показали, что подобное привлечение хозяйского белкового комплекса AGO1 характерно и для оомицета *Hyaloperonospora arabidopsidis,* филогенетически далекого от грибов патогена, что предполагает общее для патогенов свойство.

Выявлена важная роль механизма РНК-и в росте и развитии грибов, естественно отражающаяся впоследствии на их способности инфицировать растения. Так, мутанты Δago1 гриба *Colletotrichum higginsianum* демонстрировали серьезные дефекты в морфологии конидий (Campo et al., 2016). Делеция гена *FgAGO2* гриба *Fusarium graminearum* не влияла на фенотип гриба во время бесполой фазы (Chen et al., 2015), но этот ген оказался важным при прохождении грибом стадии споруляции и созревания аскоспор (Zeng et al., 2018). У другого вида гриба *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* штамма 4287 мутанты с подавленной экспрессией гена *FoQDE-2* (*AGO1*) (Jo et al., 2018) проявляли пониженную вирулентность в отношении растений томатов.

В настоящий момент практически отсутствуют работы, в которых бы обсуждалось поведение генов грибных патогенов, кодирующих белки, ответственные за РНК-и, в условиях непосредственного воздействия на них биостимуляторов и индукторов устойчивости, например СК и ЖК, или косвенного воздействия через инфицирование растений. Имеется ряд противоречивой информации о роли индукторов устойчивости растений в процессе работы механизма РНК-и в тканях растений под непосредственным воздействием СК и ЖК и в ответ на инфицирование патогенами. Например, некоторые авторы показывают, что СК-индуцированная устойчивость к патогенам затрагивает механизмы растительной РНК-и только через хозяйскую РНК-зависимую РНК-полимеразу (RDR1) и координируется этим белком (Lee et al., 2016). В то же время есть данные, согласно которым в растениях, например у риса, уровни экспрессии генов *OsAGO1a*, *OsAGO2* и *OsAGO18* оказались связаны с ЖК и в мутантных растениях риса coi1-13, не способных передавать сигналы ЖК, были ниже, чем у диких растений (Yang et al., 2020). Особенно это интересно в связи с тем, что у патогенного гриба пшеницы *S. nodorum* роль РНК-и в патогенности все еще остается нерешенной. Вместе с тем недавно проведен анализ участия РНК-и в развитии патогенности *Zymoseptoria tritici* – другого гриба, вызывающего септориоз листьев на пшенице после нокаутирования в его геноме генов *AGO1* и *AGO2* (Kettles et al., 2019; Ma et al., 2020). Анализ не показал качественных фенотипических изменений в развитии симптомов септориоза на восприимчивом сорте пшеницы Bobwhite. Мутантные по генам *AGO* штаммы грибов свойств вирулентности в отношении растений пшеницы не теряли. Из полученных результатов авторы делают вывод, что данные белки не играют значительной роли в процессах развития септориоза. Вместе с тем анализ экспрессионного статуса генов,

ответственных за работу механизма РНК-и у патогенного гриба *V. nonalfalfae*, вызывающего вертициллезное увядание у хмеля (*Humulus lupulus* L.), продемонстрировал, что более вирулентные штаммы патогена обладают более высоким уровнем накопления транскриптов *VnAGO* (Jeseničnik et al., 2019).

У устойчивого к патогену *S. nodorum* сорта пшеницы Омская 35 накопление транскриптов изученных генов *SnAGO* при грибном патогенезе в тканях листа было более активно, чем у восприимчивого сорта, что предполагает вовлечение изученных генов в процесс преодоления защитной системы хозяина и возможность регуляции активности этих генов в зависимости от степени устойчивости хозяина. Эти предположения дополнительно подтверждены в вариантах эксперимента, при которых растения были иммунизированы путем предварительной предпосевной обработки семян СК и ЖК, а также их композицией. Как можно заметить, уровень транскриптов патогенных генов *SnAGO* в этих вариантах также оказался выше, чем в контрольных, хотя с учетом соотношения домашних генов *SnTub*/Та*RLI* содержание гена *SnTub* в иммунизированных СК и ЖК растениях значительно ниже.

Интересные результаты получены нами при оценке активности транскрипции генов *SnAGO* после непосредственного воздействия СК и ЖК на мицелий гриба в культуре. Высокие концентрации СК усиливали накопление транскриптов изученных генов *SnAGO* в более ранние сроки культивирования, в то время как низкие концентрации не давали такого эффекта. ЖК стимулировала накопление транскриптов *SnAGO1, SnAGO3, SnAGO18* на ранних сроках культивирования и в более низких концентрациях по сравнению с СК. Можно предполагать, что грибные гены *SnAGO* чувствительны к непосредственному воздействию на мицелий гриба этих сигнальных молекул, позиционируемых в качестве индукторов защитных систем растений против патогенов. Таким образом, грибная система РНК-и активно реагирует на добавление в среду культивирования СК и ЖК, а также участвует в процессе инфицирования растений. При этом искусственное стимулирование защитных свойств растения запускает и накопление транскриптов *SnAGO* патогена. Полученные данные указывают на то, что гены *AGO*, участвующие в системе РНК-и гриба *S. nodorum* штамма SnB, эффективно взаимодействуют с инфицирующим растением, и, по всей видимости, это взаимодействие зависит от степени устойчивости хозяина.

Особый интерес представляет возможность оценки степени развития патогенов в тканях растений с использованием молекулярно-биологических методов, позволяющих определить уровень накопления в тканях нуклеиновых кислот патогена, так как визуальная оценка симптомов болезни зачастую субъективна и подвержена воздействию различных факторов. В данной работе оценка накопления генетического материала патогена в тканях растений проведена путем сравнения соотношения уровня транскриптов генов домашнего хозяйства гриба и пшеницы *SnTub*/*TaRLI*. Оценка соотношения транскриптов *SnTub*/*TaRLI* коррелировала с результатами визуального наблюдения развития болезни на листьях. Полученные результаты также показали, что наиболее эффективной в индуцировании защитных свойств растений пшеницы к септориозу оказалась предпосевная обработка семян ЖК, а также композицией ЖК и СК (см. рис. 1). С использованием уровня соотношения *SnTub*/*TaRLI* подтверждена динамика накопления биологического материала патогенного гриба, но в более ранние сроки наблюдений. Кроме того, нами продемонстрирована возможность применения полученных данных транскрипционной активности генов *AGO* гриба *S. nodorum* штамма SnB как объективного показателя активации системы его РНК-и.

Список литературы / References

Марченкова А.А., Неттевич Э.Д., Тушинский Т.Ю. Устойчивость яровой пшеницы к септориозу. *Вестник сельскохозяйственной науки*. 1991;7:110-115
[Marchenkova A.A., Nettevich E.D., Tushinsky T.Yu. Resistance of spring wheat to septoria blight. *Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki = Herald of Agricultural Sciences*. 1991;7:110-115 (in Russian)]

Трошина Н.Б., Сурина О.Б., Черепанова Е.А., Яруллина Л.Г. Сравнительная оценка H_2O_2-разлагающей активности агрессивных и неагрессивных штаммов *Septoria nodorum* Berk. *Микология и фитопатология*. 2010;44(3):273-279
[Troshina N.B., Surina O.B., Cherepanova E.A., Yarullina L.G., Maksimov I.V. Comparative evaluation of H_2O_2-degrading activity of aggressive *Septoria nodorum* strains. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2010;44(3):273-279 (in Russian)]

Шеин М.Ю., Бурханова Г.Ф., Мерзлякова А.Ю., Максимов И.В. Изменение транскрипционной активности генов *TaAGO2* и *TaAGO4* в растениях пшеницы при инфицировании грибом *Stagonospora nodorum* Berk. *Труды Кубанского государственного аграрного университета*. 2021;5(92):196-200. DOI 10.21515/1999-1703-92-196-200
[Shein M.Yu., Burkhanova G.F., Merzlyakova A.Yu., Maksimov I.V. Changes in transcriptional activity of *TaAGO2* and *TaAGO4* genes in wheat plants at infection with *Stagonospora nodorum* Berk. *Trudy Kubanskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Works of the Kuban State Agrarian University*. 2021;5(92):196-200. DOI 10.21515/1999-1703-92-196-200 (in Russian)]

Яруллина Л.Г., Трошина Н.Б., Черепанова Е.А., Заикина Е.А., Максимов И.В. Салициловая и жасмоновая кислота в регуляции про-антиоксидантного статуса листьев пшеницы при инфицировании *Septoria nodorum* Berk. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2011;47(5):602-608. DOI 10.1134/S0003683811050176
[Yarullina L.G., Troshina N.B., Cherepanova E.A., Zaikina E.A., Maksimov I.V. Salicylic and Jasmonic acids in regulation of the proantioxidant state in wheat leaves infected by *Septoria nodorum* Berk. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology.* 2011;47:549-555. DOI 10.1134/S0003683811050176 (in Russian)]

Ahmed F.F., Hossen M.I., Sarkar M.A.R., Konak J.N., Zohra F.T., Shoyeb M., Mondal S. Genome-wide identification of *DCL*, *AGO* and *RDR* gene families and their associated functional regulatory elements analyses in banana (*Musa acuminata*). *PLoS One*. 2021; 16(9):e0256873. DOI 10.1371/journal.pone.0256873

Campo S., Gilbert K.B., Carrington J.C. Small RNA-based antiviral defense in the phytopathogenic fungus *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS Pathog*. 2016;12:e1005640. DOI 10.1371/journal.ppat.1005640

Chen Y., Gao Q., Huang M., Liu Y., Liu Z., Liu X., Ma Z. Characterization of RNA silencing components in the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum. Sci. Rep*. 2015;5:12500. DOI 10.1038/srep12500

Choi J., Kim T., Jeon J., Wu J., Song H., Asiegbu F.O., Lee Y.H. funRNA: a fungi-centered genomics platform for genes encoding key

components of RNAi. *BMC Genomics*. 2014;15(Suppl. 9):S14. DOI 10.1186/1471-2164-15-S9-S14

Dunker F., Trutzenberg A., Rothenpieler J.S., Kuhn S., Pröls R., Schreiber T., Tissier A., Kemen A., Kemen E., Hückelhoven R., Weiberg A. Oomycete small RNAs bind to the plant RNA-induced silencing complex for virulence. *Elife*. 2020;9:e56096. DOI 10.7554/eLife.56096

Giménez M.J., Pistón F., Atienza S.G. Identification of suitable reference genes for normalization of qPCR data in comparative transcriptomics analyses in the Triticeae. *Planta*. 2011;233(1):163-173. DOI 10.1007/s00425-010-1290-y

Feng H., Xu M., Liu Y., Gao X., Yin Z., Voegele R.T., Huang L. The distinct roles of Argonaute protein 2 in the growth, stress responses and pathogenicity of the apple tree canker pathogen. *Forest Pathol*. 2017;47(5):e12354. DOI 10.1111/efp.12354

Fraaije B.A., Lovel D.J., Baldwin S. Septoria epidemics on wheat: combined use of visual assessment and PCR-based diagnostics of identity mechanism of diseases escape. *Plant Protect. Sci*. 2002; 38(11):421-424. DOI 10.17221/10512-PPS

Hane J.K., Lowe R.G., Solomon P.S., Tan K.C., Schoch C.L., Spatafora J.W., Crous P.W., Kodira C., Birren B.W., Galagan J.E., Torriani S.F., McDonald B.A., Oliver R.P. Dothideomycete plant interactions illuminated by genome sequencing and EST analysis of the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*. *Plant Cell*. 2007;19(11): 3347-3368. DOI 10.1105/tpc.107.052829

Jeseničnik T., Štajner N., Radišek S., Jakše J. RNA interference core components identified and characterized in *Verticillium nonalfalfae*, a vascular wilt pathogenic plant fungi of hops. *Sci. Rep*. 2019; 9(1):8651. DOI 10.1038/s41598-019-44494-8

Jo S.M., Ayukawa Y., Yun S.H., Komatsu K., Arie T. A putative RNA silencing component protein FoQde-2 is involved in virulence of the tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *J. Gen. Plant Pathol*. 2018;84:395-398. DOI 10.1007/s10327-018-0800-9

Kettles G.J., Hofinger B.J., Hu P., Bayon C., Rudd J.J., Balmer D., Courbot M., Hammond-Kosack K.E., Scalliet G., Kanyuka K. sRNA profiling combined with gene function analysis reveals a lack of evidence for cross-kingdom RNAi in the wheat – *Zymoseptoria tritici* pathosystem. *Front. Plant Sci*. 2019;10:892. DOI 10.3389/fpls.2019.00892

Lee W.S., Fu S.F., Li Z., Murphy A.M., Dobson E.A., Garland L., Chaluvadi S.R., Lewsey M.G., Nelson R.S., Carr J.P. Salicylic acid treatment and expression of an RNA-dependent RNA polymerase 1 transgene inhibit lethal symptoms and meristem invasion during tobacco mosaic virus infection in *Nicotiana benthamiana*. *BMC Plant Biol*. 2016;16:15. DOI 10.1186/s12870-016-0705-8

Ma X., Wiedmer J., Palma-Guerrero J. Small RNA bidirectional crosstalk during the interaction between wheat and *Zymoseptoria tritici*. *Front. Plant Sci*. 2020;10:1669. DOI 10.3389/fpls.2019.01669

Maksimov I.V., Valeev A.Sh., Safin R.F. Acetylation degree of chitin in the protective response of wheat plants. *Biochemistry (Moscow).* 2011;76(12):1342-1346. DOI 10.1134/S0006297911120078

Meng H., Wang Z., Wang Y., Zhu H., Huang B. Dicer and Argonaute genes involved in RNA interference in the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii*. *Appl. Environ. Microbiol*. 2017;83(7): e03230-16. DOI 10.1128/AEM.03230-16

McCombe C.L., Greenwood J.R., Solomon P.S., Williams S.J. Molecular plant immunity against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic fungi. *Essays Biochem.* 2022;66(5):581-593. DOI 10.1042/EBC20210073

Neupane A., Feng C., Mochama P.K., Saleem H., Lee Marzano S.Y. Roles of Argonautes and Dicers on *Sclerotinia sclerotiorum* antiviral RNA silencing. *Front. Plant Sci*. 2019;10:976. DOI 10.3389/fpls.2019.00976

Oliver R.P., Friesen T.L., Faris J.D., Solomon P.S. *Stagonospora nodorum*: From pathology to genomics and host resistance. *Annu. Rev. Phytopathol*. 2012;50:23-43. DOI 10.1146/annurev-phyto-081211-173019

Pradhan M., Pandey P., Baldwin I.T., Pandey S.P. Argonaute 4 modulates resistance to *Fusarium brachygibbosum* infection by regulating Jasmonic acid signaling. *Plant Physiol*. 2020;184(2):1128-1152. DOI 10.1104/pp.20.00171

Raman V., Simon S.A., Demirci F., Nakano M., Meyers B.C., Donofrio N.M. Small RNA functions are required for growth and development of *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Plant Microbe Interact*. 2017;30(7):517-530. DOI 10.1094/MPMI-11-16-0236-R

Shen D., Suhrkamp I., Wang Y., Liu S., Menkhaus J., Verreet J.A., Fan L., Cai D. Identification and characterization of microRNAs in oilseed rape (*Brassica napus*) responsive to infection with the pathogenic fungus *Verticillium longisporum* using Brassica AA (*Brassica rapa*) and CC (*Brassica oleracea*) as refer. *New Phytol.* 2014; 204(3):577-594. DOI 10.1111/nph.12934

Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA 11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol*. 2021;38(7):3022-3027. DOI 10.1093/molbev/msab120

Veselova S., Nuzhnaya T., Burkhanova G., Rumyantsev S., Maksimov I. Reactive oxygen species in host plant are required for an early defense response against attack of *Stagonospora nodorum* Berk. necrotrophic effectors SnTox. *Plants.* 2021;10(8):1586. DOI 10.3390/plants10081586

Wang Q., An B., Hou X., Guo Y., Luo H., He C. Dicer-like proteins regulate the growth, conidiation, and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Hevea brasiliensis. Front Microbiol*. 2018;8: 2621. DOI 10.3389/fmicb.2017.02621

Weiberg A., Wang M., Lin F.M., Zhao H., Zhang Z., Kaloshian I., Huang H.D., Jin H. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science*. 2013; 342(6154):118-123. DOI 10.1126/science.1239705

Yang Z., Huang Y., Yang J., Yao S., Zhao K., Wang D., Qin Q., Bian Z., Li Y., Lan Y., Zhou T., Wang H., Liu Ch., Wang W., Qi Y., Xu Z., Li Y. Jasmonate signaling enhances RNA silencing and antiviral defense in rice. *Cell Host Microbe*. 2020;28(1):89 103.e8. DOI 10.1016/j.chom.2020.05.001

Zhang H., Xia R., Meyers B.C., Walbot V. Evolution, functions, and mysteries of plant ARGONAUTE proteins. *Curr. Opin. Plant Biol*. 2015;27:84-90. DOI 10.1016/j.pbi.2015.06.011

Zeng W., Wang J., Wang Y., Lin J., Fu Y., Xie J., Jiang D., Chen T., Liu H., Cheng J. Dicer-Like proteins regulate sexual development via the biogenesis of perithecium-specific MicroRNAs in a plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Front Microbiol*. 2018; 9:818. DOI 10.3389/fmicb.2018.00818

ORCID
M.Yu. Shein orcid.org/0000-0002-3743-9928
G.F. Burkhanova orcid.org/0000-0003-2346-3502
I.V. Maksimov orcid.org/0000-0002-5707-3265

Благодарности. Работа выполнена в рамках гранта РФФИ-аспирант № 20-34-90004.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.04.2023. После доработки 19.09.2023. Принята к публикации 25.09.2023.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023;27(8):1010-1021
DOI 10.18699/VJGB-23-116

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

Хитозан и его производные как перспективные средства защиты растений

А.Б. Щербань

Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия
atos@bionet.nsc.ru

Аннотация. В современных условиях прирост урожайности сельскохозяйственных культур обеспечивается не за счет расширения площадей их возделывания, а главным образом благодаря внедрению передовых технологий. Наиболее эффективная стратегия включает создание генетически устойчивых к неблагоприятным факторам и продуктивных сортов в сочетании с использованием разнообразных средств защиты растений. Однако традиционные, химические, средства защиты, несмотря на эффективность, имеют существенные недостатки: загрязнение окружающей среды, нарушение экологии, токсичность для человека. В последнее время все больше внимания привлекают биологические (на основе природных соединений) средства защиты растений – они лишены этих недостатков, при этом могут быть не менее эффективными. К таким средствам относится хитозан – продукт деацетилирования хитина, одного из наиболее распространенных в природе полисахаридов. Высокая биологическая активность, биосовместимость и безопасность хитозана определяют широту и эффективность его применения в медицине, промышленности и агробиологии. В обзоре рассмотрены механизмы действия хитозана в качестве биопестицида, включающие как прямое подавляющее воздействие на патогены, так и индукцию внутренних защитных систем растения в результате связывания хитозана поверхностными рецепторами клеток. На множестве растительных объектов показано влияние хитозана на формирование устойчивости к основным классам патогенов: грибам, бактериям и вирусам. Кроме того, в работе оценены способы применения хитозана, включающие обработку семян, листьев, плодов, почвы, а также соответствующие этим методам специфические биологические эффекты. Отдельный раздел посвящен средствам защиты на основе хитозана, полученным как путем его химической модификации, так и с помощью комбинирования тех или иных молекулярных форм с различными веществами, усиливающими его антипатогенное действие. Представленные в обзоре данные дают представление о хитозане и его производных как об эффективных и перспективных средствах защиты растений и биостимуляторах.
Ключевые слова: средства защиты растений; пестицид; хитозан; новохизоль; патоген; устойчивость; урожайность.

Для цитирования: Щербань А.Б. Хитозан и его производные как перспективные средства защиты растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(8):1010-1021. DOI 10.18699/VJGB-23-116

Chitosan and its derivatives as promising plant protection tools

A.B. Shcherban

Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia
atos@bionet.nsc.ru

Abstract. In modern conditions, the increase in the yield of agricultural crops is provided not by expanding the areas of their cultivation, but mainly by introducing advanced technologies. The most effective strategy for this purpose is the development of genetically resistant and productive cultivars in combination with the use of a variety of plant protection products (PPPs). However, traditional, chemical PPPs, despite their effectiveness, have significant drawbacks, namely, pollution of environment, ecological damage, toxicity to humans. Recently, biological PPPs based on natural compounds have attracted more attention, since they do not have these disadvantages, but at the same time they can be no less effective. One of such agents is chitosan, a deacetylation product of chitin, one of the most common polysaccharides in nature. The high biological activity, biocompatibility, and safety of chitosan determine the breadth and effectiveness of its use in medicine, industry, and agrobiology. The review considers various mechanisms of action of chitosan as a biopesticide, including both a direct inhibitory effect on pathogens and the induction of plant internal defense systems as a result of chitosan binding to cell surface receptors. The effect of chitosan on the formation of resistance to the main classes of pathogens: fungi, bacteria, and viruses has been shown on a variety of plant objects. The review also discusses various ways of using chitosan: for the treatment of seeds, leaves, fruits, soil, as well as its specific biological effects corresponding to these ways. A separate chapter is devoted to protection products based on chitosan, obtained by its chemical modifications, or by means of combining of a certain molecular forms of chitosan with various substances that enhance its antipathogenic effect. The data presented in the review generally give an idea of chitosan and its derivatives as very effective and promising plant protection products and biostimulants.
Key words: plant protection products; pesticide; chitosan; novohizol; pathogen; resistance; yield.

For citation: Shcherban A.B. Chitosan and its derivatives as promising plant protection tools. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(8):1010-1021. DOI 10.18699/VJGB-23-116

© Щербань А.Б., 2023

Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

Введение

Интенсивный рост народонаселения планеты ставит перед сельским хозяйством глобальную проблему повышения урожайности основных возделываемых культур растений. Однако потери урожая в результате воздействия многочисленных био- и абиотических факторов могут быть значительными. Особую актуальность представляет контроль над различными патогенами – бактериями, вирусами, грибами, которые не только снижают урожайность, но и ухудшают качество растительной продукции в результате накопления токсинов и других метаболитов в ходе инфекционного процесса. Длительное время этот контроль осуществлялся через использование химических пестицидов, которые охватывают широкий диапазон вредителей, удобны в применении и имеют низкую стоимость. Однако наряду с этим они сильно загрязняют окружающую среду и негативно влияют на здоровье человека (Igbedioh, 1991). Кроме того, их накопление в окружающей среде и живых организмах может приводить к необратимым последствиям в экосистемах и снижению биоразнообразия (Yasmin, D'Souza, 2010). Действие химических средств защиты растений может быть значительно ослаблено из-за появления резистентных к ним форм патогенов, что вызывает необходимость увеличения нормы применения этих средств или создания новых (Kumaraswamy et al., 2018).

Другое направление включает создание новых сортов растений, генетически устойчивых к стрессовым факторам и имеющих повышенную урожайность в различных условиях внешней среды. Хотя этот способ защиты является наиболее надежным и эффективным, эффект его применения может быть временным в связи с появлением новых агрессивных форм патогенов. Характерный пример – возникновение новой расы стеблевой ржавчины Uganda 99, опасного грибного патогена злаковых культур (Singh et al., 2011). К тому же существует риск переноса из других районов таких форм вредителей, к которым те или иные сорта оказываются восприимчивыми.

По-видимому, наиболее эффективной стратегией защиты растений следует считать сочетание методов формирования генетической устойчивости с применением биостимуляторов, или биопестицидов, которые в отличие от химических пестицидов не вызывают загрязнения среды, изменений экосистем и негативного влияния на здоровье человека, при этом не менее эффективны (Тютерев, 2014). За последние десятилетия разработан целый ряд биостимуляторов, используемых для контроля процессов роста и развития растений, увеличения их продуктивности, а также снижения чувствительности к патогенам (Rouphael, Colla, 2020). Среди них особое место занимает хитозан – продукт переработки хитина, второго по распространенности после целлюлозы природного биополимера.

Цель данного обзора заключается в анализе накопленных научных данных об эффективности использования хитозана и его производных для контроля заболеваний растений и увеличения их продуктивности. Обсуждаются механизмы индукции резистентности растений к стрессовым факторам под влиянием этих средств защиты растений.

Хитозан

Предшественником хитозана является хитин – биополимер группы азотсодержащих полисахаридов, состоящий из N-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкозамина (рис. 1). Хитин образует наружный скелет большинства беспозвоночных, а также входит в состав клеточных стенок грибов, дрожжей и водорослей, составляя в качестве структурного полисахарида до 16 % сухого веса организма (Muzzarelli, 2010).

Использование хитозана началось с 80-х гг. прошлого века – с тех пор появилось множество работ, посвященных его применению в химии, медицине и агробиологии (Rinaudo, 2006; Malerba, Cerana, 2016) благодаря уникальным физико-химическим свойствам: биосовместимости, нетоксичности и биодеградации. Некоторые организмы, как например зигомицеты, способны к синтезу хитозана в значительных количествах, что позволяет их использовать для получения этого ценного производного хитина в различных сферах биотехнологии (Karimi, Zamani, 2013).

В промышленности хитозан, как правило, получают из хитина путем деацетилирования в ходе химического процесса с использованием NaOH (Скрябин и др., 2002). Продукты этого процесса гетерогенны по степени деацетилирования, молекулярной массе и другим химическим показателям, что определяет различия их физических свойств (вязкость, растворимость), от которых в свою очередь зависят возможности применения хитозана и его биологические эффекты (Orzali et al., 2017). В медицине его успешно применяют для регенерации тканей благодаря способности образовывать эластичные биопленки на раневой поверхности; также его используют при создании лекарственных препаратов антикоагулянтного и антисклеротического действия (Скрябин и др., 2002; Chen et al., 2021). Другие сферы применения: косметология, пищевая промышленность, очистка сточных вод, защита окружающей среды (Morin-Crini et al., 2019). Во многих странах хитозан и его производные длительное время

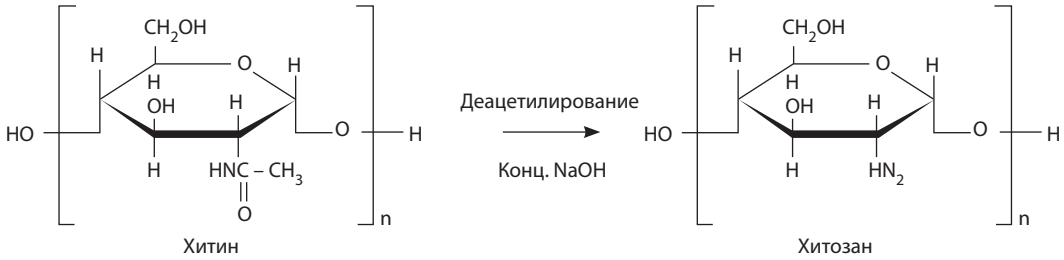


Рис. 1. Структура хитина и его производного – хитозана.

используют в качестве биостимуляторов, повышающих продуктивность растений и их резистентность к патогенам (Тютерев, 2015). Все эти эффекты хитозана наряду с его доступностью и сравнительно невысокой стоимостью делают его применение в качестве биологического средства защиты растений экономически выгодным и обоснованным (Xing et al., 2015).

Хитозан как индуктор иммунитета растений

Индукция внутреннего механизма защиты растений от патогенов представляет собой эффективную и безопасную альтернативу химическим методам защиты. Известно, что ряд веществ могут в качестве элиситоров усиливать резистентность к патогенам (Gaffney et al., 1993; Malerba, Cerana, 2016). Полисахарид хитозан – один из наиболее эффективных стимуляторов резистентности (Falcón-Rodríguez et al., 2012). Механизм его действия пока недостаточно изучен. Предполагается связывание хитозана с трансмембранными клеточными рецепторами, которые в настоящий момент не идентифицированы. Также не выявлены протеинкиназные каскады, передающие сигнал от рецепторов транскрипционным факторам или генам защиты. Были предложены различные модели для объяснения роли хитозана в иммунитете растений (Orzali et al., 2017). Наиболее распространенная модель предполагает индукцию хитозаном неспецифической PAMP (pathogen-associated molecular pattern) – системы иммунитета, которая включает ряд взаимосвязанных сигнальных каскадов (Тютерев, 2002; Tang et al., 2012).

Центральную роль в этой системе играют гормональные пути, ассоциированные с синтезом салициловой и жасмоновой кислот (СК и ЖК). В частности, активируется октадеканоидный путь, приводящий к накоплению в тканях ЖК (Ishiguro et al., 2001). Данный гормон наряду с СК активирует гены защиты, кодирующие разнообразные PR-белки (pathogenesis related) (Reinbothe et al., 2009). Другой путь инициируется накоплением свободных радикалов кислорода (ROS, reactive oxygen species), которые образуются в тканях на самом раннем этапе стресса. Помимо прямого токсического воздействия на патогены ROS функционируют как клеточные сигнальные молекулы, запускающие защитные реакции растений, такие как укрепление клеточной стенки, синтез гормонов и запрограммированная гибель клеток (Grant, Loake, 2000). В развитии системной устойчивости также задействован сигнальный путь оксида азота (NO), который активирует ранний защитный ответ, включая реакцию гиперчувствительности, формирование каллозного слоя и экспрессию ряда белков: PR-1 и PR-5, хитиназы (CHI), полифенолоксидазы (PPO), пероксидазы (POX), супероксиддисмутазы (SOD), каталазы (CAT) и фенилаланин-аммоний-лиазы (PAL) (Manjunatha et al., 2008, 2009). PPO, POX, SOD и CAT являются основными ферментами, нейтрализующими избыток радикалов кислорода (Elsharkawy et al., 2022). PAL участвует в биосинтезе фенольных соединений, имеющих защитную функцию, таких как флавоноиды, фенилпропаноиды и лигнин (Appert et al., 1994).

В результате обработки хитозаном в тканях растений накапливаются фитоалексины – низкомолекулярные антибиотические вещества (Hadwiger, 2013). Также индуцируется синтез каллозы – полисахарида, который откладывается в клеточной стенке и служит барьером для проникновения патогенных организмов (Köhle et al., 1985; Conrath et al., 1989). Этой же цели служит процесс лигнификации, усиливающийся под воздействием хитозана (Hirano et al., 1999). В частности, показано, что формирование структурных барьеров на пути патогена служит основной реакцией растения на хитозан у томата *Solanum lycopersicum* L. (Benhamou et al., 2001). Под влиянием хитозана усиливается подавление протеолитических ферментов, выделяемых патогенами для проникновения в ткани растения (Peña-Cortes et al., 1988). Эффект воздействия хитозана проявляется и в редукции размера устьиц в результате снижения их чувствительности к свету (Lee et al., 1999). Возможно, этот эффект связан с гормональной активностью ЖК, сходной с таковой у абсцизовой кислоты, которая выступает ключевым регулятором процесса транспирации (Sembdner, Parthier, 1993). Другие авторы выявили роль хитозана в биосинтезе куркумина – мощного природного антиоксиданта, депонируемого в корневой ткани у куркумы *Curcuma longa* L. (Sathiyabama et al., 2016). Таким образом, был установлен широкий спектр регуляторных эффектов, усиливающих иммунитет растений при обработке хитозаном (рис. 2, *а*).

Помимо элиситорного действия на клетки растения хитозан способен оказывать прямое воздействие на патогены.

Механизмы антипатогенного действия хитозана

Хитозан проявляет разнообразие антипатогенной активности, которая зависит, с одной стороны, от его химических свойств и способа получения, а с другой, от особенностей растения-хозяина и условий внешней среды. В некоторых работах олигомерные формы хитозана (пента- или гептамеры) проявляли более высокую фунгицидную активность по сравнению с более крупными молекулами (Rabea et al., 2003), тогда как в других, наоборот, повышение антипатогенного эффекта наблюдалось с увеличением молекулярного веса (Kulikov et al., 2006).

В отличие от природного хитина, молекулы которого не заряжены и не имеют антимикробного действия, хитозан имеет положительный заряд. Согласно одной из моделей, в результате электростатического взаимодействия молекул хитозана с отрицательно заряженными поверхностями клеток патогена происходят повышение проницаемости плазматических мембран и деструкция клеточной стенки (Je, Kim, 2006). Другой механизм предполагает образование непроницаемого полимерного слоя хитозана на поверхности клеток, препятствующего поглощению нутриентов и одновременно экскреции метаболитов в межклеточное пространство (Xing et al., 2015). Хитозан также способен хелатировать ионы металлов и некоторые питательные вещества, необходимые для развития бактерий или грибов, тем самым ингибируя размножение последних и выработку ими токсинов (El Hadrami et al., 2010; Xing et al., 2015). В ряде работ отмечено ингибирующее воздействие хитозана на различные стадии развития патогена (Rabea et al., 2005; Meng et al., 2010; Reglinski et al., 2010; Badawy, Rabea, 2011). Механизмы антипатогенного действия хитозана представлены на рис. 2, *б*.

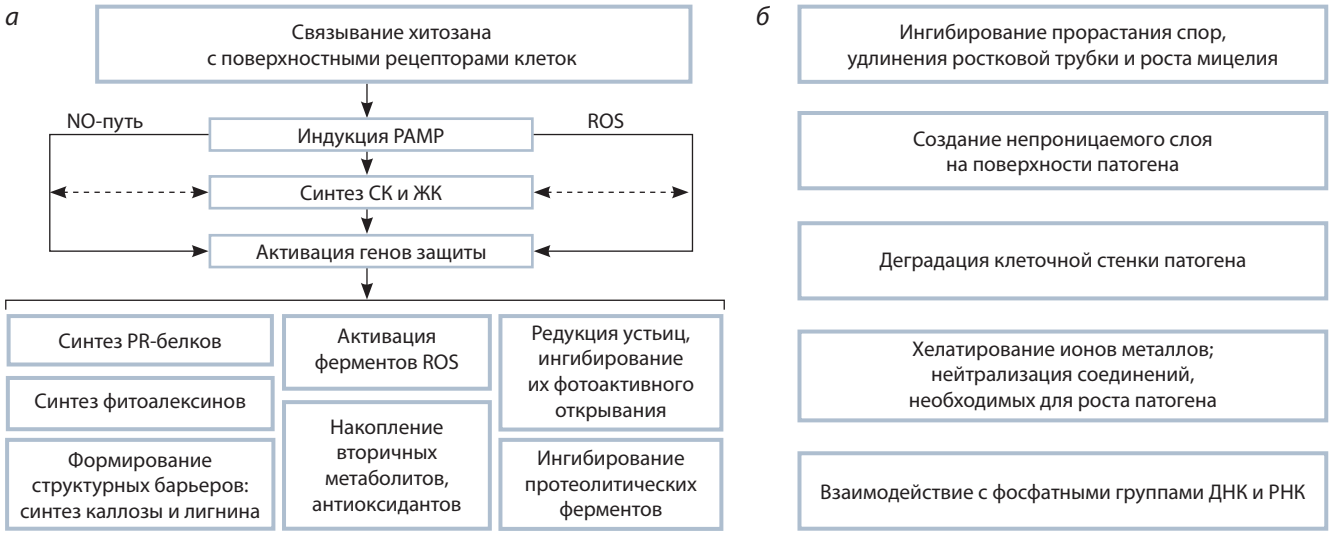


Рис. 2. Воздействие хитозана на защитные механизмы растения (*а*) и его антипатогенные эффекты (*б*).

Применение хитозана для защиты от различных патогенов

В связи с изменением климата за последние 10–15 лет наблюдается все более интенсивное развитие различных инфекционных заболеваний основных культур растений, что приводит к значительному падению их урожайности и снижению качества продукции. Самые широко распространенные – грибные болезни, на долю которых приходится более 80 % всех заболеваний сельскохозяйственных растений (Гарибова, Сидорова, 1997). Так, например, мягкую пшеницу *Triticum aestivum* L. (2*n* = 42) могут поражать 25 грибных заболеваний, включая головневые, ржавчинные и корневые гнили. Потери урожая от этих заболеваний в отдельных очагах распространения могут достигать 70 % и более (Singh et al., 2011).

В условиях *in vitro* показано фунгицидное действие хитозана против целого ряда патогенных грибов, представителей родов *Botrytis*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Rhizoctonia* и др. (Orzali et al., 2017). При этом продемонстрировано супрессивное воздействие хитозана на различные стадии развития гриба: рост мицелия, стадию споруляции, жизнеспособность спор и эффективность их прорастания, способность гриба продуцировать факторы вирулентности (Badawy, Rabea, 2011). Например, хитозан полностью ингибировал прорастание спор и мицелиальный рост у *Alternaria kikuchiana* S. Tanaka и *Physalospora piricola* Nose (Meng et al., 2010). Кроме того, у винограда он эффективно подавлял рост мицелия гриба *Botrytis cinerea* Pers. в культуре, а также на листьях и гроздьях плодов (Reglinski et al., 2010). E.I. Rabea и коллеги сообщали о повышенной фунгицидной активности 24 химически модифицированных производных хитозана по сравнению с обычным хитозаном на модели радиального роста гиф грибов *B. cinerea* и *Pyricularia grisea* (2005). Другие авторы показали, что хитозан способен проникать через плазматическую мембрану *Neurospora crassa* Shear и вызывать гибель клеток в результате нарушения энергетического баланса (Palma-Guerrero et al., 2009). Продемонстрировано повышение устойчивости томата к альтернариозу под действием хитозана (Байрамбеков и др., 2012). Его эффективность в борьбе с возбудителем антракноза (*Colletotrichum* sp.) у огурцов сравнима с химическими фунгицидами (Dodgson J.L.A., Dodgson W., 2017). Обработка хитозаном растений мягкой пшеницы до их инфицирования грибным патогеном *Fusarium graminearum* Schwabe, возбудителем фузариозной гнили, значительно снижает количество пораженных колосьев (Kheiri et al., 2016). У этой же культуры определено влияние хитозана на устойчивость к другому опасному грибному заболеванию – бурой листовой ржавчине, вызываемой *Puccinia triticina* Erikss. (Elsharkawy et al., 2022).

Хитозан и его производные ингибируют рост различных бактерий (Fei Liu et al., 2001; Wiśniewska-Wrona et al., 2007; Rabea, Steurbaut, 2010; Badawy et al., 2014). Однако последние менее чувствительны к действию хитозана нежели грибы (Kong et al., 2010). Его минимальная ингибиторная концентрация варьирует от 0.05 до 0.1 % в зависимости от вида бактерий, молекулярного веса хитозана и pH раствора (Katiyar et al., 2014). Некоторые исследователи показали более сильное влияние хитозана на грамположительные бактерии по сравнению с грамотрицательными (No et al., 2002; Tayel et al., 2010). Это можно объяснить тем, что последние формируют дополнительную наружную мембрану, которая непроницаема для высокомолекулярного хитозана (Xing et al., 2015). Однако, как показано в других работах, при определенных условиях (pH, содержание катионов Mg^{2+}) хитозан способен преодолевать этот барьер, делая грамотрицательные бактерии более чувствительными к своему действию (Helander et al., 2001). Хитозан негативно влияет на рост целого ряда патогенных бактерий, включая *Xanthomonas* (Li et al., 2008), *Pseudomonas syringae* van Hall (Mansilla et al., 2013), *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn. и *Erwinia carotovora* (Jones) Waldee (Badawy et al., 2014). Также показана антимикробная активность производных хитозана в отношении *Escherichia coli* Migula и *Staphylococcus aureu* Rosenbach (Su et al., 2009).

Ряд работ посвящены антивирусным эффектам хитозана (Su et al., 2009). У растений хитозан индуцирует устойчивость к вирусным заболеваниям, препятствуя распространению вирусов и вироидов, так что у большинства обработанных растений не развивается системная вирусная инфекция (Chirkov, 2002). Установлено, что хитозан усиливает экспрессию РНКаз, которые связаны с развитием резистентности к вирусу X картофеля (PVX), подавляя его репликацию в клетках (Iriti, Varoni, 2015). Обработанные хитозаном растения томата не только проявляют устойчивость к вирусу мозаики томата, но и повышенный вегетативный рост (Abd El-Gawad, Bondok, 2015). Также хитозан эффективно подавляет развитие вируса мозаики люцерны (AIMV), табака (TMV) и кабачков (SMV) (Nagorskaya et al., 2014). При этом уровень супрессии вирусной инфекции варьирует в зависимости от молекулярного веса хитозана. Низкомолекулярный хитозан подавляет формирование локальных некрозов, вызываемых TMV, на 50–90 % (Davydova et al., 2011).

Примеры действия хитозана против различных патогенов растений приведены в таблице. Индуцируемая хитозаном реакция защиты зависит не только от вида растения или патогена, но также условий и способа его применения.

Способы применения хитозана

Обработка семян

Существует много примеров влияния обработки семян на устойчивость растений к инфекциям (Benhamou et al., 1994; Algam et al., 2010; Amini, 2015). В большинстве случаев наибольшую эффективность демонстрировал низкомолекулярный хитозан (Orzali et al., 2017). Механизмы повышения резистентности при этом различаются в зависимости от возбудителя. Так, показано, что обработка семян жемчужного проса 4 % раствором хитозана на 48 % повышает устойчивость к ложной мучнистой росе, вызываемой оомицетом *Sclerospora graminicola* (Sacc.) J. Schröt (Sharathchandra et al., 2004). При этом установлено усиление экспрессии ряда белков, связанных с сигнальным NO-путем (см. выше). Аналогичный эффект обработки семян обнаружен у подсолнечника по отношению к возбудителю ложной мучнистой росы *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni (Nandeeshkumar et al., 2008). Обработка хитозаном семян пшеницы *T. aestivum* увеличивала устойчивость к облигатным фитопатогенам за счет накопления фенольных соединений и лигнификации клеточных стенок на следующих после прорастания стадиях развития растения (Bhaskara Reddy et al., 1999). Усиление процесса лигнификации установлено при обработке хитозаном семян чилийского перца, что увеличивало выживаемость проростков, инфицированных возбудителем антракноза (Photchanachai et al., 2006). Обработка семян хитозаном индуцировала резистентность у тетраплоидной пшеницы *Triticum durum* Desf. к возбудителю фузариоза *F. graminearum* (Orzali et al., 2014). При этом анализ тканей растений показал увеличение активности ферментов: гваякол-зависимой пероксидазы (POD), аскорбат-зависимой пероксидазы (APX), а также PPO и PAL.

Кроме антипатогенного воздействия эффект обработки семян хитозаном основывается на усилении метаболических процессов. Так, вымачивание семян пшеницы в растворе хитозана (в форме поли- или олигомера) увеличивало длину стебля и корней у проростков спустя 6 дней после обработки (Krivtsov et al., 1996). Впоследствии эти данные подтверждены китайскими учеными, которые обнаружили, что обработка низкомолекулярным хитозаном увеличивает энергию прорастания семян пшеницы, а также жизнеспособность, биомассу и урожайность растений, что связано с ускоренным метаболизмом углерода и азота (Zhang et al., 2017).

Обработка почвы

Предполагается, что добавление хитозана в почву улучшает ее структуру, а также способствует увеличению объема полезных почвенных микроорганизмов. Есть данные о повышении популяции актиномицетов и псевдомонад, а также *Bacillus subtilis* в почвах, обработанных хитозаном (Mulawarman et al., 2001). Последний также благоприятно воздействует на развитие микоризных грибов (Park, Chang, 2012). Кроме того, хитозан способен химически нейтрализовать токсичные вещества, пестициды и удобрения (Xing et al., 2015). Положительное влияние хитозана в почве включает и индукцию в растениях механизмов защиты от почвенных патогенов. Например, у томата наблюдалось значительное ингибирование патогенного гриба *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* и нематоды *Meloidogyne javanica* Treub в результате деполяризации мембран корневых клеток, продуцирующих гормоны, сигнальные липиды и различные защитные вещества, включая фенольные соединения (Suarez-Fernandez et al., 2020). Однако в другой работе показано, что обработка хитозаном корней не влияла на развитие фузариоза у чувствительных сортов сельдерея, но эффективно снижала проявления заболевания у толерантного сорта (Bell et al., 1998).

Хитозан, применяемый в качестве почвенного дренажа, контролировал у томата развитие бактериального патогена *Ralstonia solanacearum* Smith как в результате прямого воздействия на патоген, так и благодаря элиситорным эффектам, таким как синтез CHI и B-2,3-глюканазы (GLU) – фермента, расцепляющего крупные полисахариды (Algam et al., 2010). Почвенная обработка хитозаном эффективно контролировала развитие фитофтороза у сладкого перца (Kim et al., 1997) и клубники (Eikemo et al., 2003). У финиковой пальмы хитозан активировал в клетках корней такие ферменты, как POD и PPO, а также продукцию гидроксикоричной кислоты, которая способствует резистентности к *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* (Hassni et al., 2004). В ряде работ отмечена высокая эффективность хитозана, внесенного в почву для борьбы с нематодами различных видов, при этом его действие снижало численность популяции нематоды, массу яиц и степень поражения корней (Khalil, Badawy, 2012; El-Sayed, Mahdy, 2015).

Обработка листьев

Обработку вегетирующих растений хитозаном применяли для многих видов в различных целях. Например, у ячменя *Hordeum vulgare* L. она вызывала окислительный

Защитные действия хитозана у растений

Растение-хозяин	Патоген	Эффекты	Литературный источник
		Грибные патогены	
Твердая пшеница	*F. graminearum*	Активация генов защиты (*PAL*, *POD*) и накопление фенольных соединений	Orzali et al., 2014
Мягкая пшеница	*F. graminearum*	Накопление лигнина и фенолов	Bhaskara Reddy et al., 1999
Просо	*A. kikuchiana*	Активация ферментов ROS	Meng et al., 2010
Жемчужное просо	*S. graminicola*	Повышение уровня оксида азота (NO), активация ранних генов защиты (*PR-1*), синтез каллозы	Manjunatha et al., 2008, 2009
Подсолнечник	*P. halstedii*	Активация генов защиты (*PR-1a*, *CHI*, *POX*, β-1,3-глюканазы и др.)	Nandeeshkumar et al., 2008
Томат черри	*A. alternata*	Активация генов защиты (*PPO*, *POD*, *PAL*)	Chen et al., 2014
Сладкий перец	*B. cinerea*	Ингибирование ростковой трубки гриба, супрессия полигалактуроназы	Ghaouth et al., 1997
Морковь	*S. sclerotiorum*	Деструкция плазматической мембраны патогена, активация генов защиты (*POX*, *PPO*)	Qing et al., 2015
Перец чили	*Colletotrichum sp.*	Накопление лигнина	Photchanachai et al., 2006
Виноград	*B. cinerea*	Активация генов защиты (*PAL* и др.)	Reglinski et al., 2010
Огурец	*P. aphanidermatum*	Формирование структурных барьеров и активация генов защиты	Ghauoth et al., 1994
Личи	*P. litchii*	Накопление лигнина, увеличение экспрессии генов *CHI* и *APX*	Jiang et al., 2018
Персик	*M. fructicola*	Увеличение экспрессии генов *POX* и *GLU*	Ma et al., 2013
Финиковая пальма	*F. oxysporum* f. sp. *albedinis*	Активация генов защиты (*POX*, *PPO*) и накопление фенольных соединений	Hassni et al., 2004
Картофель	*V. dahlia*	Подавление роста гриба	Amini, 2015
	P. infestans	Накопление СК, активация *PAL* и др.	Zheng et al., 2021
	A. solani	Деградация клеточной стенки патогена (активация *CHI*)	Abd El-Kareem, Haggag, 2014
Томат	*F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*	Индукция гормонов (СК, ЖК, абсцизовой кислоты), накопление фенольных соединений и других стресс-индуцируемых метаболитов	Suarez-Fernandez et al., 2020
	B. cinerea	Синтез каллозы, накопление ЖК, экспрессия Avr9/cf-9	De Vega et al., 2021
	P. expansum	Деструкция мембран спор, активация генов защиты	Liu et al., 2007
		Бактериальные патогены	
Абрикос	*B. seminalis*	Деструкция мембраны патогена, лизис бактерий	Lou et al., 2011
Томат	*R. solanacearum*	Активация генов защиты *CHI* и *GLU*	Algam et al., 2010
Дыня	*A. citrulli*	Деструкция мембраны патогена, лизис бактерий	Li et al., 2013b
		Вирусы	
Картофель	PVX (вирус X)	Увеличение экспрессии РНКаз	Iriti, Varoni, 2015
Табак	TMV (вирус мозаики)	Увеличение активности гидролаз, морфологическая деструкция вируса	Nagorskaya et al., 2014
	TNV (вирус некроза)	Накопление каллозы, микроокислительные взрывы, реакция гиперчувствительности	Iriti et al., 2006
Томат	ToMV (вирус мозаики)	Усиление вегетативного роста растений, синтез антиоксидантов (аскорбиновой кислоты)	Abd El-Gawad, Bondok, 2015
		Нематоды	
Томат	*M. incognita*	Прямое воздействие на паразита	Khalil, Badawy, 2012
	M. javanica	Усиление вегетативного роста растений, прямое воздействие на паразита	El-Sayed, Mahdy, 2015

взрыв и наработку фенольных соединений в листьях, что создавало неблагоприятную среду для распространения грибов (Faoro et al., 2008). Такие процессы, как накопление каллозы, микроокислительные взрывы, реакция гиперчувствительности, развивались и при обработке листьев, что обеспечивало его устойчивость к TNV (Iriti et al., 2006). В другом исследовании были изучены эффекты препаративных форм хитозана в подавлении мучнистой росы у винограда (Iriti, Varoni, 2015). У томата обработка листьев раствором хитозана вызывала резистентность к патогенному грибу *B. cinerea* (De Vega et al., 2021). Эта резистентность коррелировала с отложением каллозы в местах инфицирования, аккумуляцией ЖК и экспрессией элиситорного белка Avr9/cf-9.

В листьях огурца хитозан активировал ряд защитных реакций против оомицета *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp., включающих индукцию защитных барьеров (см. выше), стимуляцию CHI, хитозаназы и GLU (Ghauoth et al., 1994). Эффект препаратов хитозана против гриба *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary при листовой обработке картофеля проявлялся в увеличении содержания полифенолов в тканях растений и подавлении роста возбудителя (Zheng et al., 2021). У того же вида аналогичный эффект продемонстрирован против возбудителя раннего фитофтороза *Alternaria solani* Sorauer (Abd El-Kareem, Haggag, 2014). У риса выявлено несколько механизмов ингибирования бактериальных патогенов с помощью обработки листьев растений хитозаном: с одной стороны, прямое воздействие, вызывающее лизис мембран клеток и деструкцию бактериальных биопленок, с другой, увеличение продукции защитных белков растения, включая белки окислительного стресса (пероксидазы и оксидазы), PAL и др. (Li et al., 2013a; Stanley-Raja et al., 2021). Все эти механизмы в совокупности обеспечивали устойчивость риса к таким патогенным бактериям, как *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* и *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, возбудителям бактериального фитофтороза и полосатости листьев соответственно. Положительное влияние обработки листьев на резистентность показано и на других растительных объектах (Reglinski et al., 2010; Lou et al., 2011; Li et al., 2013b).

Обработка плодов

Обработка плодов биостимуляторами представляет большой интерес в связи с проблемой толерантности многих патогенов, развивающихся на плодах после сбора урожая, к обычным химическим пестицидам, а также из-за токсичности последних для человека. Как продемонстрировано, хитозан уменьшает интенсивность дыхания, продукцию этилена – гормона старения, потерю влаги, тем самым способствуя длительному сохранению качества фруктов и овощей (Li, Yu, 2001). Так, у плодов сладкого перца под действием хитозана снижается продукция мацерирующих ферментов клеточных стенок, разрушающих пектины и целлюлозу (Ghaouth et al., 1997). В плодах томатов черри хитозан и его комплекс с метилжасмонатом усиливают активность PPO, POD и PAL в присутствии гриба *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. (Chen et al., 2014). Плоды папайи, обработанные только хитозаном или хитозаном в комплексе с растительными экстрактами, сохраняют устойчивость к возбудителю антракноза (Bautista-Baños et al., 2003). Обработка плодов личи кадозаном (новой формуляцией хитозана) эффективно уменьшает их чувствительность к фитофторозу за счет увеличения активности CHI, GLU, APX, а также накопления лигнина в процессе хранения (Jiang et al., 2018). Хитозановая обработка подавляет грибы *B. cinerea* и *Penicillium expansum* Link (возбудители серой и голубой плесени соответственно) в ходе хранения плодов томата посредством прямого фунгицидного механизма, включающего деструкцию оболочки спор, а также за счет высокой активности PPO и POD в тканях плодов (Liu et al., 2007).

Результаты другого исследования показали, что комбинация хитозана с пчелиным воском и эфирным маслом лайма оказывает фунгицидное действие на *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill., ингибируя рост мицелия, прорастание спор и споруляцию этого гриба у картофеля (Ramos-García et al., 2012). W. Qing и коллеги оценили влияние хитозана на контроль *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (склеротиниозная гниль) у моркови (2015). В результате были установлены различные антипатогенные эффекты, включающие повреждение плазматических мембран, перекисное окисление липидов и потерю белка наряду с повышением активности PPO и POD в тканях плодов. Другие авторы показали, что вымачивание собранных плодов сладкой вишни или их орошение до уборки раствором хитозана эффективно подавляет целый спектр грибных патогенов: *B. cinerea*, *P. expansum*, *R. stolonifera*, *A. alternata* и *Cladosporium* spp. (Romanazzi et al., 2003). Редукция симптомов заражения коррелировала с защитным ответом, связанным с накоплением PAL. Z. Ma с коллегами обнаружили, что индукция экспрессии GLU, POD, CAT, CHI и других ферментов под действием хитозана контролирует бурую гниль (*Monilinia fructicola*), поражающую плоды персика (2013). Однако не во всех случаях действие хитозана *per se* имело положительный результат. Так, он не обеспечивал полную защиту плодов груши от голубой плесени (*P. expansum*), хотя в комбинации с *Cryptococcus laurentii* и хлоридом кальция был весьма эффективен (Meng et al., 2010).

Средства защиты растений на основе хитозана

Несмотря на значительное число положительных эффектов хитозана в отношении контроля заболеваний растений, в настоящее время его применение в чистом виде ограничено из-за недостаточной эффективности. Повышение биологической эффективности препаратов на основе хитозана достигается за счет его химической модификации, влияющей на физические свойства, подбором оптимального для той или иной системы соотношения «патоген–хозяин» низко- и высокомолекулярных форм хитозана, а также путем создания комплексов с другими биологически активными веществами. К последним, в частности, относятся органические кислоты – салициловая, арахидоновая, янтарная и глутаминовая, которые индуцируют механизмы локальной и системной устойчивости растений к патогенам и за счет этого повышают продуктивность растений в неблагоприятных условиях.

В настоящий момент в России разработан целый ряд комплексных препаратов, среди которых «Нарцисс» (ОАО

«Группа компаний «Агропром-МДТ»), «Хитозар» (разработчик – Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин), «Экогель» (ООО «Биохимические технологии»). Особый интерес представляет «Нарцисс», включающий хитозан (50 %), янтарную (30 %) и глютаминовую (20 %) кислоты. Он повышает устойчивость пшеницы к бурой ржавчине и корневым гнилям, риса к пирикуляриозу, томатов к фитофторозу и фузариозу, огурцов к мучнистой росе и т. д. (Баданова и др., 2016). Кроме того, препарат разрушает хитиновую оболочку галловых нематод (Доброхотов, 2000; Гольдин, 2014). Другой препарат, «Экогель», получен путем магнитного обогащения лактата хитозана ионами серебра (http://ekogel.ru/shop/poleznaya-informaciya/laktat-hitozana-dlya-rasteniy-svoystva-primenenie). Данный препарат улучшает рост растений и корнеобразование, повышает устойчивость таких культур, как сахарная свекла, подсолнечник и картофель, к грибным, бактериальным и вирусным болезням при его применении методом обработки семян и опрыскивания растений (Тютерев, 2015). Во Всероссийском НИИ защиты растений создан ряд препаратов под общим названием «Хитозар» на основе хитозана и других биологически активных веществ. В их состав кроме хитозана входят СК и фосфористокислый калий («Хитозар М»), арахидоновая кислота («Хитозар Ф»). Эти комбинированные препараты защищали от таких вредителей, как мучнисторосяные и ложномучнисторосяные грибы, калифорнийский трипс (Кириллова, 2015; Баданова и др., 2016). В частности, на картофеле продемонстрирована активность препаратов с арахидоновой и салициловой кислотами против фитофторы (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) и вируса Y соответственно. В случае фитофторы биологическая эффективность комплекса была на 15 % выше в сравнении с обработкой одним хитозаном, а в случае вируса Y растения после обработки комплексом показали полную устойчивость (у предварительно обработанных только хитозаном – 6.7 % зараженных) (Тютерев, 2015).

Как известно, по типу питания патогены классифицируются на био-, некро- и гемибиотрофы, имеющие различную чувствительность к ROS, уровень которых контролируется антиоксидантной системой. Было изучено влияние иммуномодуляторов на основе хитозана, ванилина и СК на устойчивость пшеницы к различающимся по типу питания возбудителям бурой ржавчины и темно-бурой пятнистости. Создан комбинированный препарат хитозана с определенным соотношением ванилина и СК, который обеспечивал высокий антипатогенный эффект по отношению к обоим возбудителям за счет модуляции активности ферментов антиоксидантной системы (Попова и др., 2018).

Перспективное направление защиты растений включает использование комплекса хитозана с альгинатом – полисахаридом, входящим в состав клеточной стенки бурых водорослей. Этот комплекс обеспечивает инкапсулирование полезных микроорганизмов, которые могут использоваться в качестве пробиотиков и антагонистов патогенной флоры (Saberi Riseh et al., 2021).

Как уже сказано выше, данные относительно антипатогенной активности низко- и высокомолекулярного хитозана противоречивые, что во многом обусловлено отсутствием единой надежной методики определения его молекулярной массы, а также тем, что в большинстве случаев препараты хитозана представляют собой смесь молекул разного размера. Наряду со сложностью и дороговизной анализа состава этих препаратов (уровня полимеризации молекул, степени их ацетилирования и т. д.) некоторые химические особенности хитозана также ограничивают его применение. Так, растворимость и, следовательно, эффективность хитозана в нейтральных или щелочных средах (почве или водном растворе) значительно уступают таковым в кислой среде (Katiyar et al., 2014). Растворимость хитозана в широком диапазоне pH можно повысить путем химической модификации полимерной молекулы, например в результате взаимодействия с маннозой (Yu et al., 2023), присоединения метильных групп (Wang et al., 2015), а также путем внутримолекулярного сшивания. Последним методом получено новейшее производное хитозана – новохизоль. В отличие от линейной молекулы хитозана молекула новохизоля имеет глобулярную, близкую к сферической, форму (https://www.novochizol.ch). Такой молекулярный дизайн дает ему ряд преимуществ перед хитозаном: более высокую химическую стабильность, низкую степень биодеградации, растворимость в водных растворах с pH > 6, повышенную адгезию, способность удерживать в составе глобул различные вещества активного действия, например фунгициды, и медленно высвобождать их. Последнее свойство обеспечивает значительное уменьшение эффективных концентраций активных веществ и, соответственно, снижение их негативного влияния на экосистемы и человека.

Уникальные возможности новохизоля позволяют комбинировать с ним практически любые вещества (низко- и высокомолекулярные, гидрофильные, гидрофобные, даже нерастворимые), а также бактерии, грибы и их споры, вирусы. Различные способы комбинирования (путем импрегнации или эмульгации) дают возможность регулировать дозу активного компонента и скорость его высвобождения, степень адгезии и другие параметры. Недавно показано, что обработка новохизолем стимулирует прорастание семян мягкой пшеницы в почвенном субстрате, а также способствует увеличению как корневой биомассы, так и общей биомассы проростков (в 1.5 и 1.8 раза соответственно) (Teplyakova et al., 2022). В отличие от хитозана в настоящий момент пока слабо изучено воздействие новохизоля и его комплексов на устойчивость растений к патогенам. Предполагается, что такое влияние может иметь гораздо более выраженный эффект за счет синергического действия новохизоля *per se* и действия его активных компонентов, переносчиком которых он может служить. Уже есть подтверждающие это предположение предварительные данные, полученные на разных растительных объектах (https://www.novochizol.ch/agrotechnology/).

Заключение

Среди подходов, направленных на повышение устойчивости растений к тем или иным факторам, биологические средства защиты имеют большую перспективу, поскольку в отличие от большинства используемых химических пестицидов не загрязняют окружающую среду и неток-

сичны для человека. К таким средствам защиты растений относится хитозан – деацетилированное производное хитина. По данным многочисленных авторов, обработка хитозаном приводит к увеличению биомассы растений и повышению их устойчивости к био- и абиотическим факторам внешней среды. Антипатогенные эффекты хитозана связаны как с непосредственным влиянием на патогены, так и его элиситорным действием, обусловленным индукцией PAMP. Специфические биологические эффекты хитозана определяются видами патогена и растения-хозяина, условиями внешней среды и способом применения в зависимости от органа растения, подвергаемого обработке. Несмотря на успешное использование хитозана в агробиологии, его такие физико-химические свойства, как низкая растворимость и адгезия, химическая нестабильность, ограничивают данное применение. Недавно разработаны ряд препаратов хитозана в комплексе с биологически активными веществами, усиливающими его действие, а также улучшенное химическое производное – новохизоль, имеющий большой потенциал для использования в качестве биостимулятора и эффективного средства защиты растений.

Список литературы / References

Баданова Е.Г., Давлетбаев И.М., Сироткин А.С. Препараты на основе хитозана для сельского хозяйства. *Вестник технологического университета*. 2016;19(16):89-95
[Badanova E.G., Davletbaev I.M., Sirotkin A.S. Preparations based on chitosan for agriculture. *Vestnik Tekhnologicheskogo Universiteta = Herald of Technological University*. 2016;19(16):89-95 (in Russian)]

Байрамбеков Б., Полякова Е.В., Мукатова М.Д., Киричко Н.А. Биостимулятор на основе низкомолекулярного хитозана из панциря раков для предпосевной обработки семян томатов. *Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство*. 2012;1:181-184.
[Bayrambekov B., Polyakova E.V., Mukatova M.D., Kirichko N.A. Biostimulator on the basis of low-molecular chitosan from the crayfish crust for preplant processing of tomato seeds. *Vestnik Astrakhanskogo Gosudarstvennogo Tekhnicheskogo Universiteta. Seriya: Rybnoe Khozyaystvo = Vestnik of Astrakhan State Technical University. Series: Fishing Industry*. 2012;1:181-184 (in Russian)]

Гарибова Л.В., Сидорова И.И. Грибы. М.: Просвещение, 1997
[Garibova L.V., Sidorova I.I. Mushrooms. Moscow: Prosveshcheniye Publ., 1997 (in Russian)]

Гольдин Е.Б. Биологическая защита растений в свете проблем XXI века. *Геополитика и экогеодинамика регионов*. 2014;10(2):99-107
[Gol'din E.B. The biological plant protection in the light of problems of XXI century. *Geopolitika i Ekogeodinamika Regionov = Geopolitics and Ecogeodynamics of Regions*. 2014;10(2):99-107 (in Russian)]

Доброхотов С.А. Нарцисс в теплицах против галловой нематоды. *Защита и карантин растений*. 2000;4:21
[Dobrokhotov S.A. Narcissus in greenhouses against root-knot nematodes. *Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine*. 2000;4:21 (in Russian)]

Кириллова О.С. Семиохимические взаимодействия и индуцированные защитные реакции в растениях огурца при повреждении фитофагами. Дис. кандидата биол. наук. Санкт-Петербург; Пушкин, 2015
[Kirillova O.S. Semiochemical interactions and induced defense responses in cucumber plants damaged by phytophages. Cand. Sci. (Biol.) Dissertation. St. Petersburg; Pushkin, 2015 (in Russian)]

Попова Э.В., Домнина Н.С., Коваленко Н.М., Сокорнова С.В., Тютерев С.Л. Влияние гибридных производных хитозана на устойчивость пшеницы к патогенам с разной стратегией питания. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2018;54(5):540-545. DOI 10.1134/S055510991805015X
[Popova E.V., Domnina N.S., Kovalenko N.M., Sokornova S.V., Tyuterev S.L. Influence of chitosan hybrid derivatives on induced wheat resistance to pathogens with different nutrition strategies. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2018;54(5):535-539. DOI 10.1134/S0003683818050150]

Скрябин К.Г., Вихорева Г.А., Варламов В.П. Хитин и хитозан: получение, свойства и применение. М.: Наука, 2002
[Skryabin K.G., Vikhoreva G.A., Varlamov V.P. Chitin and Chitosan: Obtaining, Properties and Application. Moscow: Nauka Publ., 2002 (in Russian)]

Тютерев С.Л. Научные основы индуцированной болезнеустойчивости растений. СПб.: ВИЗР, 2002
[Tyuterev S.L. Scientific bases of induced disease resistance of plants. St. Petersburg: VIZR Publ., 2002 (in Russian)]

Тютерев С.Л. Природные и синтетические индукторы устойчивости растений к болезням. СПб.: Родные просторы, 2014.
[Tyuterev S.L. Natural and synthetic inducers of plant resistance to diseases. St. Petersburg: Rodnyye Prostory Publ., 2014 (in Russian)]

Тютерев С.Л. Экологически безопасные индукторы устойчивости растений к болезням и физиологическим стрессам. *Вестник защиты растений*. 2015;1(83):3-13
[Tyuterev S.L. Ecologically safe inducers of plant resistance to diseases and physiological stresses. *Vestnik Zashchity Rasteniy = Plant Protection News*. 2015;1(83):3-13 (in Russian)]

Abd El-Kareem F., Haggag W. Chitosan and citral alone or in combination for controlling early blight disease of potato plants under field conditions. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci*. 2014;5(6):941-949

Abd El-Gawad H., Bondok A. Response of tomato plants to salicylic acid and chitosan under infection with tomato mosaic virus. *Am. Eur. J. Agric. Environ. Sci.* 2015;15(8):1520-1529. DOI 10.5829/idosi.aejaes.2015.15.8.12735

Algam S., Xie G., Li B., Yu S., Su T., Larsen J. Effects of *Paenibacillus* strains and chitosan on plant growth promotion and control of Ralstonia wilt in tomato. *J. Plant Pathol*. 2010;92(3):593-600. DOI 10.4454/JPP.V92I3.303

Amini J. Induced resistance in potato plants against verticillium wilt invoked by chitosan and Acibenzolar-S-methyl. *Aust. J. Crop Sci*. 2015;9(6):570-576

Appert C., Logemann E., Hahlbrock K., Schmid J., Amrhein N. Structural and catalytic properties of the four phenylalanine ammonia-lyase isoenzymes from parsley (*Petroselinum crispum* Nym.). *Eur. J. Biochem*. 1994;225(1):491-499. DOI 10.1111/j.1432-1033.1994.00491.x

Badawy M.E., Rabea E.I. A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. *Int. J. Carbohydr. Chem*. 2011;2011:460381. DOI 10.1155/2011/460381

Badawy M.E., Rabea E.I., Taktak N.E. Antimicrobial and inhibitory enzyme activity of *N*-(benzyl) and quaternary *N*-(benzyl) chitosan derivatives on plant pathogens. *Carbohydr. Polym*. 2014;111:670-682. DOI 10.1016/j.carbpol.2014.04.098

Bautista-Baños S., Hernández-López M., Bosquez-Molina E., Wilson C. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Prot*. 2003;22(9):1087-1092. DOI 10.1016/S0261-2194(03)00117-0

Bell A.A., Hubbard J.C., Liu L., Davis R.M., Subbarao K.V. Effects of chitin and chitosan on the incidence and severity of Fusarium yellows of celery. *Plant Dis*. 1998;82(3):322-328. DOI 10.1094/PDIS.1998.82.3.322

Benhamou N., Lafontaine P., Nicole M. Induction of systemic resistance to Fusarium crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. *Phytopathology*. 1994;84(12):1432-1444. DOI 10.1094/Phyto-84-1432.

Benhamou N., Bélanger R.R., Rey P., Tirilly Y. Oligandrin, the elicitin-like protein produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum*, induces systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants. *Plant Physiol. Biochem*. 2001;39(7-8):681-696. DOI 10.1016/S0981-9428(01)01283-9

Bhaskara Reddy M., Arul J., Angers P., Couture L. Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *J. Agric. Food Chem*. 1999;47(3):1208-1216. DOI 10.1021/jf981225k

Chen J., Zou X., Liu Q., Wang F., Feng W., Wan N. Combination effect of chitosan and methyl jasmonate on controlling *Alternaria alternata* and enhancing activity of cherry tomato fruit defense mechanisms. *Crop Prot*. 2014;56:31-36. DOI 10.1016/j.cropro.2013.10.007

Chen J., Edgar K.J., Frazier C.E. Photo-curable, double-crosslinked, in situ-forming hydrogels based on oxidized hydroxypropyl cellulose. *Cellulose.* 2021;28(7):3903-3915. DOI 10.1007/s10570-021-03788-9

Chirkov S. The antiviral activity of chitosan. *Appl. Biochem. Microbiol*. 2002;38(1):1-8. DOI 10.1023/A:1013206517442

Conrath U., Domard A., Kauss H. Chitosan-elicited synthesis of callose and of coumarin derivatives in parsley cell suspension cultures. *Plant Cell Rep*. 1989;8(3):152-155. DOI 10.1007/BF00716829

Davydova V.N., Nagorskaya V.P., Gorbach V.I., Kalitnik A.A., Reunov A.V., Solov'eva T.F., Ermak I.M. Chitosan antiviral activity: dependence on structure and depolymerization method. *Appl. Biochem. Microbiol*. 2011;47(1):103-108. DOI 10.1134/S0003683811010042

De Vega D., Holden N., Hedley P.E., Morris J., Luna E., Newton A. Chitosan primes plant defence mechanisms against *Botrytis cinerea*, including expression of Avr9/Cf-9 rapidly elicited genes. *Plant Cell Environ*. 2021;44(1):290-303. DOI 10.1111/pce.13921

Dodgson J.L.A., Dodgson W. Comparison of effects of chitin and chitosan for control of *Colletotrichum* sp. on cucumbers. *J. Pure Appl. Microbiol*. 2017;11(1):87-93. DOI 10.22207/JPAM.11.1.12

Eikemo H., Stensvand A., Tronsmo A. Induced resistance as a possible means to control diseases of strawberry caused by *Phytophthora* spp. *Plant Dis*. 2003;87(4):345-350. DOI 10.1094/PDIS.2003.87.4.345

El-Sayed S., Mahdy M. Effect of chitosan on root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* on tomato plants. *Int. J. Chem. Tech. Res*. 2015; 7(4):1985-1992

Elsharkawy M.M., Omara R.I., Mostafa Y.S., Alamri S.A., Hashem M., Alrumman S.A., Ahmad A.A. Mechanism of wheat leaf rust control using chitosan nanoparticles and salicylic acid. *J. Fungi (Basel).* 2022;8(3):304. DOI 10.3390/jof8030304

Falcón-Rodríguez A.B., Végria G., Cabrera J.-C. Exploiting plant innate immunity to protect crops against biotic stress: chitosaccharides as natural and suitable candidates for this purpose. In: Bandani A.R. (Ed.). New Perspectives in Plant Protection. InTech, 2012; 139-166. DOI 10.5772/36777

Faoro F., Maffi D., Cantu D., Iriti M. Chemical-induced resistance against powdery mildew in barley: the effects of chitosan and benzothiadiazole. *BioControl*. 2008;53(2):387-401. DOI 10.1007/s10526-007-9091-3

Fei Liu X., Lin Guan Y., Zhi Yang D., Li Z., De Yao K. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *J. Appl. Polym. Sci*. 2001;79(7):1324-1335. DOI 10.1002/1097-4628(20010214)79:7<1324::AID-APP210>3.0.CO;2-L

Gaffney T., Friedrich L., Vernooij B., Negrotto D., Nye G., Uknes S., Ward E., Kessmann H., Ryals J. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*. 1993;261(5122): 754-756. DOI 10.1126/science.261.5122.754

Ghauoth A., Arul J., Grenier J., Benhamou N., Asselin A., Belanger G. Effect of chitosan on cucumber plants: suppression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defense reaction. *Phytopathology*. 1994;84(3):313-320. DOI 10.1094/PHYTO-84-313

Ghaouth A.El., Arul J., Wilson C., Benhamou N. Biochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 1997;12(2):183-194. DOI 10.1016/S0925-5214(97)00056-2

Grant J.J., Loake G.J. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol*. 2000; 124(1):21-29. DOI 10.1104/pp.124.1.21

El Hadrami A., Adam L.R., El Hadrami I., Daayf F. Chitosan in plant protection. *Mar. Drugs*. 2010;8(4):968-987. DOI 10.3390/md8040968

Hadwiger L.A. Multiple effects of chitosan on plant systems: solid science or hype. *Plant Sci*. 2013;208:42-49. DOI 10.1016/j.plantsci.2013.03.007

Hassni M., El Hadrami A., El Hadrami I., Barka E.A., Daayf F.F. Chitosan, antifungal product against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* and elicitor of defence reactions in date palm roots. *Phytopathol. Mediterr.* 2004;43(2):195-204. DOI 10.14601/Phytopathol_Mediterr-1743

Helander I.M., Nurmiaho-Lassila E.-L., Ahvenainen R., Rhoades J., Roller S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol*. 2001; 71(2-3):235-244. DOI 10.1016/s0168-1605(01)00609-2

Hirano S., Nakahira T., Nakagawa M., Kim S.K. The preparation and applications of functional fibres from crab shell chitin. *J. Biotechnol*. 1999;70(1-3):373-377. DOI 10.1016/S0168-1656(99)00090-5

Igbedioh S. Effects of agricultural pesticides on humans, animals, and higher plants in developing countries. *Arch. Environ. Health*. 1991; 46(4):218-224. DOI 10.1080/00039896.1991.9937452

Iriti M., Varoni E.M. Chitosan-induced antiviral activity and innate immunity in plants. *Environ. Sci. Pollut. Res*. 2015;22(4):2935-2944. DOI 10.1007/s11356-014-3571-7

Iriti M., Sironi M., Gomarasca S., Casazza A., Soave C., Faoro F. Cell death-mediated antiviral effect of chitosan in tobacco. *Plant Physiol. Biochem*. 2006;44(11-12):893-900. DOI 10.1016/j.plaphy.2006.10.009

Ishiguro S., Kawai-Oda A., Ueda J., Nishida I., Okada K. The *DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCIENCE1* gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2001;13(10):2191-2209. DOI 10.1105/tpc.010192

Je J.Y., Kim S.K. Chitosan derivatives killed bacteria by disrupting the outer and inner membrane. *J. Agric. Food Chem*. 2006;54(18): 6629-6633. DOI 10.1021/jf061310p

Jiang X., Lin H., Lin M., Chen Y., Wang H., Lin Y., Shi J., Lin Y. A novel chitosan formulation treatment induces disease resistance of harvested litchi fruit to *Peronophythora litchii* in association with ROS metabolism. *Food Chem*. 2018;266:299-308. DOI 10.1016/j.foodchem.2018.06.010

Karimi K., Zamani A. *Mucor indicus*: biology and industrial application perspectives: a review. *Biotechnol. Adv.* 2013;31(4):466-481. DOI 10.1016/j.biotechadv.2013.01.009

Katiyar D., Hemantaranjan A., Singh B., Bhanu A.N. A future perspective in crop protection: chitosan and its oligosaccharides. *Adv. Plants Agric. Res*. 2014;1(1):23-30. DOI 10.15406/APAR.2014.01.00006

Khalil M.S., Badawy M.E. Nematicidal activity of a biopolymer chitosan at different molecular weights against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Plant Prot. Sci*. 2012;48(4):170-178. DOI 10.17221/46/2011-PPS

Kheiri A., Moosawi Jorf S.A., Malihipour A., Saremi H., Nikkhah M. Application of chitosan and chitosan nanoparticles for the control of Fusarium head blight of wheat (*Fusarium graminearum*) in vitro and greenhouse. *Int. J. Biol. Macromol*. 2016;93(Pt. A):1261-1272. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2016.09.072

Kim K.D., Nemec S., Musson G. Control of phytophthora root and crown rot of bell pepper with composts and soil amendments in the greenhouse. *Appl. Soil Ecol*. 1997;5(2):169-179. DOI 10.1016/S0929-1393(96)00138-2

Köhle H., Jeblick W., Poten F., Blaschek W., Kauss H. Chitosan-elicited callose synthesis in soybean cells as a Ca2+-dependent process. *Plant Physiol*. 1985;77(3):544-551. DOI 10.1104/pp.77.3.544.

Kong M., Chen X.G., Xing K., Park H.J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int. J. Food Microbiol*. 2010;144(1):51-63. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012

Krivtsov G.G., Loskutova N.A., Konyukhova N.S., Khor'kov E.I., Kononenko N.V., Vanyushin B.F. Effect of chitosan elicitors on wheat plants. *Biol. Bull*. 1996;23(1):16-21

Kulikov S., Chirkov S., Il'ina A., Lopatin S., Varlamov V. Effect of the molecular weight of chitosan on its antiviral activity in plants. *Appl. Biochem. Microbiol*. 2006;42(2):200-203. DOI 10.1134/S0003683806020165

Kumaraswamy R.V., Kumari S., Choudhary R.C., Pal A., Raliya R., Biswas P., Saharan V. Engineered chitosan based nanomaterials: bioactivities, mechanisms and perspectives in plant protection and growth. *Int. J. Biol. Macromol*. 2018;113:494-506. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2018.02.130

Lee S., Choi H., Suh S., Doo I.-S., Oh K.-Y., Choi E.J., Schroeder Taylor A.T., Low P.S., Lee Y. Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiol*. 1999;121(1):147-152. DOI 10.1104/pp.121.1.147

Li B., Wang X., Chen R., Huangfu W., Xie G. Antibacterial activity of chitosan solution against *Xanthomonas* pathogenic bacteria isolated from *Euphorbia pulcherrima*. *Carbohydr. Polym*. 2008;72(2):287-292. DOI 10.3390/molecules17067028

Li B., Liu B., Shan C., Ibrahim M., Lou Y., Wang Y., Xie G., Li H.Y., Sun G. Antibacterial activity of two chitosan solutions and their effect on rice bacterial leaf blight and leaf streak. *Pest Manag. Sci*. 2013a;69(2):312-320. DOI 10.1002/ps.3399

Li B., Shi Y., Shan C., Zhou Q., Ibrahim M., Wang Y., Wu G., Li H., Xie G., Sun G. Effect of chitosan solution on the inhibition of *Acidovorax citrulli* causing bacterial fruit blotch of watermelon. *J. Sci. Food Agric*. 2013b;93(5):1010-1015. DOI 10.1002/jsfa.5812

Li H., Yu T. Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. *J. Sci. Food Agric*. 2001;81(2):269-274. DOI 10.1002/1097-0010(20010115)81:2<269::AID-JSFA806>3.0.CO;2-F

Liu J., Tian S., Meng X., Xu Y. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biol. Technol*. 2007;44(3):300-306. DOI 10.1016/j.postharvbio.2006.12.019

Lou M.-M., Zhu B., Muhammad I., Li B., Xie G.-L., Wang Y.-L., Li H.Y., Sun G.C. Antibacterial activity and mechanism of action of chitosan solutions against apricot fruit rot pathogen *Burkholderia seminalis*. *Carbohydr. Res*. 2011;346(11):1294-1301. DOI 10.1016/j.carres.2011.04.042

Ma Z., Yang L., Yan H., Kennedy J.F., Meng X. Chitosan and oligochitosan enhance the resistance of peach fruit to brown rot. *Carbohydr. Polym*. 2013;94(1):272-277. DOI 10.1016/j.carbpol.2013.01.012

Malerba M., Cerana R. Chitosan effects on plant systems. *Int. J. Mol. Sci*. 2016;17(7):996. DOI 10.3390/ijms17070996

Manjunatha G., Roopa K., Prashanth G.N., Shetty H. Chitosan enhances disease resistance in pearl millet against downy mildew caused by *Sclerospora graminicola* and defence-related enzyme activation. *Pest Manag. Sci*. 2008;64(12):1250-1257. DOI 10.1002/ps.1626

Manjunatha G., Niranjan-Raj S., Prashanth G.N., Deepak S., Amruthesh K.N., Shetty H.S. Nitric oxide is involved in chitosan-induced systemic resistance in pearl millet against downy mildew disease. *Pest Manag. Sci*. 2009;65(7):737-743. DOI 10.1002/ps.1710

Mansilla A.Y., Albertengo L., Rodríguez M.S., Debbaudt A., Zúñiga A., Casalongué C.A. Evidence on antimicrobial properties and mode of action of a chitosan obtained from crustacean exoskeletons on pseudomonas *Syringae* pv. *tomato* DC3000. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2013;97(15):6957-6966. DOI 10.1007/s00253-013-4993-8

Meng X., Yang L., Kennedy J.F., Tian S. Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. *Carbohydr. Polym*. 2010;81(1):70-75. DOI 10.1016/j.carbpol.2010.01.057

Morin-Crini N., Lichtfouse E., Torri G., Crini G. Applications of chitosan in food, pharmaceuticals, medicine, cosmetics, agriculture, textiles, pulp and paper, biotechnology, and environmental chemistry. *Environ. Chem. Lett*. 2019;17:1667-1692. DOI 10.1007/s10311-019-00904-x

Mulawarman, Hallmann J., Bell D., Kopp-Holtwiesche B., Sikora R. Effects of natural products on soil organisms and plant health enhancement. *Meded. Rijksuniv. Gent. Fak. Landbouwkd. Toegep. Biol. Wet*. 2001;66(2b):609-617

Muzzarelli R.A. Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers. *Mar. Drugs*. 2010;8(2):292-312. DOI 10.3390/md8020292

Nagorskaya V., Reunov A., Lapshina L., Davydova V., Yermak I. Effect of chitosan on tobacco mosaic virus (TMV) accumulation, hydrolase activity, and morphological abnormalities of the viral particles in leaves of *N. tabacum* L. cv. Samsun. *Virol. Sin*. 2014;29(4):250-256. DOI 10.1007/s12250-014-3452-8

Nandeeshkumar P., Sudisha J., Ramachandra K.K., Prakash H., Niranjana S., Shekar S.H. Chitosan induced resistance to downy mildew in sunflower caused by *Plasmopara halstedii*. *Physiol. Mol. Plant Pathol*. 2008;72(4-6):188-194. DOI 10.1016/j.pmpp.2008.09.001.

No H.K., Park N.Y., Lee S.H., Meyers S.P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int. J. Food Microbiol*. 2002;74(1-2):65-72. DOI 10.1016/S0168-1605(01)00717-6

Orzali L., Forni C., Riccioni L. Effect of chitosan seed treatment as elicitor of resistance to *Fusarium graminearum* in wheat. *Seed Sci. Technol*. 2014;42(2):132-149. DOI 10.15258/sst.2014.42.2.03

Orzali L., Corsi B., Forni C., Riccioni L. Chitosan in Agriculture: A New Challenge for Managing Plant Disease. In: Shalaby E.A. (Ed.). Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides. InTech, 2017;87-96. DOI 10.5772/66840

Palma-Guerrero J., Huang I.-C., Jansson H.-B., Salinas J., Lopez-Llorca L., Read N. Chitosan permeabilizes the plasma membrane and kills cells of *Neurospora crassa* in an energy dependent manner. *Fungal Genet. Biol*. 2009;46(8):585-594. DOI 10.1016/j.fgb.2009.02.010

Park K.-C., Chang T.-H. Effect of chitosan on microbial community in soils planted with cucumber under protected cultivation. *Hort. Sci. Technol*. 2012;30(3):261-269. DOI 10.7235/hort.2012.11148

Peña-Cortes H., Sanchez-Serrano J., Rocha-Sosa M., Willmitzer L. Systemic induction of proteinase-inhibitor-II gene expression in potato plants by wounding. *Planta*. 1988;174(1):84-89. DOI 10.1007/BF00394877

Photchanachai S., Singkaew J., Thamthong J. Effects of chitosan seed treatment on *Colletotrichum* sp. and seedling growth of chili cv. Jinda. In: IV International Conference on Managing Quality in Chains-The Integrated View on Fruits and Vegetables Quality. Bangkok, 2006;712:585-590. DOI 10.17660/ActaHortic.2006.712.70

Qing W., Zuo J.-H., Qian W., Yang N., Gao L.-P. Inhibitory effect of chitosan on growth of the fungal phytopathogen, *Sclerotinia sclerotiorum*, and sclerotinia rot of carrot. *J. Integr. Agric*. 2015;14(4):691-697. DOI 10.1016/S2095-3119(14)60800-5

Rabea E.I., Badawy M.E.-T., Stevens C.V., Smagghe G., Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*. 2003;4(6):1457-1465. DOI 10.1021/bm034130m

Rabea E.I., Badawy M.E., Rogge T.M., Stevens C.V., Höfte M., Steurbaut W., Smagghe G. Insecticidal and fungicidal activity of new synthesized chitosan derivatives. *Pest Manag. Sci*. 2005;61(10):951-960. DOI 10.1002/ps.1085

Rabea E.I., Steurbaut W. Chemically modified chitosans as antimicrobial agents against some plant pathogenic bacteria and fungi. *Plant Prot. Sci*. 2010;46(4):149-158. DOI 10.17221/9/2009-PPS

Ramos-García M., Bosquez-Molina E., Hernández-Romano J., Zavala-Padilla G., Terrés-Rojas E., Alia-Tejacal I., Barrera-Necha L., Hernández-López M., Bautista-Baños S. Use of chitosan-based edible coatings in combination with other natural compounds, to

control *Rhizopus stolonifer* and *Escherichia coli* DH5α in fresh tomatoes. *Crop Prot*. 2012;38:1-6. DOI 10.1016/j.cropro.2012.02.016

Reglinski T., Elmer P., Taylor J., Wood P., Hoyte S. Inhibition of *Botrytis cinerea* growth and suppression of botrytis bunch rot in grapes using chitosan. *Plant Pathol*. 2010;59(5):882-890. DOI 10.1111/j.1365-3059.2010.02312.x

Reinbothe C., Springer A., Samol I., Reinbothe S. Plant oxylipins: role of jasmonic acid during programmed cell death, defence and leaf senescence. *FEBS J*. 2009;276(17):4666-4681. DOI 10.1111/j.1742-4658.2009.07193.x

Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog. Polym. Sci*. 2006;31(7):603-632. DOI 10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001

Romanazzi G., Nigro F., Ippolito A. Short hypobaric treatments potentiate the effect of chitosan in reduction storage decay of sweet cherries. *Postharvest Biol. Technol*. 2003;29(1):73-80. DOI 10.1016/S0925-5214(02)00239-9

Rouphael Y., Colla G. Editorial: Biostimulants in Agriculture. *Front. Plant Sci*. 2020;11:40. DOI 10.3389/fpls.2020.00040

Saberi Riseh R., Skorik Y.A., Thakur V.K., Moradi Pour M., Tamanadar E., Shahidi Noghabi S. Encapsulation of plant biocontrol bacteria with alginate as a main polymer material. *Int. J. Mol. Sci*. 2021;22(20):11165. DOI 10.3390/ijms222011165

Sathiyabama M., Bernstein N., Anusuya S. Chitosan elicitation for increased curcumin production and stimulation of defence response in turmeric (*Curcuma longa* L.). *Ind. Crop. Prod*. 2016;89:87-94. DOI 10.1016/j.indcrop.2016.05.007

Sembdner G., Parthier B. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu. Rev. Plant Biol*. 1993;44(1):569-589. DOI 10.1146/annurev.pp.44.060193.003033

Sharathchandra R., Raj S.N., Shetty N., Amruthesh K., Shetty H.S. A chitosan formulation Elexa™ induces downy mildew disease resistance and growth promotion in pearl millet. *Crop Prot*. 2004;23(10):881-888. DOI 10.1016/j.cropro.2003.12.008

Singh R.P., Hodson D.P., Huerta-Espino J., Jin Y., Bhavani S., Njau P., Herrera-Foessel S., Singh P.K., Singh S., Govindan V. The emergence of Ug99 races of the stem rust fungus is a threat to world wheat production. *Annu. Rev. Phytopathol*. 2011;49:465-481. DOI 10.1146/annurev-phyto-072910-095423

Su X., Zivanovic S., D'Souza D.H. Effect of chitosan on the infectivity of murine norovirus, feline calicivirus, and bacteriophage MS2. *J. Food Prot*. 2009;72(12):2623-2628. DOI 10.4315/0362-028x-72.12.2623

Stanley-Raja V., Senthil-Nathan S., Chanthini K.M.-P., Sivanesh H., Ramasubramanian R., Karthi S., Shyam-Sundar N., Vasantha-Srinivasan P., Kalaivani K. Biological activity of chitosan inducing resistance efficiency of rice (*Oryza sativa* L.) after treatment with fungal based chitosan. *Sci. Rep*. 2021;11(1):20488. DOI 10.1038/s41598-021-99391-w

Suarez-Fernandez M., Marhuenda-Egea F.C., Lopez-Moya F.F., Arnao M.B., Cabrera-Escribano F., Nueda M.J., Gunsé B., Lopez-Llorca L.V. Chitosan induces plant hormones and defenses in tomato root exudates. *Front. Plant Sci*. 2020;11:572087. DOI 10.3389/fpls.2020.572087

Tang D., Kang R., Coyne C.B., Zeh H.J., Lotze M.T. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. Immunol. Rev. 2012;249(1):158-175. DOI 10.1111/j.1600-065X.2012.01146

Tayel A.A., Moussa S., Opwis K., Knittel D., Schollmeyer E., Nickisch-Hartfiel A. Inhibition of microbial pathogens by fungal chitosan. *Int. J. Biol. Macromol*. 2010;47(1):10-14. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2010.04.005

Teplyakova O.I., Fomenko V.V., Salakhutdinov N.F., Vlasenko N.G. Novochizol™ seed treatment: effects on germination, growth and development in soft spring wheat. *Nat. Prod. Chem. Res*. 2022;10(5):1-4. DOI 10.35248/naturalproducts.10.5.1-04

Wang Z., Zheng L., Li C., Zhang D., Xiao Y., Guan G., Zhu W. Modification of chitosan with monomethyl fumaric acid in an ionic liquid solution. *Carbohydr. Polym*. 2015;117:973-979. DOI 10.1016/j.carbpol.2014.10.021

Wiśniewska-Wrona M., Niekraszewicz A., Ciechańska D., Pospieszny H., Orlikowski L.B. Biological properties of chitosan degradation products. *Prog. Chem. Applic. Chitin Derivatives*. 2007;7:149-156

Xing K., Zhu X., Peng X., Qin S. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. *Agron. Sustain. Dev*. 2015;35(2):569-588. DOI 10.1007/s13593-014-0252-3

Yasmin S., D'Souza D. Effects of pesticides on the growth and reproduction of earthworm: a review. *Appl. Environ. Soil Sci*. 2010;2010:678360. DOI 10.1155/2010/678360

Yu J., Hu N., Hou L., Hang F., Li K., Xie C. Effect of deacetylation of chitosan on the physicochemical, antioxidant and antibacterial properties activities of chitosan-mannose derivatives. *J. Sci. Food Agric*. 2023. DOI 10.1002/jsfa.12715

Zhang X., Li K., Xing R., Liu S., Li P. Metabolite profiling of wheat seedlings induced by chitosan: revelation of the enhanced carbon and nitrogen metabolism. *Front Plant Sci*. 2017;8:2017. DOI 10.3389/fpls.2017.02017

Zheng K., Lu J., Li J., Yu Y., Zhang J., He Z., Ismail O.M., Wu J., Xie X., Li X., Xu G., Dou D., Wang X. Efficiency of chitosan application against *Phytophthora infestans* and the activation of defence mechanisms in potato. *Int. J. Biol. Macromol*. 2021;182:1670-1680. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.097

ORCID
A.B. Shcherban orcid.org/0000-0003-1000-8228

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке проекта РНФ № 23-16-00119.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.05.2023. После доработки 20.07.2023. Принята к публикации 20.07.2023.

АКТУАЛЬНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ
В ГЕНЕТИКЕ И СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ
Оригинальное исследование

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023;27(8):1022-1030
DOI 10.18699/VJGB-23-117

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

Изучение потенциала исходного селекционного материала пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в андрогенезе *in vitro*

Н.В. Петраш ✉, Т.Н. Капко, В.В. Советов

Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции – филиал Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
✉ pnv11@bionet.nsc.ru

Аннотация. Создание удвоенных гаплоидов – ценный биотехнологический подход в селекции растений, позволяющий ускоренно создавать новые сорта за счет одноэтапного получения гомозиготных линий. Целью настоящего исследования было проведение оценки показателей андрогенеза *in vitro* в культуре пыльников исходного селекционного материала сортов и комбинаций F_1 и F_2 и выявление перспективных образцов с хорошей отзывчивостью. В работе использован растительный материал, перспективный для селекционных программ Сибирского научно-исследовательского института растениеводства и селекции – филиала ИЦиГ СО РАН. Десять сортов мягкой пшеницы и гибриды F_1 и F_2 девяти комбинаций скрещивания оценивали по основным параметрам андрогенеза *in vitro*: числу новообразований, числу альбиносов и зеленых растений-регенерантов и всех регенерировавших растений. Индукцию андрогенеза *in vitro* проводили в культуре пыльников на питательной среде Chu (N6), в качестве регулятора роста использовали 1 мг/л 2.4-Д. У изучаемых образцов обнаружен различный ответ на индукцию андрогенеза *in vitro*. Отмечен максимальный выход новообразований у гибридов F_2 Новосибирская 15 × Лютесценс ШТ-335. Наибольшее количество зеленых растений-регенерантов обнаружено у F_1 Новосибирская 15 × Лютесценс ШТ-335. По результатам дисперсионного анализа установлено достоверное ($p < 0.01$) влияние генотипа на изучаемые признаки. Выявлены сорта с хорошей отзывчивостью в культуре пыльников (Новосибирская 15) и с отсутствием отзывчивости к андрогенезу *in vitro* (Новосибирская 31). Сорт Новосибирская 16 характеризовался низкой регенерационной способностью новообразований. Среди гибридов значительный гетерозисный эффект отмечен по признаку «число новообразований на 100 пыльников» в комбинациях Новосибирская 15 × Лютесценс ШТ-335, Новосибирская 15 × Лютесценс 111/09, Загора Новосибирская × Обская 2. Сорт Новосибирская 15 рекомендован к включению в скрещивания как сорт, обеспечивающий высокую отзывчивость в андрогенезе *in vitro* гибридов. Применение технологии удвоенных гаплоидов позволило быстро создать DH-линии на основе изучаемого материала.
Ключевые слова: удвоенные гаплоиды; андрогенез *in vitro*; культура пыльников; *Triticum aestivum* L.; гетерозисный эффект.

Для цитирования: Петраш Н.В., Капко Т.Н., Советов В.В. Изучение потенциала исходного селекционного материала пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в андрогенезе *in vitro*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(8): 1022-1030. DOI 10.18699/VJGB-23-117

Study of wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding material potential for *in vitro* androgenesis

N.V. Petrash ✉, T.N. Kapko, V.V. Sovetov

Siberian Research Institute of Plant Production and Breeding – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
✉ pnv11@bionet.nsc.ru

Abstract. Doubled haploid technology is a valuable biotechnological approach in plant breeding that enables one to quickly create new varieties through the single-stage production of homozygous lines. The aim of this study was to assess the indicators of *in vitro* androgenesis in the anther culture of the initial breeding material of varieties and combinations of F_1 and F_2 and to identify promising accessions with good responsiveness. For that purpose, the plant material that proved promising for the breeding programs of Siberian Research Institute of Plant Production and Breeding (SibRIPP&B) was used. Ten cultivars of common wheat and the F_1 and F_2 hybrids of nine combinations were evaluated for the main parameters of *in vitro* androgenesis such as the number of new formations, albino, green and all regenerated plants. Induction of androgenesis *in vitro* was carried out in anther culture in growth medium Chu (N6) containing 1 mg/l of growth regulator 2,4-D. The studied samples showed different responses to induction. The maximum level of new formations was found in F_2 hybrids Novosibirskaya 15 × Lutescens ShT-335. The largest number of green plants was found in F_1 Novosibirskaya 15 × Lutescens ShT-335. According to the results of variance analysis, a significant ($p < 0.01$) influence of genotype on the studied traits was established. Varieties with good responsiveness to anther culture (Novosibirskaya 15) and lack of responsiveness to *in vitro* androgenesis (Novosibirskaya 31)

© Петраш Н.В., Капко Т.Н., Советов В.В., 2023
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

were identified. Novosibirskaya 16 was characterized by a low regeneration capacity of new formations. A significant heterotic effect was revealed considering the number of new formations per 100 anthers among the hybrids of such combinations as Novosibirskaya 15 × Lutescens ShT-335, Novosibirskaya 15 × Lutescens 111/09, and Zagora Novosibirskaya × Obskaya 2. Novosibirskaya 15 was recommended for inclusion in crossings as a parental form that provides high hybrid responsiveness during *in vitro* androgenesis. The use of doubled haploid technology made it possible to quickly create DH-lines based on the breeding material.
Key words: doubled haploids; *in vitro* androgenesis; anther culture; *Triticum aestivum* L.; heterosis.

For citation: Petrash N.V., Kapko T.N., Sovetov V.V. Study of wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding material potential for *in vitro* androgenesis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(8): 1022-1030. DOI 10.18699/VJGB-23-117

Введение

Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) – важнейшая злаковая культура и основной источник растительного белка для человечества. По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединенных Наций (FAO), за период 2019–2021 гг. в мире ежегодно в среднем производится свыше 760 млн тонн пшеницы, из них в России – 78.8 млн тонн[1]. С увеличением населения Земли встает необходимость наращивания производства зерна. По прогнозам мировых рынков зерновых, на период 2021–2030 гг. производство зерна должно увеличиться до 840 млн тонн, в том числе за счет повышения урожайности пшеницы[2].

Основная задача селекции – это создание новых сортов, сочетающих высокую продуктивность, экологическую пластичность, устойчивость к болезням и другим факторам среды. Для решения этой задачи необходимо вовлечение нового селекционного материала и современных биотехнологических методов.

В процессе выведения нового сорта пшеницы наряду с традиционными методами, включающими гибридизацию, многоступенчатый отбор с последующей чередой самоопылений для достижения однородности и константности, в последнее время широко применяются различные подходы, позволяющие оптимизировать селекционный процесс. Большое распространение получил метод создания линий удвоенных гаплоидов, DH (от англ. *doubled haploids*). Это полностью гомозиготные линии, полученные при удвоении числа хромосом гаплоидного растения. Они являются уникальным генетическим материалом для ускорения процесса селекции и снижения его трудоемкости, а также для создания картирующих популяций, фенотипирования и генотипирования (Hao et al., 2013; Hale et al., 2022).

Появляется возможность получать гомозиготные линии из гибридного материала всего за одну генерацию, в свою очередь, классические методы селекции позволяют достичь этого только через пять-шесть поколений самоопыления. Таким образом, селекционеры могут выпустить новый сорт уже через пять-семь лет, что дает возможность быстро реагировать на потребности производителей.

В последние годы внимание исследователей было направлено на усовершенствование методических протоколов, что позволило DH-технологии стать быстрым и точным инструментом достижения гомозиготности исходного селекционного материала (Maluszynski et al., 2003; Wędzony et al., 2009; Seguí-Simarro et al., 2021b). Отправной точкой исследований в этой области послужило открытие индийских ученых способности культивируемых пыльников *Datura* формировать гаплоидные зародыши и проростки (Guha, Maheshvari, 1964). В настоящее время доступны протоколы получения DH-линий почти для 400 видов (Seguí-Simarro et al., 2021a). По некоторым данным, во всем мире выпущено более 300 сортов, полученных с использованием DH-технологий для 12 видов растений (Forster, Thomas, 2005).

Удвоенные гаплоиды могу быть получены *in vivo* и *in vitro* способами. Использование *in vivo* систем заключается в получении гаплоидного зародыша при партеногенезе, псевдогамии, отдаленной гибридизации с последующей элиминацией хромосом чужеродного вида опылителя или при внутривидовых скрещиваниях (опыление обработанной пыльцой, скрещивание с линиями гаплоидной индукции). Эти способы получения DH обязательно включают последующее удвоение хромосом. Методы *in vitro* основаны на развитии целых растений из клеток гаметофита, это может быть гиногенез (культивирование на питательных средах завязей и цветков) или андрогенез (культивирование пыльников и изолированных микроспор) (Forster, Thomas, 2005; Seguí-Simarro et al., 2021b).

Культура микроспор и пыльников широко используется для создания гаплоидных и DH-растений в селекционных программах пшеницы (Dunwell, 2010; Lantos et al., 2013; Seguí-Simarro et al., 2021a). Получение удвоенных гаплоидов посредством андрогенеза в культуре пыльников *in vitro* (КП) – простой и эффективный метод создания чистых линий (Уразалиев, 2015; Castillo et al., 2015; Lantos, Pauk, 2016; Колесникова и др., 2021). Суть этого процесса состоит в переключении программы развития микроспор с гаметофитного (образование пыльцевого зерна) на спорофитный путь развития, при котором формируются эмбриоподобные структуры и каллусы, дающие начало целым растениям-регенерантам (Эмбриологические основы…, 2005). Ценность таких растений значительна, поскольку они возникают из клеток после мейотического деления и, таким образом, имеют уникальные комбинации генов. Гаплоидные клетки по мере роста на питательной среде могут подвергаться дублированию своего генома, формируя спонтанные DH-растения со 100 % гомозиготностью. У гомозиготных организмов действие рецессивных генов проявляется наряду с доминантными, поэтому при работе с ними значительно сокращается время отбора нужных генотипов (Kasha, Maluszynski, 2003).

На эффективность андрогенеза в КП влияют многие факторы, такие как условия выращивания доноров, стадия развития микроспор, условия предобработок, состав

[1] Crops and livestock products. https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL
[2] OECD/FAO (2021), OECD-FAO Agricultural Outlook 2021–2030, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/19428846-en

Таблица 1. Комбинации F_1–F_2 пшеницы и их родительские сорта, оцениваемые по отзывчивости андрогенеза *in vitro* в культуре пыльников

№ п/п	Сорта	№ п/п	Комбинации, поколения F_1, F_2	Номер комбинации
1	Новосибирская 15	11	Новосибирская 15 × Лютесценс ШТ-335	№ 3
2	Новосибирская 16	12	Новосибирская 15 × Лютесценс 111/09	№ 2
3	Новосибирская 18	13	Новосибирская 16 × Лютесценс 111/09	№ 7
4	Новосибирская 31	14	Новосибирская 18 × Лютесценс 111/09	№ 9
5	Новосибирская 75	15	Новосибирская 18 × Сигма	№ 61
6	Загора Новосибирская	16	Новосибирская 75 × Лютесценс 111/09	№ 23
7	Обская 2	17	Новосибирская 31 × Лютесценс 111/09	№ 14
8	Сигма	18	Загора Новосибирская × Лютесценс 111/09	№ 26
9	Лютесценс 111/09	19	Загора Новосибирская × Обская 2	№ 24
10	Лютесценс ШТ-335			

питательной среды, однако определяющим является влияние генотипа (Tuvesson et al., 2000; Lantos, Pauk, 2020; Seguí-Simarro et al., 2021b; Hale et al., 2022). Альбинизм и значительная генотипическая зависимость ограничивают успешность получения андрогенных растений-регенерантов (Li et al., 2013; Zhao L. et al., 2015). Реакция варьирует в зависимости от генотипа как среди видов, так и внутри них. Например, среди гексаплоидных пшениц озимые формы характеризуются в андрогенезе *in vitro* лучшим ответом, чем яровые (Sharma et al., 2005; Lazaridou et al., 2016). Пшенично-ржаная транслокация 1RS.1BL положительно влияет на регенерацию растений в андрогенезе *in vitro* (Agache et al., 1989; Першина и др., 2013; Тимонова и др., 2022).

Установлено аддитивное, доминантное и эпистатические взаимодействие генов, отвечающих за наследование андрогенных признаков в КП (Chaudhary et al., 2003; Dagüstü, 2008; Grauda et al., 2016). В то же время некоторые результаты показали, что андрогенный ответ в КП следует простой схеме наследования и контролируется доминантными генами (El-Hennawy et al., 2011). В работе (Abd El-Fatah et al., 2020) показано, что аддитивные эффекты были более важными, чем эффекты доминирования в генетическом контроле признаков андрогенеза *in vitro*.

Одна из стратегий преодоления генотипической зависимости заключается в использовании в скрещиваниях отзывчивого в андрогенезе *in vitro* селекционного материала, т. е. один из родителей, участвующих в скрещивании, должен индуцировать развитие зеленых регенерантов у гибридов (Tuvesson et al., 2003; Kondic-Špika et al., 2011; Lantos, Pauk, 2020). Поэтому целесообразны проведение оценки исходных селекционных образцов и вовлечение в скрещивания наиболее подходящих, с хорошей отзывчивостью к андрогенезу *in vitro*.

Настоящее исследование проведено с целью оценки показателей андрогенеза *in vitro* в культуре пыльников исходного селекционного материала сортов и комбинаций F_1 и F_2 яровой мягкой пшеницы и выявления перспективных образцов с хорошей отзывчивостью.

Материалы и методы

В качестве материала использовали перспективные для селекционной программы Сибирского научно-исследовательского института растениеводства и селекции (СибНИИРС) – филиала ИЦиГ СО РАН образцы яровой мягкой пшеницы. Девять комбинаций F_1 и F_2 и десять родительских сортов были отобраны для оценки эффективности в андрогенезе *in vitro* (табл. 1).

Растения-доноры пыльников выращивали на опытном поле СибНИИРС в 2022 г. Сбор колосьев проводили с главных побегов, когда микроспоры в пыльниках находились в средней или поздней одноядерной стадии. Визуально это соответствует расположению середины колоса на уровне влагалища второго сверху листа. Оценку стадии развития микроспор осуществляли под микроскопом Leica CME, Leica Microsistems (Россия) на давленых цитологических препаратах, окрашенных ацетокармином.

Собранные в поле колосья помещали в термический контейнер с хладагентами, транспортировали в лабораторию, помещали в сосуды с дистиллированной водой и выдерживали в хладотермостате ТВЛ-К при температуре +4 °C в течение семи дней. После предобработки холодом колосья, находящиеся в колосовой трубке, поверхностно стерилизовали салфетками, смоченными поочередно в 70 и 96 % спирте, и переносили в стерильные условия бокса микробиологической безопасности. Пыльники выделяли из боковых цветков средней части каждого колоса, в среднем около 50 пыльников с каждого колоса. Минимум 100 пыльников в трехкратном повторении выделяли для каждого образца. Одна чашка Петри считалась одним повторением.

Пыльники с двух колосьев одного генотипа инокулировали в 100 мм Ø чашки Петри, содержащие 15–20 мл индукционной среды N6 (Chu, 1978) с добавлением 90 г/л сахаров (сахароза: мальтоза – 2:1); мио-инозитол – 100 мг/л; 2.4-Д – 1 мг/л, кинетин – 0.5 мг/л и растительный агар – 6 г/л. Чашки Петри с пыльниками инкубировали в темноте при температуре 28 °C до появления первых новообразований, затем продолжали инкубировать

при температуре 25 °C для дальнейшего роста структур. После 30–40 дней инкубации новообразования, достигшие в диаметре 1.5–2 мм, переносили по 3–5 структур в Ø 28 мм пробирки с регенерационной средой Гамборга, B5 (Gamborg, Eveleigh, 1968), без фитогормонов с добавлением сахарозы – 30 г/л и растительного агара – 5 г/л. Регенерация проростков происходила под светодиодными лампами с плотностью фотосинтетического потока фотонов (PPFD) 751.6 мкмоль/м^2/с при 16-часовом световом периоде и температуре 18–20 °C в течение 20–30 дней.

Зеленые проростки с хорошо развитыми корнями и листьями вынимали из пробирок, тщательно отмывали корни от остатков питательной среды и пересаживали в отдельные горшочки (0.8 л) со смесью кокосового субстрата, универсального грунта и вермикулита в пропорции 3:1:1. Укоренившиеся растения выращивали под теми же светодиодными лампами при температуре 19–21 °C и влажности около 50–60 %. Растения выращивали до полной спелости. Отбирали только фертильные растения (спонтанно удвоенные гаплоиды), частично фертильные или стерильные растения выбраковывали.

Для оценки эффективности культуры пыльников проводили учет по показателям: число новообразований (эмбриоподобных структур и каллусов) на 100 выделенных пыльников (Ч Н/100П); число альбиносов на 100 выделенных пыльников (Ч А/100П); число зеленых регенерантов на 100 выделенных пыльников (Ч ЗР/100П); число всех регенерантов на 100 новообразований (Ч ВР/100Н).

Статистическую обработку данных выполняли средствами программного пакета Microsoft Excel 2010. Дисперсионный анализ проводили с использованием пакета прикладных программ SNEDECOR (Сорокин, 2004). Гетерозис истинный ($\Gamma_{ист}$, %) и гипотетический ($\Gamma_{гип}$, %) определяли по Д.С. Омарову (1975), согласно формулам (1) и (2):

$$\Gamma_{ист} = F_1 - P_{луч}/P_{луч} \times 100\ \%, \quad (1)$$

$$\Gamma_{гип} = F_1 - P_{ср}/P_{ср} \times 100\ \%, \quad (2)$$

где F_1 – изучаемый показатель у гибрида; $P_{луч}$ – этот же показатель у лучшего родителя; $P_{ср}$ – средний показатель между родительскими формами (P1 + P2)/2.

Степень фенотипического доминирования (показатель наследования признаков) в контролируемых скрещиваниях определяли по методу Гриффинга (Griffing, 1956). Степень доминирования (Hp) определяли по формуле (3):

$$Hp = F_1 - MF/HF - MF, \quad (3)$$

где Hp – показатель наследования; F_1 – среднее значение признака в гибридной семье; MF – среднее значение признака между обоими родителями; HF – значение признака у лучшего родителя. При условии: Hp > 1 классифицировали положительный гетерозис; Hp = 0.5–1.0 – положительное доминирование; при Hp в диапазоне от +0.5 до –0.5 – промежуточное наследование; при Hp = –0.5 до –1.0 – отрицательное доминирование; при Hp < –1.0 – отрицательный гетерозис.

Инбридинговую депрессию (ID %) определяли согласно D.G. Pederson (1971) по формуле (4):

$$ID = (F_2 - F_1/F_1) \times 100\ \%, \quad (4)$$

где ID – инбридинговая депрессия; F_1 – среднее значение признака в гибридной семье первого поколения; F_2 – среднее значение признака в гибридной популяции второго поколения.

Результаты и обсуждение

Успешность применения DH-технологии в селекционных программах зависит от способности генотипов к регенерации зеленых растений в андрогенезе *in vitro*.

В настоящей работе осуществлена оценка способности к андрогенезу *in vitro* 10 сортов и 9 комбинаций поколений F_1 и F_2. Всего в опыте выделено и помещено на индукционную среду 16598 пыльников: не менее 100 пыльников для каждого образца в трехкратной повторности. В однофакторном дисперсионном анализе показано достоверное влияние генотипа на все изучаемые параметры андрогенеза *in vitro* (табл. 2).

Оцениваемые образцы проявляли различную реакцию в андрогенезе *in vitro* (табл. 3). Признак «число новообразований к 100 выделенным пыльникам» (Н/100П) показывает количество структур (эмбриоподобные структуры и каллусы), сформированных из микроспор. Этот признак варьировал в пределах от 0 до 17.20 (Новосибирская 15 × Лютесценс ШТ-335, F_2) при среднем значении 3.74. Число зеленых растений на 100 пыльников (ЗР/100П) в среднем достигло 1.45. Максимальным значением характеризовались гибриды F_1 Новосибирская 15 × Лютесценс ШТ-335 и Новосибирская 15 × Лютесценс 111/09, – 12.15 и 12.50 соответственно. Число альбиносов к 100 пыльникам (А/100П) в среднем составило 0.63. Наибольшие значения были у сорта Новосибирская 15 (2.67), F_2 Новосибирская 15 × Лютесценс ШТ-335 (2.40) и F_1 Загора Новосибирская × Обская 2 (2.92). Среднее значение по признаку всего регенерантов на 100 пыльников было 2.08. В целом лучше регенерировали образцы F_1 Новосибирская 15 × Лютесценс ШТ-335 и Новосибирская 15 × Лютесценс 111/09 с преобладанием

Таблица 2. Однофакторный дисперсионный анализ признаков андрогенетического ответа в культуре пыльников *in vitro* сортов и гибридов F_1–F_2 пшеницы

Источник варьирования	*df*	Число Н/100П		Число ЗР/100П		Число А/100П	
		Доля влияния, %	$F_{факт}$	Доля влияния, %	$F_{факт}$	Доля влияния, %	$F_{факт}$
Фактор «генотип»	27	73.44	9.30*	78.57	12.00*	51.82	4.23*
Случайные факторы	56	26.56	–	21.43	–	48.18	–

* $p < 0.01$ ($F_{табл.\ 0,99} = 2.18$); *df* – число степеней свободы; $F_{факт}$ – расчетное значение критерия Фишера; Н/100П – новообразования на 100 пыльников; ЗР/100П – зеленые растения на 100 пыльников; А/100П – альбиносы на 100 пыльников.

Таблица 3. Показатели андрогенной способности в культуре пыльников *in vitro* сортов и гибридов F_1–F_2 пшеницы

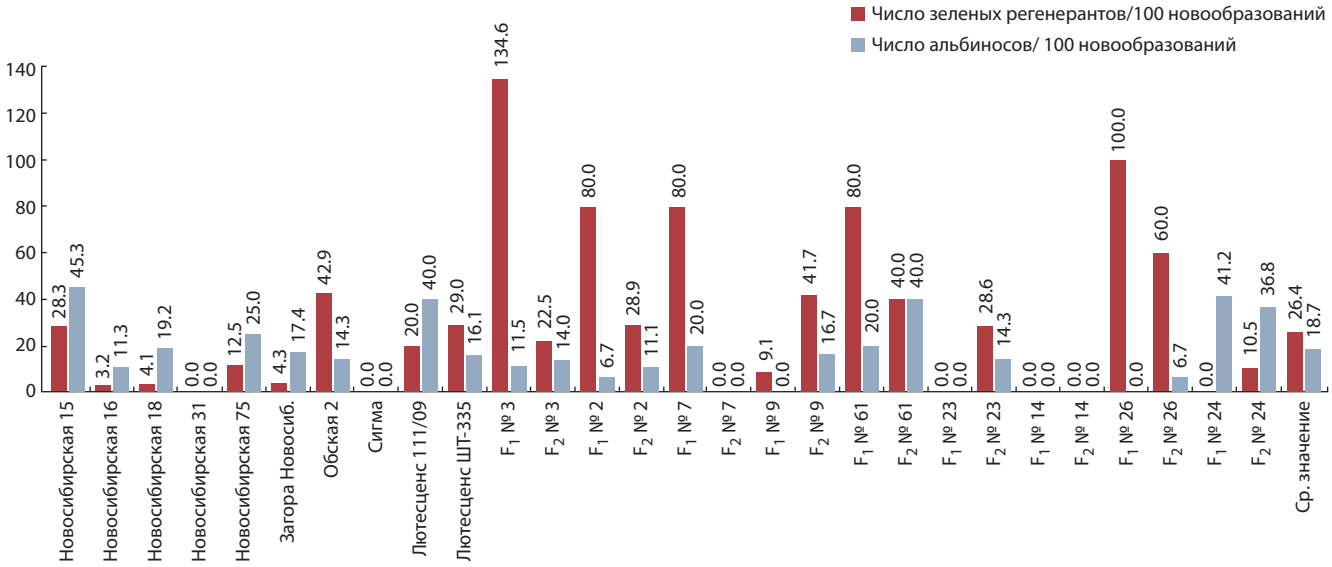
Генотип	Число Н/100П	Число ЗР/100П	Число А/100П	Число ВР/100П
Новосибирская 15	$5.89^2 \pm 1.26$	1.67 ± 0.33	$2.67^1 \pm 0.33$	$4.33^1 \pm 0.58$
Новосибирская 16	$12.40^1 \pm 2.67$	0.40 ± 0.40	$1.40^1 \pm 0.36$	1.80 ± 0.73
Новосибирская 18	5.21 ± 0.70	0.21 ± 0.22	1.00 ± 0.55	1.21 ± 0.70
Новосибирская 31	0.00	0.00	0.00	0.00
Новосибирская 75	2.13 ± 0.46	0.27 ± 0.46	0.53 ± 0.32	0.80 ± 0.78
Загора Новосибирская	2.71 ± 0.66	0.12 ± 0.21	0.47 ± 0.41	0.59 ± 0.21
Обская 2	0.47 ± 0.31	0.20 ± 0.35	0.07 ± 0.12	0.27 ± 0.46
Сигма	0.40 ± 0.29	0.00	0.00	0.00
Лютесценс 111/09	1.43 ± 0.73	0.29 ± 0.08	0.57 ± 0.31	0.86 ± 0.37
Лютесценс ШТ-335	2.58 ± 0.25	0.75 ± 0.25	0.42 ± 0.52	1.17 ± 0.52
F_1 (Новосиб. 15 × Лют. ШТ-335)	$9.03^1 \pm 1.35$	$12.15^1 \pm 4.51$	$1.04^2 \pm 0.00$	$13.19^1 \pm 4.51$
F_2 (Новосиб. 15 × Лют. ШТ-335)	$17.20^1 \pm 2.95$	$3.87^1 \pm 0.61$	$2.40^1 \pm 1.06$	$6.27^1 \pm 1.40$
F_1 (Новосиб. 15 × Лют. 111/09)	$15.63^1 \pm 2.76$	$12.50^1 \pm 2.08$	$1.04^2 \pm 0.00$	$13.54^1 \pm 2.08$
F_2 (Новосиб. 15 × Лют. 111/09)	4.50 ± 0.81	1.30 ± 0.63	0.50 ± 0.17	1.80 ± 0.61
F_1 (Новосиб. 16 × Лют. 111/09)	1.74 ± 1.54	1.39 ± 0.68	0.35 ± 0.60	1.74 ± 1.28
F_2 (Новосиб. 16 × Лют. 111/09)	0.40 ± 0.23	0.00	0.00	0.00
F_1 (Новосиб. 18 × Лют. 111/09)	3.27 ± 1.68	0.30 ± 0.26	0.00	0.30 ± 0.26
F_2 (Новосиб. 18 × Лют. 111/09)	1.33 ± 1.04	0.56 ± 0.39	0.22 ± 0.20	0.78 ± 0.49
F_1 (Новосиб. 18 × Сигма)	1.74 ± 0.31	1.39 ± 0.68	0.35 ± 0.30	1.74 ± 0.88
F_2 (Новосиб. 18 × Сигма)	1.00 ± 0.2	0.40 ± 0.36	0.40 ± 0.40	0.80 ± 0.70
F_1 (Новосиб. 75 × Лют. 111/09)	0.69 ± 0.60	0.00	0.00	0.00
F_2 (Новосиб. 75 × Лют. 111/09)	1.17 ± 0.38	0.33 ± 0.29	0.17 ± 0.29	0.50 ± 0.00
F_1 (Новосиб. 31 × Лют. 111/09)	0.00	0.00	0.00	0.00
F_2 (Новосиб. 31 × Лют. 111/09)	0.00	0.00	0.00	0.00
F_1 (Загора Новосиб. × Лют. 111/09)	0.35 ± 0.34	0.35 ± 0.34	0.00	0.35 ± 0.34
F_2 (Загора Новосиб. × Лют. 111/09)	3.00 ± 1.05	1.80 ± 0.35	0.20 ± 0.35	2.00 ± 0.35
F_1 (Загора Новосиб. × Обская 2)	$7.08^1 \pm 3.94$	0.00	$2.92^1 \pm 1.13$	2.92 ± 1.13
F_2 (Загора Новосиб. × Обская 2)	3.80 ± 1.28	0.40	$1.40^1 \pm 1.08$	1.80 ± 1.24
Среднее значение	3.74	1.45	0.63	2.08
$НСР_{0.05}$	2.50	1.72	0.42	1.88
$НСР_{0.10}$	2.11	1.45	0.36	1.58

Примечание. Н – новообразования; ЗР – зеленые растения; А – альбиносы; П – пыльники; ВР – всего регенерантов; Новосиб. – Новосибирская; Лют. – Лютесценс.
[1] Отличия от среднего значения достоверны при $p = 0.05$; [2] отличия от среднего значения достоверны при $p = 0.10$.

зеленых регенерантов. Всего в опыте получено 150 зеленых растений-регенерантов.

Среди сортов обнаружено, что высокая продукция новообразований еще не гарантирует большой выход регенерантов. Так, превышали среднее значение по числу новообразований сорта Новосибирская 15 ($p < 0.10$) и Новосибирская 16 ($p < 0.05$), а регенерировал лучше сорт Новосибирская 15 (число ВР/100П = 4.33, $p < 0.05$). У сорта Новосибирская 16 сформировалось 12.40 новообразований на 100 пыльников, из которых регенерировало 1.80 проростков на 100 пыльников) (см. табл. 3). Этот факт подтверждает литературные данные о том, что признаки андрогенеза *in vitro* контролируются полигенно и являются независимо наследуемыми (Ekiz, Konzak, 1994; Nielsen et al., 2015; Abd El-Fatah et al., 2020). Сорт Новосибирская 31 не формировал новообразований, примечательно, что в комбинации с этим генотипом в первом и втором поколениях также не формировалось структур. Таким образом, можно предположить, что мы обнаружили неотзывчивый генотип и это станет материалом для дальнейших исследований.

Способность новообразований регенерировать в проростки отражают признаки «число зеленых растений на 100 новообразований» и «число альбиносов на 100 но-



Доля регенерации зеленых и альбиносных растений на 100 новообразований в андрогенезе *in vitro* сортов и гибридов поколений F_1–F_2 пшеницы.

№ 3 (Новосибирская 15 × Лютесценс ШТ-335), № 2 (Новосибирская 15 × Лютесценс 111/09), № 7 (Новосибирская 16 × Лютесценс 111/09), № 9 (Новосибирская 18 × Лютесценс 111/09), № 61 (Новосибирская 18 × Сигма), № 23 (Новосибирская 75 × Лютесценс 111/09), № 14 (Новосибирская 31 × Лютесценс 111/09), № 26 (Загора Новосибирская × Лютесценс 111/09), № 24 (Загора Новосибирская × Обская 2); $НСР_{0.05}$ (число ЗР/100Н) = 19.51; $НСР_{0.05}$ (число А/100Н) = 7.81.

вообразований» (см. рисунок). В среднем по опыту из 100 новообразований регенерировало больше зеленых растений, чем альбиносов, 26.41 и 18.74 соответственно. Лучшая регенерирующая способность, когда более половины новообразований формировали растения, отмечена у гибридов F_1 № 3 (Новосибирская 15 × Лютесценс ШТ-335), № 2 (Новосибирская 15 × Лютесценс 111/09), № 7 (Новосибирская 16 × Лютесценс 111/09), № 61 (Новосибирская 18 × Сигма), № 26 (Загора Новосибирская × Лютесценс 111/09) и F_2 № 26 (Загора Новосибирская × Лютесценс 111/09) (см. рисунок). Отмечено, что у гибрида F_1 № 3 (Новосибирская 15 × Лютесценс ШТ-335) признак «число зеленых растений на 100 новообразований» составил более 100. Это можно объяснить явлением вторичного эмбриогенеза или способностью эмбриоподобных структур развиваться в полиэмбриоиды. Результат того и другого – формирование клоновых или сестринских растений. Полиэмбриоиды представляют собой структуры с несколькими очагами роста побегов (Сельдимирова, 2009; Pershina et al., 2020).

Явление альбинизма – ограничивающий фактор в получении DH-линий в андрогенезе *in vitro*. В нашем опыте доля зеленых растений в общем числе проростков преобладала у образцов Обская 2, Лютесценс ШТ-335; у гибридов F_1 Новосибирская 15 × Лютесценс ШТ-335, Новосибирская 15 × Лютесценс 111/09, Новосибирская 16 × Лютесценс 111/09, Новосибирская 18 × Сигма, Загора Новосибирская × Лютесценс 111/09 и F_2 Новосибирская 18 × Лютесценс 111/09, Новосибирская 75 × Лютесценс 111/09, Загора Новосибирская × Лютесценс 111/09 (см. рисунок).

Из результатов дисперсионного анализа следует, что альбинизм обусловливается генотипом примерно на 50 % (см. табл. 2). Известно несколько причин, которые могут способствовать проявлению альбинизма: это генотип, условия выращивания растений-доноров, условия культивирования, состав сред, несовместимость ядерных и пластидных геномов, делеции или мутации в пластидной ДНК (Nielsen et al., 2015; Zhao P. et al., 2017). В литературных данных показана высокая достоверность влияния генотипа на число альбиносных растений-регенерантов (Lantos, Pauk, 2016; Castillo et al., 2019; Abd El-Fatah et al., 2020; Kanbar et al., 2020).

Генотипическая зависимость в феномене альбинизма связана с активацией транскрипции специфических генов, участвующих в начальных этапах биогенеза хлоропластов (Мозгова и др., 2006; Canonge et al., 2021). У альбиносных растений обнаружены делеции в хлоропластной ДНК, одновременно была ингибирована транскрипция ядерных генов, кодирующих локализованные в хлоропластах белки, в то время как уровень транскриптов ядерных генов, кодирующих белок, не входящий в состав хлоропластов, был идентичен уровню в зеленых растениях (Dunford, Walden, 1991).

Чтобы оценить перспективность использования изучаемых сортов в дальнейших скрещиваниях, была проведена оценка гетерозисного эффекта их гибридов. Гетерозисный эффект отзывчивости в андрогенезе *in vitro* описан ранее, и его степень варьирует от генотипа к генотипу (Ouyang et al., 1973; Ekiz, Konzak, 1994).

Гетерозис истинный ($Г_{ист}$), гипотетический ($Г_{гип}$), показатель наследуемости (Hp) и инбридинговую депрессию (ID %) рассчитывали для признака «число новообразований на 100 пыльников», поскольку, согласно результатам дисперсионного анализа, этот признак в значительной степени обусловлен генотипом, доля влияния фактора генотип составила 73.44 % (см. табл. 2) и напрямую влияет на последующие показатели отзывчивости в андрогенезе *in vitro*. Максимальный гипотетический гетерозис опре-

Таблица 4. Гетерозисный эффект и показатель наследования признака «число новообразований/100 пыльников» девяти комбинаций мягкой пшеницы

Комбинация	Показатель			
	$Г_{гип}$, %	$Г_{ист}$, %	Hp	ID %
Новосибирская 15 × Лютесценс ШТ-335	113.22	53.31	2.90[1]	90.48
Новосибирская 15 × Лютесценс 111/09	327.05	165.37	5.37[1]	–71.21
Новосибирская 16 × Лютесценс 111/09	–74.84	–85.97	–0.94[3]	–77.01
Новосибирская 18 × Лютесценс 111/09	–1.51	–37.24	–0.03[2]	–59.33
Новосибирская 18 × Сигма	–37.97	–66.60	–0.44[2]	–42.53
Новосибирская 75 × Лютесценс 111/09	–61.24	–67.61	–3.11[4]	69.57
Новосибирская 31 × Лютесценс 111/09	–100	–100	–*	–*
Загора Новосибирская × Лютесценс 111/09	–83.09	–87.08	–2.69[4]	757.14
Загора Новосибирская × Обская 2	345.28	161.25	4.90[1]	–46.33

Примечание. $Г_{гип}$, % – гетерозис гипотетический; $Г_{ист}$, % – гетерозис истинный; ID % – инбридинговая депрессия; Hp – степень доминирования; [1] положительный гетерозис; [2] промежуточное наследование; [3] отрицательное доминирование; [4] отрицательный гетерозис; * Показатель не рассчитывался, так как не было получено новообразований.

делен для комбинации Загора Новосибирская × Обская 2, минимальный – для комбинации Новосибирская 31 × Лютесценс 111/09 (табл. 4). Истинный гетерозис характеризует более сильное проявление признака в F_1 по сравнению с лучшей родительской формой.

Наибольший истинный гетерозис отмечен в комбинации Новосибирская 15 × Лютесценс 111/09; 100 % отрицательный гетерозис был у гибридов с сортом Новосибирская 31, у которых не наблюдалось отзывчивости к андрогенезу, также значительный отрицательный $Г_{ист}$ отмечен в комбинациях Новосибирская 16 × Лютесценс 111/09 и Загора Новосибирская × Лютесценс 111/09.

Анализ показателя наследуемости выявил положительный гетерозис для комбинаций Новосибирская 15 × Лютесценс ШТ-335, Новосибирская 15 × Лютесценс 111/09, Загора Новосибирская × Обская 2. Промежуточное наследование определено для комбинаций с сортом Новосибирская 18. В комбинации Новосибирская 16 × Лютесценс 111/09 обнаружено отрицательное доминирование, а в комбинациях Новосибирская 75 × Лютесценс 111/09 и Загора Новосибирская × Лютесценс 111/09 – отрицательный гетерозис.

Среди гибридов F_1 и F_2 наблюдается разная степень проявления признаков андрогенеза *in vitro*. По числу новообразований на 100 пыльников первое поколение превосходило второе в комбинациях Новосибирская 15 × Лютесценс 111/09, Новосибирская 16 × Лютесценс 111/09, Новосибирская 18 × Лютесценс 111/09, Новосибирская 18 × Сигма, Загора Новосибирская × Обская 2. Инбридинговая депрессия отмечена в комбинациях Новосибирская 15 × Лютесценс ШТ-335, Новосибирская 75 × Лютесценс 111/09, Загора Новосибирская × Лютесценс 111/09 (см. табл. 4). Отрицательный показатель ID % говорит о превосходстве проявления признака у гибридов F_1 над F_2.

Подводя итог проведенного анализа наследования способности микроспор формировать новообразования для различных комбинаций, следует обратить внимание на положительные показатели для комбинаций с сортом Новосибирская 15. Эти результаты согласуются с ранее полученными данными по изучению отзывчивости гибридов F_1 и F_2 Обская 2 × Новосибирская 15 в сравнении с родительскими сортами (Петраш и др., 2022). Изучение характера наследования на многих комбинациях позволяет оценивать формирование положительного ответа в андрогенезе *in vitro* гибридов и в дальнейшем осуществлять эффективный подбор пар при скрещиваниях в рамках селекционных программ с использованием метода удвоенных гаплоидов.

Заключение

Это исследование проведено для изучения потенциала исходного селекционного материала в андрогенезе *in vitro* на 10 различных сортах мягкой пшеницы и 9 комбинациях F_1 и F_2. Всего в опыте анализировали 28 генотипов. Оценивали такие показатели андрогенеза, как число новообразований (эмбриоподобные структуры и каллусы), число зеленых регенерантов, число альбиносов и число всех регенерировавших растений.

Выявлены сорта с отзывчивостью в культуре пыльников (Новосибирская 15) и с отсутствием отзывчивости к андрогенезу *in vitro* (Новосибирская 31). Сорт Новосибирская 16 характеризуется низкой регенерационной способностью новообразований. Среди гибридов значительный гетерозисный эффект отмечен в комбинациях Новосибирская 15 × Лютесценс ШТ-335, Новосибирская 15 × Лютесценс 111/09, Загора Новосибирская × Обская 2. Положительный гетерозис признака «число новообразований на 100 пыльников» выявлен в комбинациях сортов Новосибирская 15, промежуточное наследование – в комбинациях сорта Новосибирская 18. Сорт Новосибирская 15 рекомендован к включению в скрещивания как сорт, обеспечивающий высокую отзывчивость в андрогенезе

in vitro гибридов, по сравнению со вторым родительским сортом. Благодаря использованию технологии удвоенных гаплоидов на данном гибридном материале созданы DH-линии, которые в настоящее время проходят оценку в полевых условиях.

Список литературы / References

Колесникова Е.О., Донских Е.И., Бердников Р.В. Биотехнологии гаплоидов как инструмент создания селекционного материала сахарной свеклы. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2021;25(8):812-821. DOI 10.18699/VJ21.094
[Kolesnikova E.O., Donskikh E.I., Berdnikov R.V. Haploid biotechnology as a tool for creating a selection material for sugar beets. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(8):812-821. DOI 10.18699/VJ21.094 (in Russian)]

Мозгова Г.В., Орлов П.А., Шалыго Н.В. Анализ изменчивости эволюционно нестабильных областей хлоропластного генома у растений, полученных в культуре пыльников дигаплоидных линий пшеницы. *Генетика*. 2006;42(2):192-197
[Mozgova G.V., Orlov P.A., Shalygo N.V. Variation in evolutionary unstable regions of the chloroplast genome in plants obtained in the anther culture of dihaploid wheat lines. *Genetika = Genetics*. 2006;42(2):192-197 (in Russian)]

Омаров Д.С. К методике учета и оценки гетерозиса у растений. *С.-х. биология*. 1975;10(1):123-127
[Omarov D.S. On the methodology of recording and assessing heterosis in plants. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology.* 1975;10(1):123-127 (in Russian)]

Першина Л.А., Осадчая Т.С., Бадаева Е.Д., Белан И.А., Россеева Л.П. Изучение особенностей андрогенеза в культуре пыльников сортов и перспективной формы яровой мягкой пшеницы западносибирской селекции, различающихся наличием или отсутствием пшенично-чужеродной транслокации. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(1):40-49
[Pershina L.A., Osadchaya T.S., Badaeva E.D., Belan I.A., Rosseeva L.P. Features of androgenesis in anther cultures of varieties and a promising accession of spring common wheat bred in West Siberia differing in the presence or absence of wheat-alien translocations. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17(1):40-49 (in Russian)]

Петраш Н.В., Орлова Е.А., Лихенко И.Е., Пискарев В.В. Изучение эффективности культуры пыльников *in vitro* сортов и гибридов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). *Зерновое хоз-во России*. 2022;14(6):17-22. DOI 10.31367/2079-8725-2022-83-6-17-22
[Petrash N.V., Orlova E.A., Likhenko I.E., Piskarev V.V. The study of the efficiency of anther culture *in vitro* of bread wheat varieties and hybrids (*Triticum aestivum* L.). *Zernovoe Khozjaistvo Rossii = Grain Economy of Russia.* 2022;14(6):17-22. DOI 10.31367/2079-8725-2022-83-6-17-22 (in Russian)]

Сельдимирова О.А. Формирование полиэмбриоидов в культуре *in vitro* пыльников пшеницы. *Физиология и биохимия культ. растений*. 2009;41(6):531-538
[Seldimirova O.A. Formation of polyembryoids in *in vitro* culture of wheat anthers. *Fiziologiya i Biokhimiya Kulturnykh Rastenii = Physiology and Biochemistry of Cultivated Plants*. 2009;41(6):531-538 (in Russian)]

Сорокин О.Д. Прикладная статистика на компьютере. Новосибирск, 2004
[Sorokin O.D. Applied Statistics on the Computer. Novosibirsk, 2004 (in Russian)]

Тимонова Е.М., Адонина И.Г., Салина Е.А. Изучение влияния чужеродных транслокаций на показатели андрогенеза *in vitro* у линий мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 2022;183(1):127-134. DOI 10.30901/2227-8834-2022-1-127-134
[Timonova E.M., Adonina I.G., Salina E.A. The influence of combinations of alien translocations on *in vitro* androgenesis in spring common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2022;183(1):127-134. DOI 10.30901/2227-8834-2022-1-127-134 (in Russian)]

Уразалиев К.Р. Гаплоидные технологии в селекции растений. *Биотехнология. Теория и практика*. 2015;3:33-44. DOI 10.11134/btp.3.2015.4
[Urazaliyev K.R. Doubled haploids technology in plants. *Biotekhnologiya. Teoriya i Praktika = Biotechnology. Theory and Practice*. 2015;3:33-44. DOI 10.11134/btp.3.2015.4 (in Russian)]

Эмбриологические основы андроклинии пшеницы. Атлас. М.: Наука, 2005
[Embryological Foundations of the Wheat Androclinium: Atlas. Moscow: Nauka Publ., 2005 (in Russian)]

Abd El-Fatah B.E.S., Sayed M.A., El-Sanusy S.A. Genetic analysis of anther culture response and identification of QTLs associated with response traits in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol. Biol. Rep*. 2020;47(12):9289-9300. DOI 10.1007/s11033-020-06007-z

Agache S., Bachelier B., de Buyser J., Henry Y., Snape J. Genetic analysis of anther culture response in wheat using aneuploid, chromosome substitution and translocation lines. *Theor. Appl. Genet*. 1989; 77(1):7-11. DOI 10.1007/bf00292308

Canonge J., Roby C., Hamon C., Potin P., Pfannschmidt T., Philippot M. Occurrence of albinism during wheat androgenesis is correlated with repression of the key genes required for proper chloroplast biogenesis. *Planta*. 2021;254(6):123. DOI 10.1007/s00425-021-03773-3

Castillo A.M., Sánchez-Díaz R.A., Vallés M.P. Effect of ovary induction on bread wheat anther culture: ovary genotype and developmental stage, and candidate gene association. *Front. Plant Sci.* 2015;6: 402. DOI 10.3389/fpls.2015.00402

Castillo A.M., Allue S., Costar A., Alvaro F., Valles M.P. Doubled haploid production from Spanish and Central European spelt by anther culture. *J. Agric. Sci. Technol*. 2019;21(5):1313-1324

Chaudhary H.K., Dhaliwal I., Singh S., Sethi G.S. Genetics of androgenesis in winter and spring wheat genotypes. *Euphytica*. 2003;132: 311-319. DOI 10.1023/A:1025094606482

Chu C.-C. The N_6-medium and its application to anther culture of cereal crops. In: Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture (25–30 May 1978). Peking: Science Press, 1978:43-50

Dagüstü N. Diallel analysis of anther culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Afr. J. Biotechnol.* 2008;7(19):3419-3423

Dunford R., Walden R.M. Plastid genome structure and plastid-related levels in albino barley plants derived from anther culture. *Curr. Genet*. 1991;20(4):339-347. DOI 10.1007/BF00318524

Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploration. *Plant Biotechnol. J.* 2010;8(4):377-424. DOI 10.1111/j.1467-7652.2009.00498

Ekiz H., Konzak C.F. Preliminary diallel analysis of anther culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Breed*. 1994;113(1): 47-52. DOI 10.1111/j.1439-0523.1994.tb00700.x

El-Hennawy M.A., Abdalla A.F., Shafey S.A., Al-Ashkar I.M. Production of doubled haploid wheat lines (*Triticum aestivum* L.) using anther culture technique. *Ann. Agric. Sci*. 2011;56(2):63-72. DOI 10.1016/j.aoas.2011.05.008

Forster B.P., Thomas W.T. Doubled haploids in genetics and plant breeding. In: Janick J. (Ed.). Plant Breeding Reviews. Vol. 25. John Wiley & Sons, 2005;57-88. DOI 10.1002/9780470650301.ch3

Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley. *Can. J. Biochem*. 1968;46(5):417-421. DOI 10.1139/o68-063

Grauda D., Žagata K., Lanka G., Strazdina V., Fetere V., Lisina N., Krasnevska N., Fokina O., Mikelsone A., Ornicans R., Belogrudova I., Rashal I. Genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants-regenerants produced by anther culture. *Vavilovskii Zhurnal*

Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(4):537-544. DOI 10.18699/VJ16.176

Griffing B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Aust. J. Biol. Sci*. 1956;9:463-493

Guha S., Maheshwari S. *In vitro* production of embryos from anthers of Datura. *Nature*. 1964;204(4957):497-497. DOI 10.1038/204497a0

Hale B., Ferrie A.M., Chellamma S., Samuel J.P., Phillips G.C. Androgenesis-based doubled haploidy: Past, present, and future perspectives. *Front. Plant Sci*. 2022;12:751230. DOI 10.3389/fpls.2021.751230

Hao M., Chen J., Zhang L., Luo J., Yuan Z., Yan Z., Liu D. The genetic study utility of a hexaploid wheat DH population with non-recombinant A-and B-genomes. *SpringerPlus*. 2013;2(1):131. DOI 10.1186/2193-1801-2-131

Kanbar O.Z., Lantos C., Chege P., Kiss E., Pauk J. Generation of doubled haploid lines from winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding material using *in vitro* anther culture. *Czech J. Genet. Plant Breed*. 2020;56(4):150-158. DOI 10.17221/113/2019-CJGPB

Kasha K.J., Maluszynski M. Production of doubled haploids in crop plants. An introduction. In: Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (Eds.). Doubled Haploid Production in Crop Plants. Dordrecht: Springer, 2003;1-4. DOI 10.1007/978-94-017-1293-4_1

Kondic-Špika A., Vukosavljev M., Kobiljski B., Hristov N. Relationships among androgenic components in wheat and their responses to the environment. *J. Biol. Res.* 2011;16:217-223

Lantos C., Pauk J. Anther culture as an effective tool in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding. *Russ. J. Genet*. 2016;52(8):794-801. DOI 10.1134/S102279541608007X

Lantos C., Pauk J. Factors influencing the efficiency of wheat anther culture. *Acta Biol. Crac. Ser. Bot*. 2020;62(2):7-16. DOI 10.24425/abcsb.2020.131671

Lantos C., Weyen J., Orsini J.M., Gnad H., Schlieter B., Lein V., Kontowski S., Jacobi A., Mihály R., Broughton S., Pauk J. Efficient application of *in vitro* anther culture for different European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding programmes. *Plant Breed*. 2013;132(2):149-154. DOI 10.1111/pbr.12032

Lazaridou T., Pankou C., Xynias I., Roupakias D. Effect of D genome on wheat anther culture response after cold and mannitol pretreatment. *Acta Biol. Crac. Ser. Bot*. 2016;58(1):95-102. DOI 10.1515/abcsb-2016-0006

Li H., Singh R.P., Braun H.J., Pfeiffer W.H., Wang J. Doubled haploids versus conventional breeding in CIMMYT wheat breeding programs. *Crop Sci*. 2013;53(1):74-83. DOI 10.2135/CROPSCI2012.02.0116

Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (Eds.). Doubled Haploid Production in Crop Plants. Dordrecht: Springer, 2003. DOI 10.1007/978-94-017-1293-4

Nielsen N.H., Andersen S.U., Stougaard J., Jensen A., Backes G., Jahoor A. Chromosomal regions associated with the *in vitro* culture response of wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores. *Plant Breed*. 2015;134(3):255-263. DOI 10.1111/pbr.12257

Ouyang J.W., Hu H., Chuang C.C., Tseng C.C. Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured *in vitro*. *Sci. Sin.* 1973;16:79-95

Pederson D.G. The estimation of heritability and degree of dominance from a diallel cross. *Heredity*. 1971;27(2):247-264. DOI 10.1038/hdy.1971.88

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. DOI 10.3390/plants9060764

Seguí-Simarro J.M., Moreno J.B., Fernández M.G., Mir R. Species with haploid or doubled haploid protocols. In: Segui-Simarro J.M. (Ed.). Doubled Haploid Technology. Methods in Molecular Biology. Vol. 2287. New York: Humana, 2021a;41-103. DOI 10.1007/978-1-0716-1315-3_3

Seguí-Simarro J.M., Jacquier N.M., Widiez T. Overview of *in vitro* and *in vivo* doubled haploid technologies. In: Segui-Simarro J.M. (Ed.). Doubled Haploid Technology. Methods in Molecular Biology. Vol. 2287. New York: Humana, 2021b;3-22. DOI 10.1007/978-1-0716-1315-3_1

Sharma S., Sethi G.S., Chaudhary H.K. Influence of winter and spring wheat genetic backgrounds on haploid induction parameters and trait correlations in the wheat × maize system. *Euphytica*. 2005;144(1-2):199-205. DOI 10.1007/s10681-005-5812-9

Tuvesson S., Ljungberg A., Johansson N., Karlsson K.E., Suijs L.W., Josset J.P. Large-scale production of wheat and triticale double haploids through the use of a single-anther culture method. *Plant Breed*. 2000;119(6):455-459. DOI 10.1046/j.1439-0523.2000.00536.x

Tuvesson S.A., von Post R., Ljungberg A. Wheat anther culture. In: Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (Eds.). Doubled Haploid Production in Crop Plants. Dordrecht: Springer, 2003;71-76. DOI 10.1007/978-94-017-1293-4_12

Wędzony M., Forster B.P., Żur I., Golemiec E., Szechyńska-Hebda M., Dubas E., Gotębiowska G., Wędzony M. Progress in doubled haploid technology in higher plants. In: Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. (Eds.). Advances in Haploid Production in Higher Plants. Dordrecht: Springer, 2009;1-33. DOI 10.1007/978-1-4020-8854-4_1

Zhao L., Liu L., Wang J., Guo H., Gu J., Zhao S., Li J., Xie Y. Development of a new wheat germplasm with high anther culture ability by using of gamma-ray irradiation and anther culture. *J. Sci. Food Agric.* 2015;95(1):120-125. DOI 10.1002/jsfa.6691

Zhao P., Wang K., Zhang W., Liu H.Y., Du L.P., Hu H.R., Ye X.G. Comprehensive analyses of differently expressed genes and proteins in albino and green plantlets from a wheat anther culture. *Biol. Plant*. 2017;61:255-265. DOI 10.1007/s10535-016-0662-y

ORCID
N.V. Petrash orcid.org/0000-0002-7499-6803
T.N. Kapko orcid.org/0000-0003-1573-1618
V.V. Sovetov orcid.org/0000-0003-4497-9137

Благодарности. Работа поддержана бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН № FWNR-2022-0017.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 01.08.2023. После доработки 29.09.2023. Принята к публикации 05.10.2023.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023;27(8):1031-1041
DOI 10.18699/VJGB-23-118

Reconstruction and analysis of the gene regulatory network for cell wall function in *Arabidopsis thaliana* L. leaves in response to water deficit

A.R. Volyanskaya[1, 2], E.A. Antropova[1], U.S. Zubairova[1, 2], P.S. Demenkov[1, 3], A.S. Venzel[1, 3], Y.L. Orlov[1, 4, 5], A.A. Makarova[1], T.V. Ivanisenko[1, 3], T.A. Gorshkova[6], A.R. Aglyamova[6], N.A. Kolchanov[1], M. Chen[7], V.A. Ivanisenko[1, 2, 3] ✉

[1] Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
[3] Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia
[4] I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russia
[5] Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia
[6] Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russia
[7] College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, China
✉ salix@bionet.nsc.ru

Abstract. The plant cell wall represents the outer compartment of the plant cell, which provides a physical barrier and triggers signaling cascades under the influence of biotic and abiotic stressors. Drought is a factor that negatively affects both plant growth and development. Cell wall proteins (CWP) play an important role in the plant response to water deficit. The adaptation mechanisms of the cell wall to water loss are of interest for identifying important genetic factors determining plant drought resistance and provide valuable information on biomarkers for further selection aimed at increasing the yield of crop plants. Using ANDSystem, a gene network describing the regulation of CWPs under water restriction conditions was reconstructed. The analysis of the gene network and the transcriptome data analysis allowed prioritizing transcription factors (TF) based on their enrichment of differentially expressed genes regulated by them. As a result, scores were calculated, acting as indicators of the association of TFs with water deficit. On the basis of the score values, eight most significant TFs were selected. The highest priority was given to the TF GBF3. CWPs were prioritized according to the criterion of summing up the scores of transcription factors regulating these genes. Among the most prioritized CWPs were the *AT5G03350* gene encoding a lectin-like protein, *AT4G20860* encoding BBE-like 22 required for the oxidation of cellulose degradation products, and *AT4G37800* encoding xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 7. Overall, the implemented algorithm could be used for prediction of regulatory interactions between transcription factors and target genes encoding cell wall proteins in plants.
Key words: plant cell wall; drought; plants; differentially expressed genes; text mining; microarray; gene regulatory network.

For citation: Volyanskaya A.R., Antropova E.A., Zubairova U.S., Demenkov P.S., Venzel A.S., Orlov Y.L., Makarova A.A., Ivanisenko T.V., Gorshkova T.A., Aglyamova A.R., Kolchanov N.A., Chen M., Ivanisenko V.A. Reconstruction and analysis of the gene regulatory network for cell wall function in *Arabidopsis thaliana* L. leaves in response to water deficit. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(8):1031-1041. DOI 10.18699/VJGB-23-118

Реконструкция и анализ регуляторной генной сети функционирования клеточной стенки листьев *Arabidopsis thaliana* L. при ответе на водный дефицит

А.Р. Волянская[1, 2], Е.А. Антропова[1], У.С. Зубаирова[1, 2], П.С. Деменков[1, 3], А.С. Вензель[1, 3], Ю.Л. Орлов[1, 4, 5], А.А. Макарова[1], Т.В. Иванисенко[1, 3], Т.А. Горшкова[6], А.Р. Агълямова[6], Н.А. Колчанов[1], М. Чен[7], В.А. Иванисенко[1, 2, 3] ✉

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия
[3] Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия
[4] Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Москва, Россия
[5] Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва, Россия
[6] Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия
[7] Колледж наук о жизни, Чжэцзянский университет науки и техники, Ханчжоу, Китай
✉ salix@bionet.nsc.ru

Аннотация. Растительная клеточная стенка представляет собой внешний компартмент растительной клетки, который во многом обеспечивает физический барьер и запуск сигнальных каскадов при действии био- и абиотических стрессоров. Засуха негативно влияет как на рост, так и развитие растений. Белки клеточной стенки

© Volyanskaya A.R., Antropova E.A., Zubairova U.S., Demenkov P.S., Venzel A.S., Orlov Y.L., Makarova A.A., Ivanisenko T.V., Gorshkova T.A., Aglyamova A.R., Kolchanov N.A., Chen M., Ivanisenko V.A., 2023
This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 License

(БКС) играют существенную роль в ответе растений на водный дефицит. Механизмы адаптации клеточной стенки к потере воды могут быть использованы для выявления важных генетических факторов, определяющих устойчивость растений к засухе, и предоставляют ценные данные о биомаркерах для дальнейшей селекции, направленной на повышение урожайности культурных растений. С помощью ANDSystem реконструирована генная сеть, позволяющая описывать регуляцию БКС в условиях ограничения полива. Анализ генной сети совместно с анализом транскриптомных данных позволил провести приоритизацию транскрипционных факторов (ТФ) по их обогащенности регулируемыми дифференциально экспрессирующимися генами. В результате были рассчитаны веса, являющиеся индикаторами ассоциации ТФ с водным дефицитом. По значениям весов отобраны восемь наиболее значимых ТФ. Наибольшим приоритетом обладал ТФ GBF3. Приоритизация БКС проведена по критерию суммирования весов транскрипционных факторов, регулирующих эти гены. К наиболее приоритетным БКС отнесены ген *AT5G03350*, кодирующий лектин-подобный белок; *AT4G20860*, кодирующий фермент берберинового моста BBE-like 22 (berberine bridge enzyme-like 22), необходимый для окисления продуктов распада целлюлозы, и *AT4G37800*, кодирующий ксилоглюкан эндотрансгликозилазу/гидролазу 7.
Ключевые слова: клеточная стенка растений; засуха; растения; дифференциально экспрессирующиеся гены; интеллектуальный анализ текста; микрочип; регуляторная генная сеть.

Для цитирования: Волянская А.Р., Антропова Е.А., Зубаирова У.С., Деменков П.С., Вензель А.С., Орлов Ю.Л., Макарова А.А., Иванисенко Т.В., Горшкова Т.А., Агълямова А.Р., Колчанов Н.А., Чен М., Иванисенко В.А. Реконструкция и анализ регуляторной генной сети функционирования клеточной стенки листьев *Arabidopsis thaliana* L. при ответе на водный дефицит. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023; 27(8):1031-1041. DOI 10.18699/VJGB-23-118

Introduction

The plant cell wall is a complex structure composed of numerous biopolymers. The structure and composition of the cell wall change during plant development and are incredibly diverse not only between plant species but also between tissue types (Burton et al., 2010). Throughout their life cycle, plants are exposed to abiotic stresses such as drought, flooding, salinity, heavy metal pollution, nutrient deficiencies, and more. The plant cell wall provides a structural basis for supporting plant growth, serves as a source of various signals, and contributes to plant resistance to stressors.

Drought is a significant environmental problem, severely affecting plant growth, development, and yield. Plants subjected to water deficit exhibit morphological changes, in which proteins that are part of the cell wall play a critical role (Le Gall et al., 2015; Ezquer et al., 2020). However, the functions of these proteins, their regulation, and their interactions require further investigation.

Plant adaptation to drought has been demonstrated to be mediated by signaling pathways involving transcription factors (TFs) (Singh, Laxmi, 2015; Joshi et al., 2016). Therefore, studying the role of TFs as the primary regulators of water deficit-sensitive genes is particularly interesting. TFs regulate the expression of water deficit-sensitive genes in an abscisic acid (ABA)-dependent or ABA-independent manner (Yamaguchi-Shinozaki, Shinozaki, 2006). ABA-dependent positive regulators include the ABF/AREB (ABA-responsive element (ABRE)-binding proteins/ABRE-binding factors) family of the bZIP (basic leucine zipper) type, which recognizes ABA-sensitive elements (ABRE) in the promoters of ABA-induced genes (Choi et al., 2000). The ABA-dependent regulatory pathway also includes several other families of transcription factors, such as AP2/ERF, MYB, NAC, and bHLH. In contrast, key ABA-independent regulators are members of the DREB family (Fujita et al., 2011).

Reconstructing gene networks based on the analysis of transcriptomic data obtained under water deficit conditions can contribute to understanding the molecular-genetic mechanisms underlying the formation and functioning of the plant cell wall in drought resistance. Currently, approaches based on the automatic analysis of scientific publication texts are actively used for gene network reconstruction. Previously we have developed the cognitive ANDSystem tool based on artificial intelligence methods, which performs automatic extraction of knowledge from scientific publications and factographic databases (Ivanisenko et al., 2015, 2019, 2020, 2022a). ANDSystem has been applied to a wide range of tasks, including the interpretation of metabolomic data in the analysis of blood plasma from COVID-19 patients (Ivanisenko et al., 2022b) and the prioritization of genes associated with human diseases (Saik et al., 2016, 2018a, b, 2019; Yankina et al., 2018; Antropova et al., 2022). The ANDSystem technology has also been used to solve problems in the field of plant biology. For example, with the help of ANDSystem, the SOLANUM TUBEROSUM knowledge base (Saik et al., 2017; Ivanisenko et al., 2018), which contains associative gene networks of plants, was developed. The application of ANDSystem allowed the identification of important genes involved in the response to abiotic stresses caused by drought, soil salinity, and elevated cadmium concentration (Demenkov et al., 2021).

To date, several studies have been carried out on the reconstruction of gene networks describing the response of *Betula platyphylla* and barley to drought (Javadi et al., 2021; Jia et al., 2022). Gene networks have also been constructed that describe the biosynthesis of the secondary cell wall of *A. thaliana* and the interactions of TFs that regulate cell wall biosynthesis in rice (Taylor-Teeples et al., 2015; Zhao et al., 2019). However, these gene networks have not been focused on the involvement of the cell wall in response mechanisms to water deficiency.

Using the ANDSystem software package (Ivanisenko et al., 2015, 2019, 2020, 2022a), we reconstructed a gene network based on the analysis of transcriptomic data for *Arabidopsis thaliana* leaves under water deficit conditions (Perera et al., 2008; Ding et al., 2009; Kühn et al., 2014; Fang et al., 2016; Noman et al., 2019). The reconstructed gene network and transcriptomic analysis prioritized TFs and genes encoding cell wall proteins (CWP) based on their involvement in the

stress response during water deficit. The method of transcription factor prioritization contributed to isolating key regulatory proteins that are sensitive to the effects of water deficiency. The identification of key TFs made it possible to identify a list of target genes involved in the mechanisms of cell wall resistance to water deficit conditions. The final gene network containing priority genes included 8 TFs and 59 protein genes present in the cell wall according to the WallProtDB database (San Clemente, Jamet, 2015). According to the prioritization results, the *GBF3* gene encoding the TF made the most significant contribution to the regulation of cell wall genes. Among the cell wall genes, the lectin-like protein was the most important. The results reveal potential molecular-genetic mechanisms of the plant cell wall response to water deficit.

Materials and methods

Identification of *Arabidopsis thaliana* cell wall proteins. The WallProtDB plant cell wall proteomics database (http://www.polebio.lrsv.ups-tlse.fr/WallProtDB) (San Clemente, Jamet, 2015) was used for finding the *A. thaliana* cell wall proteins. WallProtDB contains proteins identified using mass spectrometry technology in the cell wall proteome. According to the WallProtDB data, all cell wall proteins were divided into nine functional classes: 1) proteins acting on cell wall carbohydrates, 2) oxidoreductases, 3) proteases, 4) proteins with protein or polysaccharide interaction domains, 5) structural proteins, 6) lipid metabolism-related proteins, 7) proteins presumably involved in signal transduction, 8) various proteins, and 9) proteins with unknown function (Jamet et al., 2008). Enzymes synthesizing cell wall components and forming necessary substrates are not included in the list, as they are localized in other compartments and are, therefore, not represented in the WallProtDB database.

Processing of transcriptomic data. Data on the differential expression of *A. thaliana* genes under limited watering conditions were taken from the DNA microarray experiments database from the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) (Perera et al., 2008; Noman et al., 2019; Fang et al., 2016; Ding et al., 2009; Kühn et al., 2014). Bioinformatics analysis of transcriptomic data was performed in the R programming environment using Bioconductor packages (Gentleman et al., 2004). Reading of the CEL files containing probe identifiers and intensities was done using the readAffy() function from the affy package (Gautier et al., 2004). Data normalization, background noise correction, and gene expression level calculations were done using the affy package's rma() function. Differential gene expression analysis was performed using the limma package (Ritchie et al., 2015).

To identify differentially expressed genes (DEGs) across multiple experiments, consistently activated or consistently suppressed under water deficit conditions, binomial distribution (*p-value* = 0.05) was applied using the binomtest() function implemented in the scipy.stats library.

Reconstruction and analysis of the gene network. The gene network describing regulatory relationships of TFs with target genes associated with the cell wall response of *A. thaliana* leaves to water deficit was constructed using the ANDSystem software package (Ivanisenko et al., 2015, 2019, 2020, 2022a).

Prioritization of transcription factors and their target genes. The prioritization of transcription factors was carried out based on the score of the transcription factor (STF) values. The STF for a given transcription factor was equal to the number of DNA microarray experiments in which the list of cell wall genes regulated by this TF was enriched with DEGs. Enrichment was assessed using the hypergeometric distribution.

The prioritization of cell wall genes was carried out using the score of cell wall protein (SCWP), equal to the number of connections between the cell wall gene and TFs in the gene network.

Results

General analysis scheme

The overall workflow is shown in Figure 1. It consists of the stage of transcriptome data analysis for *A. thaliana* leaves under water deficit conditions (this analysis aims to determine stably DEGs), gene network reconstruction stage (at this stage, the cell wall gene regulatory network under water deficit conditions was reconstructed using automated text analysis methods for scientific publications, factographic databases, and differential gene expression data), and the stage of prioritizing genes based on their involvement in the response to stress caused by water deficit.

Differentially expressed genes under water deficit conditions

To determine the DEGs of *A. thaliana* under limited watering conditions, an analysis of data from five DNA microarray experiments from the NCBI GEO (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) was carried out (Table 1). All data were obtained on the Affymetrix Arabidopsis ATH1 Genome Array platform. In all experiments, the subject of the study was leaves, and the duration of days without watering ranged from 4 to 14 days.

A *p-value* threshold and a log fold change threshold (logFC) were used to determine differentially expressed genes: *p-value* < 0.05 and logFC > 1. Table 2 shows the number of DEGs for each of the five experiments. Expression data analysis across five experiments, performed using the binomial distribution, showed that changes in gene expression in two or more experiments could indicate that the gene is a stable DEG with a significance level of *p-value* < 0.05.

Gene network reconstruction

The input data for the gene network reconstruction consisted of 1073 *A. thaliana* gene identifiers TAIR, encoding CWP, obtained from the WallProtDB database (Supplementary Table 1[1]). Using ANDSystem, a regulatory network was reconstructed, containing interactions of these genes with transcription factors. For 692 genes, 599 potential TFs were identified. 381 CWP genes without interactions with TFs were removed from the network.

In the next step, we selected TFs considering their involvement in biological processes related to plant responses to drought. In ANDSystem, four biological processes were

[1] Supplementary Tables 1–5 and Supplementary Figure are available at: https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2023-27/appx34.xlsx

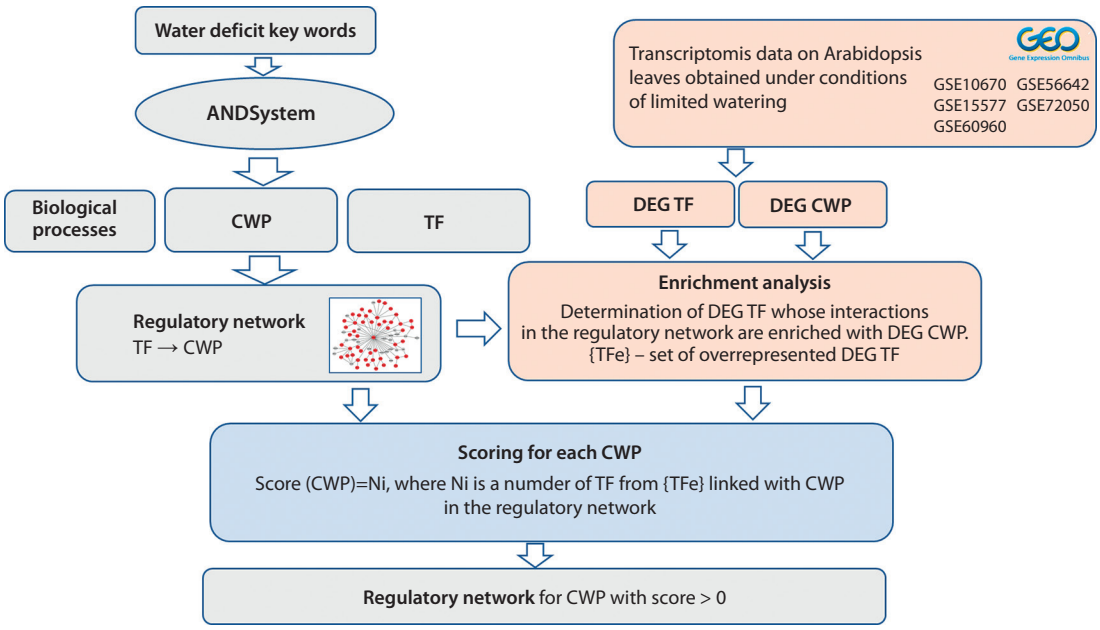


Fig. 1. A pipeline for reconstructing a regulatory gene network describing the regulation of expression of *A. thaliana* cell wall proteins in drought response.

DEG, differentially expressed genes; CWP, cell wall protein; TF, transcription factors.

Table 1. Publicly available DNA microarray data for *A. thaliana* leaves used in this study

GEO ID	Development stage	Days without watering	Cell source	Ecotype	Reference
GSE10670	2 months	7 days	Leaves	Col-0	Perera et al., 2008
GSE56642	1 month	14 days	Leaves	Col-0	Noman et al., 2019
GSE15577	1 month	6 days	Leaves	Col-0	Fang et al., 2016
GSE72050	1 month	5 days	Leaves	Col-0	Ding et al., 2009
GSE60960	1 month	4 days	Leaves	Col-0	Kühn et al., 2014

Table 2. Number of identified differentially expressed genes in the experiments

Study (GEO ID)	Number of DEGs	Number of TF genes among DEGs	Number of CWP genes among DEGs
GSE10670	3158	21	113
GSE56642	6017	33	185
GSE15577	3753	12	140
GSE72050	1959	11	105
GSE60960	1603	13	51

represented, with their names containing the keywords "drought" and "water" in combination with "tolerance" and "deprivation." These processes included the response to water deprivation, obsolete drought tolerance, drought recovery, and response to water. Fifty-six TFs were associated with these processes in ANDSystem (Fig. 2).

These 56 TFs were found to regulate 425 CWP genes (Suppl. Table 2). As a result of the analysis of *A. thaliana* leaves, it was shown that 23 TFs (Suppl. Figure) and 146 CWP genes demonstrated a stable unidirectional change in expression (Suppl. Table 3). However, not all CWP genes among the targets of the 23 TFs in the gene network were stably unidirectional DEGs. Therefore, we assessed the importance of TFs for the plant response to drought based on the enrichment analysis of their targets in the CWP DEG gene network. We assumed that the more CWP DEGs are among the targets of a transcription factor, the more significantly the transcription factor is associated with the plant's response to water deficit.

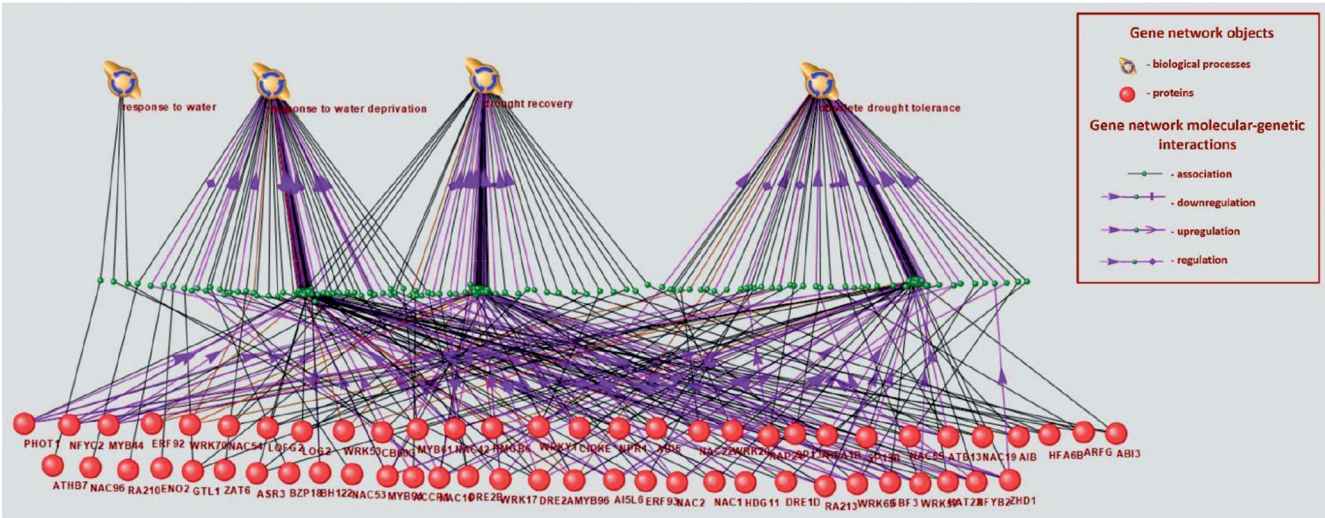


Fig. 2. Associative network of transcription factors related to drought.

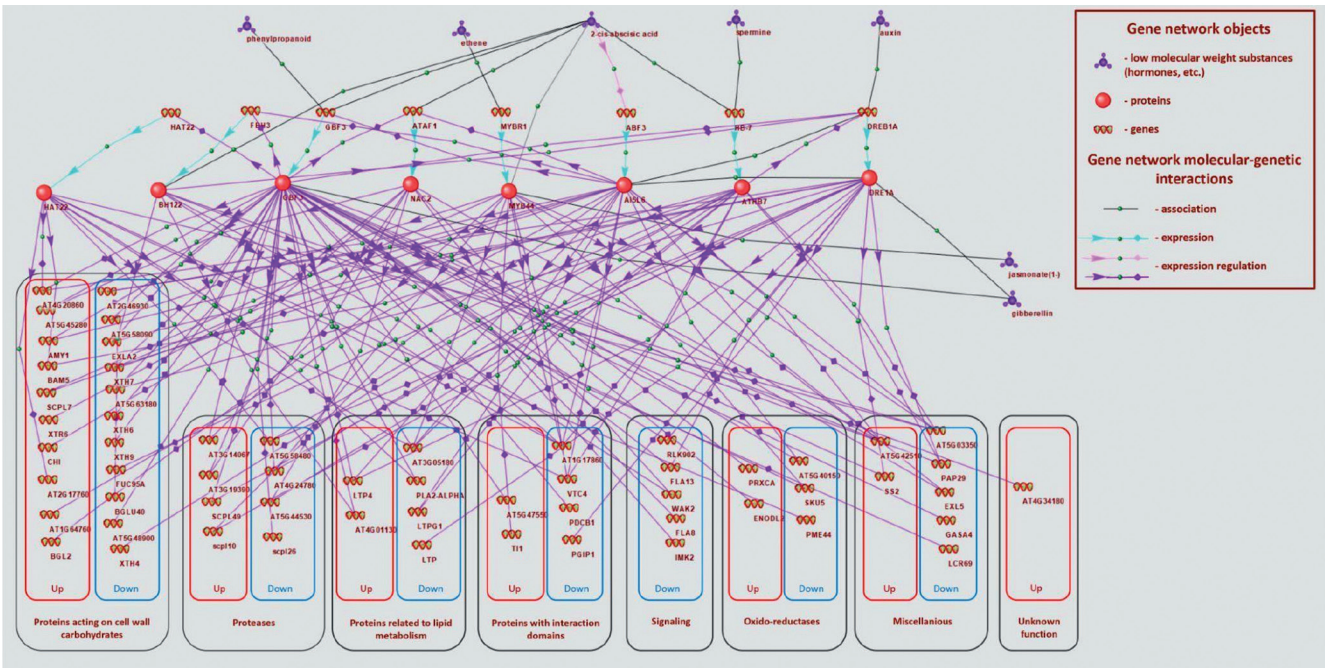


Fig. 3. Gene network regulating the cell wall of *Arabidopsis thaliana L.* in response to water deficit and connection with key hormones.

Prioritization of transcription factors and their target genes and reconstruction of the resulting gene network

The prioritization of TFs and CWP genes for the response to drought was based on the STF and SCWP criteria, which characterized both their differential expression and their connections with DEGs in the gene network (see methods). The values of these indicators were calculated for the participants of the gene network and are presented in Supplementary Tables 4 and 5. The highest STF and SCWP values corresponded to the highest priority.

Priority TFs were selected based on the statistically significant enrichment of their target genes encoding CWPs in DEGs in at least one of the transcriptomic experiments. Thus, according to this criterion, out of 23 TFs, 8 priority TFs were identified. The identified transcription factors belonged to the TF families HD-ZIP, bZIP, ERF, NAC, and MYB. All TFs were removed from the network to obtain the resulting gene network, except for those identified as priority TFs. Cell wall protein genes not connected to TFs were also removed. After filtering, the gene network contained 8 TFs and 59 CWP genes (see Suppl. Tables 4 and 5). We were also interested in analyzing the possible regulation of the identified TFs by active low-molecular-weight compounds (polyamines and hormones). For this purpose, the gene network was expanded with interactions of TFs with metabolites (Fig. 3).

Discussion

The scientific literature actively studies the genetic regulation of plant cell wall functioning under drought conditions. To date, a large amount of information has been accumulated on the molecular-genetic events of plant responses to water deficit, including data from differential gene expression experiments. Applying an approach based on the reconstruction of gene networks allows for integrating disparate knowledge to describe the molecular-genetic mechanisms of complex cell processes. Here, we reconstructed a gene network using ANDSystem and prioritized its participants based on their importance for the response of *A. thaliana* to drought conditions. The reconstructed gene network contains eight transcription factor genes and their protein products, six low-molecular-weight compounds (hormones and polyamines), and 59 genes encoding cell wall components regulated by the identified TFs (see Fig. 3). These 59 genes belong to 8 of the nine functional groups according to the classification presented in Supplementary Table 5. One functional class (structural protein group) is not represented among the identified genes.

The most prioritized transcription factor

Interestingly, all eight identified genes encoding TFs showed expression activation (see Suppl. Table 4). Among them, GBF3 regulates the transcription of the most significant number of genes encoding CWP. At the same time, it was stably expressed in all analyzed *A. thaliana* transcriptomes in this study obtained under water restriction conditions. There is also evidence that overexpression of GBF3 in *A. thaliana* led to improved resistance to osmotic stress, salinity, and drought, in addition to conferring insensitivity to ABA (Ramegowda et al., 2017).

Proteins acting on cell wall carbohydrates

In the reconstructed gene network, the largest group was represented by genes encoding proteins that act on cell wall carbohydrates (21 genes), 10 of which showed activation and 11 showed suppression of expression. This functional class includes expansins, glycosidases, and esterases. The highest priority among this functional class was given to the gene *XTH7* (AT4G37800), encoding xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 7. XTHs can hydrolyze and reconnect the molecules of xyloglucan – the key hemicellulose of primary cell walls (Rose et al., 2002). These enzymes are involved in cell wall remodeling during plant cell growth and response to various stressors. XTHs are encoded by a large multigene family, members of which are differentially expressed in various physiological situations having peculiarities in activity mode and regulation nuances (Zhang et al., 2017; Nazipova et al., 2022). According to the SCWP indicator, XTH7 is ranked third among the 59 considered cell wall genes (5 points, see Suppl. Table 5). As can be seen from Figure 3, this gene is regulated by TFs GTF3 and DREB1A (CBF3). The XTH7 enzyme and its activity have not been fully characterized yet. According to gene expression data, XTH7 is involved in salt resistance and ethylene-dependent apple softening (Zhang et al., 2017; Cai et al., 2023). It also participates in processes such as cell enlargement and restructuring. According to our differential expression analysis, it showed stable suppression, as a result of which its influence on limiting cell growth under drought conditions can be assumed. The other members of this functional class had priority ratings ranging from one to three points. The second-highest ranking gene is AT2G43570, encoding the enzyme endochitinase CHI (3 points, see Suppl. Table 5).

Proteases

The next most represented functional group was proteases, with eight genes. Subtilases are the most represented family of cell wall proteases (Jamet et al., 2008). Eight genes belonging to the protease functional group were identified in the regulatory gene network, with 4 showing activation of expression and 4 showing suppression. According to the SCWP indicator, three genes from this functional group scored three points: *AT2G23000*, encoding serine carboxypeptidase-like 10 (SCPL10), which is necessary for the biosynthesis of sinapoylated anthocyanins; *AT3G14067*, encoding subtilisin-like protease SBT1.4; and *AT5G44530*, encoding subtilisin-like protease SBT2.3 (see Suppl. Table 5). SBT1.4 is also called senescence-associated subtilisin protease due to its role in leaf aging. It has been shown that SCPL10 slows down the elongation of the main shoot, branching, and size of inflorescences (Martinez et al., 2015). According to our analysis, the expression of this gene increases under water deficit conditions, suggesting that SCPL10 may play a direct role in inhibiting plant growth under drought conditions. Other representatives of this group scored 1 to 2 SCWP points.

Proteins with interaction domains (with proteins or polysaccharides)

In our study, the highest SCWP score was obtained by the *AT5G03350* gene (7 points, see Suppl. Table 5), which belongs to the functional class of proteins having interaction domains with proteins or polysaccharides. This class includes lectins and enzyme inhibitors, such as polygalacturonase inhibiting protein, pectin methylesterase, and protease inhibitors. Among the six differentially expressed genes of this functional group identified under water deficit conditions, the expression of four genes was suppressed, while two genes demonstrated activation of expression. In a previous study conducted on 220 microarray samples of *A. thaliana* available in the GEO, it was also shown that under drought conditions, the *AT5G03350* gene, encoding salicylic acid-induced legume lectin-like protein 1, was suppressed 7.9 times (Shaik et al., 2013). It seems to be involved in *A. thaliana* responses to multiple environmental stresses (including cold, high light, oxidative, ozone, and wound) and SA-mediated processes occurring in the effector-induced immune response (Armijo et al., 2013; Biswas et al., 2022). Due to the unusual structure of the legume lectin domain, proteins of this family may have a wide range of carbohydrate-binding specificity (Sharma et al., 1997), which possibly determines their diverse functions (including involvement in symbiosis, defense mechanisms against bacterial infection, enhanced tolerance against insects, salinity, and stomatal closure) (Van Holle et al., 2017). According to our results, the *AT5G03350* gene is most significantly associated with TFs differentially expressed under water deficit conditions. These factors include HAT22, BH122, MYB44, ABF3, and ATHB7. Other representatives of this class scored between 1 and 3 SCWP points.

Oxidoreductases

In the reconstructed regulatory network, five oxidoreductase genes were identified; under water deficit conditions, the expression of two of these genes was activated, and three were suppressed. According to our study, the *AT4G20860* gene ranks second in priority among the 59 investigated cell wall genes, with an SCWP of 5 (see Suppl. Table 5). *AT4G20860* encodes berberine bridge enzyme-like 22 (BBE-like 22), which is necessary to oxidize cellodextrins (cellulose degradation products). Its role under limited irrigation conditions is unclear; however, it has been shown that *A. thaliana* with increased expression of the *AT4G20860* gene product is more resistant to the *Botrytis cinerea* fungus, presumably because oxidized cellodextrins are a less valuable carbon source (Locci et al., 2019). In the reconstructed gene network, *AT4G20860* may be regulated by TFs such as HAT22, GBF3, and ABF3 and is activated under water deficit conditions.

Other representatives of the oxidoreductase class – peroxidases – perform a dual function in plant cell walls: they contribute to the weakening of the cell wall by releasing hydroxyl radicals (OH-), which can cause polysaccharide scission (Schweikert et al., 2000) and increase wall rigidity by strengthening extensin cross-links and supporting lignification and suberization of the cell wall (Novaković et al., 2018).

Proteins related to lipid metabolism

In the reconstructed gene network, six genes encode proteins involved in the metabolism of cell wall lipids. According to the analysis we conducted, under water deficit conditions, the expression of two genes was enhanced, while the expression of four genes was suppressed. Various studies have shown that plants remodel lipid composition in response to drought (Gigon et al., 2004; Liu et al., 2021). In experiments on milk thistle, it was demonstrated that under drought conditions, PLA2-ALPHA (*AT2G06925*), which encodes a secretory phospholipase A2 enzyme, had reduced expression (Ghanbari Moheb Seraj et al., 2022), which is also evident in our results. Secreted PLA2s are low molecular weight calcium-dependent enzymes, which specifically hydrolyze the sn-2 position of phospholipids and can do that in an organized membrane (Mariani, Fidelio, 2019). They are involved in many cell wall-related processes; for example, *Arabidopsis* PLA2-ALPHA is required for the trafficking of PIN-FORMED auxin efflux transporters to the plasma membrane (Lee et al., 2010). The *PLA2-ALPHA* gene scored 4 points on the SCWP indicator (4th place in Suppl. Table 5), meaning it is significantly associated with regulatory factors differentially expressed under water deficit conditions (HAT22 and GBF3).

Three other genes from this category, AT1G27950 for LTPG1 (SCWP 3), *AT5G59310* for LTP4 (SCWP 2), and *AT2G15050* for LTP7 (SCWP 1) (see Suppl. Table 5) encode lipid transfer proteins. *AT1G27950* is a membrane-localized protein with a predicted GPI (glycosylphosphatidylinositol)-anchor domain. It extensively exports intracellular lipids (e. g., C29 alkane) to the surface to build the cuticular wax layer (Lee et al., 2009). *AT5G59310* and *AT2G15050* belong to non-specific lipid transfer proteins encoded by a large multigene family and occur only in land plants (Salminen et al., 2016). They are small proteins with a tunnel-like hydrophobic cavity that makes them suitable for binding and transport of phospholipids as well as galactolipids across membranes. LTPs are suggested to play a role in wax or cutin deposition in the cell walls (Salminen et al., 2016).

Signaling

Our study identified five genes encoding cell wall proteins involved in signal transduction. The expression of all considered genes was suppressed under water deficit conditions. Based on the SCWP indicator, among the genes of this functional group, the gene *AT2G45470* (see Suppl. Table 5) scored the highest number of points (3), encoding fasciclin-like arabinogalactan protein 8 (FLA8). Numerous plant FLAs are chimeric proteins that contain moderately glycosylated arabinogalactan protein and one to two fasciclin domains with characteristic highly conserved sequence stretches of around 15 residues and a conserved central YH motif. FLAs are non-structural components of the cell wall, might be linked to cell wall polysaccharides, and interact with various cell surface receptors involved in various plant development processes, including cellulose biosynthesis (Seifert, 2018). FLA8 itself has been poorly characterized. The *AT2G45470* gene is significantly associated with the transcription factor GBF3.

Another identified representative of the signal protein class is wall-associated kinase 2 (WAK2), encoded by the *At1g21270* gene, scoring 2 points on the SCWP. Alongside WAK1, WAK2 is a cell wall receptor with an intracellular protein kinase domain, a transmembrane domain, and an extracellular N-terminal domain capable of binding poly- and oligogalacturonans (Wagner, Kohorn, 2001). By binding pectins, WAK initiates signal transmission through mitogen-activated protein kinases (MAPK) for activation of vacuolar invertase and numerous other inducible proteins, regulating turgor pressure and, as a result, increasing cell size (Kohorn et al., 2006). Using antisense RNA, WAK2 is necessary for leaf cell expansion (but not for cell division) (Wagner, Kohorn, 2001). By interacting with polygalacturonan fragments formed as components of DAMP and PAMP under the influence of biotic and abiotic events, WAK can also trigger (via MAPK activation) a stress response. WAK expression is induced by injury, pathogen infection, and exposure to other stress factors such as ozone and heavy metals (Kohorn B.D., Kohorn S.L., 2012). A study conducted on sweet orange graft showed that WAK2 expression was suppressed under drought conditions in both sweet orange plants grafted on drought-tolerant and drought-sensitive rootstocks (Gonçalves et al., 2019). It can be assumed that under water deficit conditions, plants reduce WAK2 expression to lower turgor pressure, suspend leaf cell expansion, and induce other components of the stress response.

Miscellaneous

For this group, our study revealed seven genes – 5 with reduced and 2 with increased expression under water deficit conditions. Among them, based on the SCWP indicator, two genes scored 4 points each (5–6th places in Suppl. Table 5) – the downregulated *AT5G15230*, encoding the poorly characterized gibberellin-regulated protein 4 (GASA4), and the upregulated *AT5G42510*, encoding dirigent protein 1 (DIR1). DIR family

proteins are involved in lignin and lignin biosynthesis and play a role in plant response to biotic and abiotic stresses (particularly drought) that cause physical damage to the cell wall (Paniagua et al., 2017). It has previously been shown that the expression of several genes encoding DIR proteins is sensitive to water and cold stress and treatment with ABA. Moreover, in *Brassica* plants under water stress, the increased expression of DIR genes was temporally coordinated with an increase in lignin content (Thamil Arasan et al., 2013). In *Eucommia ulmoides* Oliv seedlings, it was shown that the expression level of *DIR1* increased almost 8-fold under osmotic stress within 6 hours and increased nearly three times under drought conditions within 12 hours (Li et al., 2021). The other representatives of this functional group each scored one point.

Hormones

Our reconstructed gene network also included hormones: ethylene, abscisic acid, auxin, jasmonate, gibberellin, and spermine – endogenous polyamine. These compounds affect transcription factors (altering the expression level or protein activity), subsequently leading to changes in the expression levels of target genes for transcription factors. Regulatory connections in the reconstructed network have been demonstrated under various conditions. Additional experiments are needed to explore whether they function under water deficit conditions.

For example, it was shown that upon infection of *A. thaliana* with aphids, the concentration of ethylene increases, which in turn induces the expression of the transcription factor MYB44 (Xia et al., 2014). Another transcription factor in our gene network, ABF3, is one of the key factors that transmit the abscisic acid signal and regulate the expression of target genes during water deficit (Yoshida et al., 2010). Under drought conditions, abscisic acid also induces the expression of the transcription factor ATHB7, which was observed within 30 minutes after experimentally induced stress, and *ATHB7* transcription continued to increase after 21 hours (Söderman et al., 1996). The expression of the transcription factor GBF3 is also activated by abscisic acid (Lu et al., 1996).

Polyamine spermine is essential for plants to respond to drought, as demonstrated in mutant *A. thaliana* plants knocked out for genes encoding spermine-synthesizing enzymes (Yamaguchi et al., 2007). Under water deficit conditions, the stomata of such plants remained open. Another low-molecular-weight compound in the gene network is gibberellin. Various studies have shown that reducing its level improves plant drought resistance (Shohat et al., 2021). Under cold conditions, the transcription factor DREB1A (CBF3) suppresses gibberellin accumulation (Zhou et al., 2017).

Based on the analysis of cell wall gene expression in different *A. thaliana* experiments under water deficit conditions, it can be noted that the plant's response to this abiotic factor involves changes in the expression of genes encoding proteins from almost all functional groups characteristic of the cell wall. The exception was the group of structural proteins, which may indicate that changes in the composition of cell wall structural components in response to water deficit do not occur or occur to a negligible extent. It can be observed that the expression of 23 examined genes is enhanced under these conditions, while that of 36 is weakened. In each functional group, there are both activated and deactivated genes, except for the group of genes encoding signaling proteins, in which the expression of all five examined genes was suppressed under water deficit conditions.

Conclusion

An analysis of five *A. thaliana* transcriptomes obtained under water deficit conditions was conducted. The implemented algorithm allowed to perform the prediction of potential regulatory interactions between transcription factors and target genes encoding cell wall proteins, which may play an important role in the response of *A. thaliana* to water deficit. Among the identified eight transcription factors regulating *A. thaliana* cell wall genes, GBF3 had the highest priority. Out of the 59 cell wall genes examined, the *AT5G03350* gene, encoding a lectin-like protein, was identified as the most prioritized for association with differentially expressed transcription factors under water deficit conditions. It is associated with transcription factors such as HAT22, BH122, MYB44, ABF3, and ATHB7. Also highly significantly associated with transcription factors are the *AT4G20860* gene, encoding BBE-like 22, which is necessary for the oxidation of cellulose degradation products (associated transcription factors – HAT22, GBF3, and ABF3), and *AT4G37800*, encoding xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 7 (transcription factors GTF3 and DREB1A), among others. Overall, the proposed algorithm that has been used to analyze the gene network of cell wall proteins can be applied to other model plant species.

References

Antropova E.A., Khlebodarova T.M., Demenkov P.S., Venzel A.S., Ivanisenko N.V., Gavrilenko A.D., Ivanisenko T.V., Adamovskaya A.V., Revva P.M., Lavrik I.N., Ivanisenko V.A. Computer analysis of regulation of hepatocarcinoma marker genes hypermethylated by HCV proteins. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2022;26(8):733-742. DOI 10.18699/VJGB-22-89 (in Russian)

Armijo G., Salinas P., Monteoliva M.I., Seguel A., García C., Villarroel-Candia E., Song W., van der Krol A.R., Álvarez M.E., Holuigue L. A salicylic acid-induced lectin-like protein plays a positive role in the effector-triggered immunity response of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* Avr-Rpm1. *Mol. Plant Microbe Interact*. 2013;26(12):1395-406. DOI 10.1094/MPMI-02-13-0044-R

Biswas S., Mondal R., Srivastava A., Trivedi M., Singh S.K., Mishra Y. *In silico* characterization, molecular phylogeny, and expression profiling of genes encoding legume lectin-like proteins under various abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*. 2022; 23(1):480. DOI 10.1186/s12864-022-08708-0

Burton R.A., Gidley M.J., Fincher G.B. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nat. Chem. Biol*. 2010; 6(10):724-732. DOI 10.1038/nchembio.439

Cai H., Xu Y., Yan K., Zhang S., Yang G., Wu C., Zheng C., Huang J. BREVIPEDICELLUS positively regulates salt-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Mol. Sci*. 2023;24(2):1054. DOI 10.3390/ijms24021054

Choi H., Hong J., Ha J., Kang J., Kim S.Y. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J. Biol. Chem*. 2000;275(3):1723-1730. DOI 10.1074/jbc.275.3.1723

Demenkov P.S., Oshchepkova E.A., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Ivanisenko V.A. Prioritization of biological processes based on the reconstruction and analysis of associative gene networks describing

the response of plants to adverse environmental factors. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(5):580-592. DOI 10.18699/VJ21.065 (in Russian)

Ding Y., Lapko H., Ndamukong I., Xia Y., Al-Abdallat A., Lalithambika S., Sadder M., Saleh A., Fromm M., Riethoven J.J., Lu G., Avramov Z. The Arabidopsis chromatin modifier ATX1, the myotubularin-like AtMTM, and the response to drought; a view from the other end of the pathway. *Plant Signal. Behav*. 2009;4(11):1049-1058. DOI 10.4161/psb.4.11.10103

Ezquer I., Salameh I., Colombo L., Kalaitzis P. Plant cell walls tackling climate change: biotechnological strategies to improve crop adaptations and photosynthesis in response to global warming. *Plants*. 2020;9(2):212. DOI 10.3390/plants9020212

Fang L., Su L., Sun X., Li X., Sun M., Karungo S.K., Fang S., Chu J., Li S., Xin H. Expression of *Vitis amurensis NAC26* in Arabidopsis enhances drought tolerance by modulating jasmonic acid synthesis. *J. Exp. Bot*. 2016;67(9):2829-2845. DOI 10.1093/jxb/erw122

Fujita Y., Fujita M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *J. Plant Res*. 2011;124(4):509-525. DOI 10.1007/s10265-011-0412-3

Gautier L., Cope L., Bolstad B.M., Irizarry R.A. affy–analysis of *Affymetrix GeneChip* data at the probe level. *Bioinformatics*. 2004; 20(3):307-315. DOI 10.1093/bioinformatics/btg405

Gentleman R.C., Carey V.J., Bates D.M., Bolstad B., Dettling M., Dudoit S., Ellis B., Gautier L., Ge Y., Gentry J., Hornik K., Hothorn T., Huber W., Iacus S., Irizzary R., Leisch F., Li C., Maechler M., Rossini A.J., Sawitzki G., Smith C., Tierney L., Yang J., Zhang J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*. 2004;5(10):R80. DOI 10.1186/gb-2004-5-10-r80

Ghanbari Moheb Seraj R., Tohidfar M., Azimzadeh Irani M., Esmaeilzadeh-Salestani K., Moradian T., Ahmadikhah A., Behnamian M. Metabolomics analysis of milk thistle lipids to identify drought-tolerant genes. *Sci. Rep*. 2022;12(1):12827. DOI 10.1038/s41598-022-16887-9

Gigon A., Matos A.R., Laffray D., Zuily-Fodil Y., Pham-Thi A.T. Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia). *Ann. Bot*. 2004;94(3):345-351. DOI 10.1093/aob/mch150

Gonçalves L.P., Boscariol Camargo R.L., Takita M.A., Machado M.A., Dos Soares Filho W.S., Costa M.G.C. Rootstock-induced molecular responses associated with drought tolerance in sweet orange as revealed by RNA-Seq. *BMC Genomics*. 2019;20(1):110. DOI 10.1186/s12864-019-5481-z

Ivanisenko V.A., Saik O.V., Ivanisenko N.V., Tiys E.S., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Kolchanov N.A. ANDSystem: an Associative Network Discovery System for automated literature mining in the field of biology. *BMC Syst. Biol*. 2015;9(Suppl. 2):S2. DOI 10.1186/1752-0509-9-S2-S2

Ivanisenko T.V., Saik O.V., Demenkov P.S., Khlestkin V.K., Khlestkina E.K., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. The SOLANUM TUBEROSUM knowledge base: the section on molecular-genetic regulation of metabolic pathways. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(1): 8-17. DOI 10.18699/VJ18.325 (in Russian)

Ivanisenko V.A., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Mishchenko E.L., Saik O.V. A new version of the ANDSystem tool for automatic extraction of knowledge from scientific publications with expanded functionality for reconstruction of associative gene networks by considering tissue-specific gene expression. *BMC Bioinformatics*. 2019; 20(Suppl. 1):34. DOI 10.1186/s12859-018-2567-6

Ivanisenko T.V., Saik O.V., Demenkov P.S., Ivanisenko N.V., Savostianov A.N., Ivanisenko V.A. ANDDigest: a new web-based module of ANDSystem for the search of knowledge in the scientific literature. *BMC Bioinformatics*. 2020;21(Suppl. 11):228. DOI 10.1186/s12859-020-03557-8

Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. The new version of the ANDDigest tool with improved ai-based short names recognition. *Int. J. Mol. Sci*. 2022a;23(23):14934. DOI 10.3390/ijms232314934

Ivanisenko V.A., Gaisler E.V., Basov N.V., Rogachev A.D., Cheresiz S.V., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Mishchenko E.L., Khripko O.P., Khripko Y.I., Voevoda S.M. Plasma metabolomics and gene regulatory networks analysis reveal the role of nonstructural SARS-CoV-2 viral proteins in metabolic dysregulation in COVID-19 patients. *Sci. Rep*. 2022b;12(1):19977. DOI 10.1038/s41598-022-24170-0

Jamet E., Albenne C., Boudart G., Irshad M., Canut H., Pont-Lezica R. Recent advances in plant cell wall proteomics. *Proteomics.* 2008; 8(4):893-908. DOI 10.1002/pmic.200700938

Javadi S.M., Shobbar Z.-S., Ebrahimi A., Shahbazi M. New insights on key genes involved in drought stress response of barley: gene networks reconstruction, hub, and promoter analysis. *J. Genet. Eng. Biotechnol*. 2021;19(1):2. DOI 10.1186/s43141-020-00104-z

Jia Y., Niu Y., Zhao H., Wang Z., Gao C., Wang C., Chen S., Wang Y. Hierarchical transcription factor and regulatory network for drought response in *Betula platyphylla*. *Hortic. Res*. 2022;9:uhac040. DOI 10.1093/hr/uhac040

Joshi R., Wani S.H., Singh B., Bohra A., Dar Z.A., Lone A.A., Pareek A., Singla-Pareek S.L. Transcription factors and plants response to drought stress: current understanding and future directions. *Front. Plant Sci*. 2016;7:1029. DOI 10.3389/fpls.2016.01029

Kohorn B.D., Kobayashi M., Johansen S., Riese J., Huang L.F., Koch K., Fu S., Dotson A., Byers N. An Arabidopsis cell wall-associated kinase required for invertase activity and cell growth. *Plant J*. 2006;46(2):307-316. DOI 10.1111/j.1365-313X.2006.02695.x

Kohorn B.D., Kohorn S.L. The cell wall-associated kinases, WAKs, as pectin receptors. *Front. Plant Sci*. 2012;3:88. DOI 10.3389/fpls.2012.00088

Kühn K., Yin G., Duncan O., Law S.R., Kubiszewski-Jakubiak S., Kaur P., Meyer E., Wang Y., Colas C., Giraud E., Narsai R., Whelan J. Decreasing electron flux through the cytochrome and/or alternative respiratory pathways triggers common and distinct cellular responses dependent on growth conditions. *Plant Physiol*. 2014; 167(1):228-2250. DOI 10.1104/pp.114.249946

Le Gall H., Philippe F., Domon J.M., Gillet F., Pelloux J., Rayon C. Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants*. 2015;4(1): 112-166. DOI 10.3390/plants4010112

Lee O.R., Kim S.J., Kim H.J., Hong J.K., Ryu S.B., Lee S.H., Ganguly A., Cho H.-T. Phospholipase A_2 is required for PIN-FORMED protein trafficking to the plasma membrane in the *Arabidopsis* root. *Plant Cell*. 2010;22(6):1812-1825. DOI 10.1105/tpc.110.074211

Lee S.B., Go Y.S., Bae H.J., Park J.H., Cho S.H., Cho H.J., Lee D.S., Park O.K., Hwang I., Suh M.C. Disruption of glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein gene altered cuticular lipid composition, increased plastoglobules, and enhanced susceptibility to infection by the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiol*. 2009;150(1):42-54. DOI 10.1104/pp.109.137745

Li Z., Li B., Zhao Y., Zhao D. Cloning and characterization of the *DIR1* promoter from *Eucommia ulmoides* Oliv and its response to hormonal and abiotic stress. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*. 2021;146: 313-322. DOI 10.1007/s11240-021-02070-x

Liu B., Wang X., Li K., Cai Z. Spatially resolved metabolomics and lipidomics reveal salinity and drought-tolerant mechanisms of cottonseeds. *J. Agric. Food Chem*. 2021;69(28):8028-8037. DOI 10.1021/acs.jafc.1c01598

Locci F., Benedetti M., Pontiggia D., Citterico M., Caprari C., Mattei B., Cervone F., De Lorenzo G. An Arabidopsis berberine bridge enzyme-like protein specifically oxidizes cellulose oligomers and plays a role in immunity. *Plant J.* 2019;98(3):540-554. DOI 10.1111/tpj.14237

Lu G., Paul A.L., McCarty D.R., Ferl R.J. Transcription factor veracity: is GBF3 responsible for ABA-regulated expression of Arabidopsis Adh? *Plant Cell*. 1996;8(5):847-857. DOI 10.1105/tpc.8.5.847

Mariani M.E., Fidelio G.D. Secretory phospholipases A_2 in plants. *Front. Plant Sci*. 2019;10:861. DOI 10.3389/fpls.2019.00861

Martinez D.E., Borniego M.L., Battchikova N., Aro E.M., Tyystjärvi E., Guiamét J.J. SASP, a Senescence-Associated Subtilisin Protease, is involved in reproductive development and determination of silique number in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot*. 2015;66(1):161-174. DOI 10.1093/jxb/eru409

Nazipova A., Gorshkov O., Eneyskaya E., Petrova N., Kulminskaya A., Gorshkova T., Kozlova L. Forgotten actors: glycoside hydrolases during elongation growth of maize primary root. *Front Plant Sci*. 2022;10(12):802424. DOI 10.3389/fpls.2021.802424

Noman M., Jameel A., Qiang W.D., Ahmad N., Liu W.C., Wang F.W., Li H.Y. Overexpression of *GmCAMTA12* enhanced drought tolerance in Arabidopsis and Soybean. *Int. J. Mol. Sci*. 2019;20(19): 4849. DOI 10.3390/ijms20194849

Novaković L., Guo T., Bacic A., Sampathkumar A., Johnson K. Hitting the wall-sensing and signaling pathways involved in plant cell wall remodeling in response to abiotic stress. *Plants.* 2018;7(4):89. DOI 10.3390/plants704008

Paniagua C., Bilkova A., Jackson P., Dabravolski S., Riber W., Didi V., Houser J., Gigli-Bisceglia N., Wimmerova M., Budínská E., Hamann T., Hejatko J. Dirigent proteins in plants: modulating cell wall metabolism during abiotic and biotic stress exposure. *J. Exp. Bot*. 2017;68(13):3287-3301. DOI 10.1093/jxb/erx141

Perera I.Y., Hung C.Y., Moore C.D., Stevenson-Paulik J., Boss W.F. Transgenic *Arabidopsis* plants expressing the type 1 inositol 5-phosphatase exhibit increased drought tolerance and altered abscisic acid signaling. *Plant Cell*. 2008;20(10):2876-2893. DOI 10.1105/tpc.108.061374

Ramegowda V., Gill U.S., Sivalingam P.N., Gupta A., Gupta C., Govind G., Nataraja K.N., Pereira A., Udayakumar M., Mysore K.S., Senthil-Kumar M. GBF3 transcription factor imparts drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep*. 2017;7(1):9148. DOI 10.1038/s41598-017-09542-1

Ritchie M.E., Phipson B., Wu D., Hu Y., Law C.W., Shi W., Smyth G.K. *limma* powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(7):e47. DOI 10.1093/nar/gkv007

Rose J.K., Braam J., Fry S.C., Nishitani K. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol*. 2002;43(12):1421-1435. DOI 10.1093/pcp/pcf171

Saik O.V., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Ivanisenko V.A. Interactome of the hepatitis C virus: Literature mining with ANDSystem. *Virus Res*. 2016;218:40-48. DOI 10.1016/j.virusres.2015.12.003

Saik O.V., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. Development of methods for automatic extraction of knowledge from texts of scientific publications for the creation of a knowledge base *Solanum Tuberosum*. *Agricultural Biol*. 2017; 52(1):63-74. DOI 10.15389/agrobiology.2017.1.63eng

Saik O.V., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Bragina E.Y., Freidin M.B., Goncharova I.A., Dosenko V.E., Zolotareva O.I., Hofestaedt R., Lavrik I.N., Rogaev E.I. Novel candidate genes important for asthma and hypertension comorbidity revealed from associative gene networks. *BMC Med. Genomics*. 2018a;11(1):61-76. DOI 10.1186/s12920-018-0331-4

Saik O.V., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Bragina E.Y., Freidin M.B., Dosenko V.E., Zolotareva O.I., Choynzonov E.L., Hofestaedt R., Ivanisenko V.A. Search for new candidate genes involved in the comorbidity of asthma and hypertension based on automatic analysis of scientific literature. *J. Integr. Bioinform*. 2018b;15(4):20180054. DOI 10.1515/jib-2018-0054

Saik O.V., Nimaev V.V., Usmonov D.B., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Lavrik I.N., Ivanisenko V.A. Prioritization of genes involved in endothelial cell apoptosis by their implication in lymphedema using an analysis of associative gene networks with ANDSystem. *BMC Med. Genomics*. 2019;12(Suppl. 2):117-131. DOI 10.1186/s12920-019-0492-9

Salminen T.A., Blomqvist K., Edqvist J. Lipid transfer proteins: classification, nomenclature, structure, and function. *Planta*. 2016; 244(5):971-997. DOI 10.1007/s00425-016-2585-4

San Clemente H., Jamet E. *WallProtDB*, a database resource for plant cell wall proteomics. *Plant Methods*. 2015;11(1):2. DOI 10.1186/s13007-015-0045-y

Schweikert C., Liszkay A., Schopfer P. Scission of polysaccharides by peroxidase-generated hydroxyl radicals. *Phytochemistry*. 2000; 53(5):565-570. DOI 10.1016/S0031-9422(99)00586-5

Seifert G.J. Fascinating fasciclins: A surprisingly widespread family of proteins that mediate interactions between the cell exterior and the cell surface. *Int. J. Mol. Sci*. 2018;19(6):1628. DOI 10.3390/ijms19061628

Shaik R., Ramakrishna W. Genes and co-expression modules common to drought and bacterial stress responses in *Arabidopsis* and rice. *PLoS One*. 2013;8(10):e77261. DOI 10.1371/journal.pone.0077261

Sharma V., Surolia A. Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. *J. Mol. Biol*. 1997;267(2):433-445. DOI 10.1006/jmbi.1996.0863

Shohat H., Eliaz N.I., Weiss D. Gibberellin in tomato: metabolism, signaling and role in drought responses. *Mol. Horticulture*. 2021;1(1): 15. DOI 10.1186/s43897-021-00019-4

Singh D., Laxmi A. Transcriptional regulation of drought response: a tortuous network of transcriptional factors. *Front. Plant Sci*. 2015; 6:895. DOI 10.3389/fpls.2015.00895

Söderman E., Mattsson J., Engström P. The *Arabidopsis* homeobox gene *ATHB-7* is induced by water deficit and by abscisic acid. *Plant J.* 1996;10(2):375-381. DOI 10.1046/j.1365-313X.1996.10020375.x

Taylor-Teeples M., Lin L., de Lucas M., Turco G., Toal T.W., Gaudinier A., Young N.F., Trabucco G.M., Veling M.T., Lamothe R., Handakumbura P.P., Xiong G., Wang C., Corwin J., Tsoukalas A., Zhang L., Ware D., Pauly M., Kliebenstein D.J., Dehesh K., Tagkopoulos I., Breton G., Pruneda-Paz J.L., Ahnert S.E., Kay S.A., Hazen S.P., Brady S.M. An *Arabidopsis* gene regulatory network for secondary cell wall synthesis. *Nature*. 2015;517(7536):571-575. DOI 10.1038/nature14099

Thamil Arasan S.K., Park J.I., Ahmed N.U., Jung H.J., Hur Y., Kang K.K., Lim Y.P., Nou I.S. Characterization and expression analysis of dirigent family genes related to stresses in *Brassica*. *Plant Physiol. Biochem*. 2013;67:144-153. DOI 10.1016/j.plaphy.2013.02.030

Van Holle S., De Schutter K., Eggermont L., Tsaneva M., Dang L., Van Damme E.J.M. Comparative study of lectin domains in model species: new insights into evolutionary dynamics. *Int. J. Mol. Sci*. 2017;18(6):1136. DOI 10.3390/ijms18061136

Wagner T.A., Kohorn B.D. Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. *Plant Cell*. 2001;13(2):303-318. DOI 10.1105/tpc.13.2.303

Xia X., Shao Y., Jiang J., Ren L., Chen F., Fang W., Guan Z., Chen S. Gene expression profiles responses to aphid feeding in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). *BMC Genomics*. 2014;15(1): 1050. DOI 10.1186/1471-2164-15-1050

Yamaguchi K., Takahashi Y., Berberich T., Imai A., Takahashi T., Michael A.J., Kusano T. A protective role for the polyamine spermine against drought stress in *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2007;352(2):486-490. DOI 10.1016/j.bbrc.2006.11.041

Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu. Rev. Plant Biol*. 2006;57(1):781-803. DOI 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105444

Yankina M.A., Saik O.V., Ivanisenko V.A., Demenkov P.S., Khusnutdinova E.K. Evaluation of prioritization methods of extrinsic apoptotic signaling pathway genes for retrieval of the new candidates associated with major depressive disorder. *Rus. J. Genet*. 2018;54:1366-1374. DOI 10.1134/S1022795418110170

Yoshida T., Fujita Y., Sayama H., Kidokoro S., Maruyama K., Mizoi J., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-

dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant J.* 2010;61(4):672-685. DOI 10.1111/j.1365-313X.2009.04092.x

Zhang Z., Wang N., Jiang S., Xu H., Wang Y., Wang C., Li M., Liu J., Qu C., Liu W., Wu S., Chen X., Chen X. Analysis of the xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene family during apple fruit ripening and softening. *J. Agric. Food Chem*. 2017;65(2):429-434. DOI 10.1021/acs.jafc.6b04536

Zhao K., Lin F., Romero-Gamboa S.P., Saha P., Goh H.J., An G., Jung K.H., Hazen S.P., Bartley L.E. Rice genome-scale network integration reveals transcriptional regulators of grass cell wall synthesis. *Front. Plant Sci.* 2019;10:1275. DOI 10.3389/fpls.2019.01275

Zhou M., Chen H., Wei D., Ma H., Lin J. *Arabidopsis* CBF3 and DELLAs positively regulate each other in response to low temperature. *Sci. Rep*. 2017;7(1):39819. DOI 10.1038/srep39819

ORCID
A.R. Volyanskaya orcid.org/0009-0003-8472-4945
E.A. Antropova orcid.org/0000-0003-2158-3252
U.S. Zubairova orcid.org/0000-0002-0730-9145
P.S. Demenkov orcid.org/0000-0001-9433-8341
A.S. Venzel orcid.org/0000-0002-7419-5168
A.A. Makarova orcid.org/0009-0005-1844-7921
T.V. Ivanisenko orcid.org/0000-0002-0005-9155
N.A. Kolchanov orcid.org/0000-0001-6800-8787
V.A. Ivanisenko orcid.org/0000-0002-1859-4631

Acknowledgements. The work of ARV, EAA, USZ, PSD, ASV, YuLO, AAM, TVI, NAK, and VAI was supported by the Russian-Chinese grant from the Russian Science Foundation No. 23-44-00030. The work of MCh was supported by National Natural Science Foundation of China (32261133526).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received August 1, 2023. Revised September 15, 2023. Accepted September 18, 2023.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023;27(8):1042-1052
DOI 10.18699/VJGB-23-119

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

InterTransViewer: сравнительное описание профилей дифференциальной экспрессии генов из разных экспериментов

А.В. Тяпкин[1, 2], В.В. Лавреха[1, 2], Е.В. Убогоева[1], Д.Ю. Ощепков[1], Н.А. Омельянчук[1], Е.В. Землянская[1, 2]

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия
ezemlyanskaya@bionet.nsc.ru

Аннотация. В настоящее время в связи со стремительным ростом количества полногеномных экспериментов по изучению изменения экспрессии генов в различных условиях все более широкое распространение получают методы метаанализа транскриптомных данных из разных экспериментов, так как интеграция данных может обеспечить большую точность в выявлении генов-кандидатов и позволяет тестировать новые гипотезы, которые невозможно было проверить в отдельных исследованиях. Для повышения информативности такой интеграции необходимо оптимизировать подбор экспериментов. В настоящей работе мы предлагаем набор количественных показателей для всестороннего сравнительного описания транскриптомных данных. Эти показатели легко могут быть визуализированы и интерпретированы. Они включают в себя количество дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), долю специфических (уникальных) ДЭГ в каждом наборе данных, попарное сходство экспериментов по составу ДЭГ, оценку однородности профилей дифференциально экспрессирующихся генов. Для автоматического вычисления и визуализации этих показателей мы разработали программу InterTransViewer. Мы применили InterTransViewer для сравнительного описания транскрипционных ответов на обработку фитогормонами у модельного растения *Arabidopsis thaliana* L., взяв в анализ 23 единообразно обработанных профиля дифференциальной экспрессии генов в ответ на ауксин и 16 профилей дифференциальной экспрессии, индуцированных этиленом или его предшественником – 1-аминоциклопропановой кислотой. Мы продемонстрировали, что комплексное рассмотрение характеристик отдельных профилей ДЭГ в контексте результатов попарных сравнений профилей по составу ДЭГ позволяет позиционировать эксперименты в контексте друг друга, оценивать тенденцию к их интеграции или сегрегации, генерировать гипотезы о влиянии весомых нецелевых факторов на исследуемый транскрипционный ответ. В результате это дает возможность выделять потенциально однородные группы экспериментов. Последующий анализ однородности этих групп профилей с помощью процедуры ресемплинга и установления порога уровня значимости помогает принять решение о целесообразности использования этих данных для метаанализа. В целом InterTransViewer позволяет эффективно формировать выборки экспериментов в зависимости от задачи и методов метаанализа.
Ключевые слова: транскриптом; интеграция данных; ауксин; этилен; *Arabidopsis thaliana* L.

Для цитирования: Тяпкин А.В., Лавреха В.В., Убогоева Е.В., Ощепков Д.Ю., Омельянчук Н.А., Землянская Е.В. InterTransViewer: сравнительное описание профилей дифференциальной экспрессии генов из разных экспериментов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(8):1042-1052. DOI 10.18699/VJGB-23-119

InterTransViewer: a comparative description of differential gene expression profiles from different experiments

A.V. Tyapkin[1, 2], V.V. Lavrekha[1, 2], E.V. Ubogoeva[1], D.Yu. Oshchepkov[1], N.A. Omelyanchuk[1], E.V. Zemlyanskaya[1, 2]

[1] Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
ezemlyanskaya@bionet.nsc.ru

Abstract. Meta-analysis of transcriptomic data from different experiments has become increasingly prevalent due to a significantly increasing number of genome-wide experiments investigating gene expression changes under various conditions. Such data integration provides greater accuracy in identifying candidate genes and allows testing new hypotheses, which could not be validated in individual studies. To increase the relevance of experiment integration, it is necessary to optimize the selection of experiments. In this paper, we propose a set of quantitative indicators for a comprehensive comparative description of transcriptomic data. These indicators can be easily visualized and interpreted. They include the number of differentially expressed genes (DEGs), the proportion of experiment-specific (unique) DEGs in each data set, the pairwise similarity of experiments in DEG composition and the homogeneity of DEG profiles. For automatic calculation and visualization of these indicators, we have developed the program InterTransViewer. We have used InterTransViewer to comparatively describe 23 auxin- and 16 ethylene- or 1-aminocyclopropane-1-carboxy-

© Тяпкин А.В., Лавреха В.В., Убогоева Е.В., Ощепков Д.Ю., Омельянчук Н.А., Землянская Е.В., 2023
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

lic acid (ACC)-induced transcriptomes in *Arabidopsis thaliana* L. We have demonstrated that analysis of the characteristics of individual DEG profiles and their pairwise comparisons based on DEG composition allow the user to rank experiments in the context of each other, assess the tendency towards their integration or segregation, and generate hypotheses about the influence of non-target factors on the transcriptional response. As a result, InterTransViewer identifies potentially homogeneous groups of experiments. Subsequent estimation of the profile homogeneity within these groups using resampling and setting a significance threshold helps to decide whether these data are appropriate for meta-analysis. Overall, InterTransViewer makes it possible to efficiently select experiments for meta-analysis depending on its task and methods.
Key words: transcriptome; data integration; auxin; ethylene; *Arabidopsis thaliana* L.

For citation: Tyapkin A.V., Lavrekha V.V., Ubogoeva E.V., Oshchepkov D.Yu., Omelyanchuk N.A., Zemlyanskaya E.V. InterTransViewer: a comparative description of differential gene expression profiles from different experiments. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(8):1042-1052. DOI 10.18699/VJGB-23-119

Введение

На сегодняшний день анализ дифференциальной экспрессии генов в различных условиях – это один из важнейших подходов к исследованию генетической регуляции формирования признаков (Stelpflug et al., 2016; Tello-Ruiz et al., 2016). Стремительный рост количества экспериментов по полногеномному профилированию экспрессии генов в различных условиях и доступность их результатов в базах данных по функциональной геномике, таких как Gene Expression Omnibus (GEO) (Clough, Barrett, 2016) или BioStudies (Sarkans et al., 2021), открывают широкий простор для сравнительного анализа результатов экспериментов из различных исследований с целью их обобщения с помощью методов метаанализа (Cahan et al., 2007; Rung, Brazma, 2013; Keel, Lindholm-Perry, 2022). Такой подход позволяет не только определять наиболее надежные дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ), стабильно определяющиеся в независимых исследованиях (Freire-Rios et al., 2020), но и увеличивать выборку образцов с целью выявления слабых закономерностей (Bairakdar et al., 2023) или тестирования гипотез, которые невозможно было исследовать в одиночных работах (Sudmant et al., 2015; Winter et al., 2019).

Для успешной интеграции данные должны удовлетворять определенным критериям (Cahan et al., 2007; Rung, Brazma, 2013; Yu, Zeng, 2018). В первую очередь, они должны быть исчерпывающе описаны в соответствии с установленными минимальными требованиями к описанию транскриптомных экспериментов (Brazma et al., 2001; Brazma, 2009). Кроме того, объединяемые эксперименты должны исследовать аналогичные гипотезы о влиянии одного и того же фактора. При этом следует избегать или корректировать так называемый пакетный эффект (batch effect), когда нецелевые факторы (биологические характеристики объекта, условия проведения эксперимента, протокол пробоподготовки, выбор платформы для получения данных и пр.) влияют на результаты конкретного эксперимента.

Простая фильтрация данных по экспериментальным условиям не всегда обеспечивает оптимальный выбор данных для метаанализа. С одной стороны, весомый нецелевой фактор может отсутствовать в описании данных, в результате формальное совпадение условий экспериментов не исключает пакетного эффекта. С другой стороны, результаты экспериментов, выполненных в неидентичных условиях, могут быть достаточно хорошо согласованы. Сравнительное описание транскриптомных данных из разных экспериментов позволяет оптимизировать выбор данных и методов для их предобработки. Однако до сих пор для этой процедуры не разработан стандарт, а также существенно ощущается нехватка программных средств, в особенности для графического представления результатов. Например, программа MetaQC, применяемая для оценки качества микрочипов, оценивает шесть количественных метрик: (1) воспроизводимость коэкспрессирующихся групп генов в различных экспериментах; (2) согласованность паттерна коэкспрессии известных генов с базами данных метаболических и сигнальных путей (т. е. участие генов в одном процессе); (3–4) точность выявления обогащения группы ДЭГ в терминах генной онтологии (т. е. участие генов в процессах, связь с клеточными компонентами или молекулярными функциями) и их согласованность в разных экспериментах; 5) правильность определения известных биомаркеров; 6) согласованность ранжирования ДЭГ между транскриптомами (Kang et al., 2012). Однако MetaQC не позволяет визуализировать эти метрики, и некоторые из метрик качества опираются на внешние базы данных и известные маркеры, а не на внутренние характеристики профилей экспрессии, что может затенять малоизученные процессы и усложнять анализ для немодельных видов.

Другая программа, ViDGER, созданная для упрощения интерпретации данных экспериментов по секвенированию РНК, предоставляет широкий спектр визуализаций, но не предлагает удобных средств для сравнения профилей ДЭГ (McDermaid et al., 2019). В программе NetworkAnalyst 3.0 акцент сделан на реконструкцию сетей межбелковых взаимодействий, но она также предусматривает некоторую возможность визуального сравнения списков генов с помощью интерактивных тепловых карт, сетей обогащения, диаграмм Венна и хордовых диаграмм (Zhou et al., 2019).

В настоящей работе мы предлагаем набор показателей для всестороннего сравнительного описания профилей ДЭГ, которые легко могут быть визуализированы и интерпретированы. Они характеризуют отдельные профили дифференциальной экспрессии, их попарное сходство и тенденцию к интеграции или сегрегации. Для автоматического вычисления и визуализации этих показателей мы разработали программу InterTransViewer, которую применили для сравнительного описания транскрипционных ответов на обработку фитогормонами ауксином (23 профиля ДЭГ из 16 исследований) и этиленом (16 профилей ДЭГ из восьми исследований) у модельного вида растений *Arabidopsis thaliana* L.

Материалы и методы

Характеристики отдельных профилей дифференциальной экспрессии. Для каждого индивидуального списка ДЭГ мы оценивали: 1) количество ДЭГ, 2) долю ДЭГ, специфичных для данного списка, а также 3) отношение доли специфических ДЭГ к доле ДЭГ данного списка среди генов, идентифицированных как ДЭГ хотя бы в одном из анализируемых списков:

$$R_i = \frac{\delta_i \cdot N}{n_i},$$

где R_i – отношение долей для списка i; δ_i – доля ДЭГ, специфичных для списка i; n_i – количество ДЭГ в списке i; N – количество ДЭГ в общем списке. Вычисленные показатели графически представляются в виде зеркальных гистограмм. Они в совокупности с метаданными экспериментов позволяют в первом приближении оценить сходство списков и определить потенциальные выбросы. Например, слишком малое/большое количество ДЭГ или высокое значение R, которое не коррелирует со специфическими условиями эксперимента или биологическими свойствами объекта, может свидетельствовать о влиянии неизвестного весомого нецелевого фактора или о низком качестве данных.

Попарные сравнения профилей дифференциальной экспрессии по составу ДЭГ. Если список ДЭГ меньшего размера вложен в другой список ДЭГ большего размера, и отклонение размера каждого списка от среднего незначительно или коррелирует со специфическими условиями эксперимента или биологическими свойствами объекта, мы считаем, что результаты двух экспериментов консистентны. Чтобы оценить сходство двух профилей с учетом этого условия, для каждой пары списков ДЭГ мы рассчитали индекс сходства I следующим образом:

$$I = \frac{c}{\min\{a, b\} + c},$$

где c – это количество общих ДЭГ между списками; a – количество ДЭГ, представленных в первом списке и отсутствующих во втором; b – количество ДЭГ, представленных во втором списке и отсутствующих в первом. Таким образом, индекс сходства I отражает долю общих ДЭГ в меньшем списке. Индекс сходства может принимать значения от нуля до единицы, при этом ноль соответствует отсутствию общих ДЭГ в двух списках, а единица – полному вложению одного списка в другой. Матрицы сходства списков ДЭГ визуализируются в виде тепловой карты, на основании которой можно не только сделать вывод о сходстве профилей экспрессии по составу ДЭГ, но и выделить отдельные группы наиболее сходных экспериментов.

Кластеризация профилей дифференциальной экспрессии. Матрица сходства, описанная выше, сопоставляет списки ДЭГ, не учитывая величину изменения уровней экспрессии генов. Чтобы выявлять группы сходных профилей дифференциальной экспрессии с учетом этой величины, мы использовали иерархическую кластеризацию на основании матрицы евклидовых расстояний в пространстве $\log_2$-трансформированных значений изменения уровней экспрессии генов, идентифицируемых как ДЭГ хотя бы в одном из анализируемых списков, без учета значимости этих изменений. Предварительно эти значения были нормированы на диапазон разброса в каждом эксперименте и стандартизованы для каждого гена, что позволило сравнивать профили транскрипционного ответа из разных экспериментов. Иерархическую кластеризацию осуществляли с помощью функции Bclast из пакета shipunov v.1.17.1 (https://CRAN.R-project.org/package=shipunov), применяя метод Ward.D2, основанный на минимизации суммы квадратов евклидовых расстояний между каждым объектом кластера и центроидом кластера.

Количественная оценка однородности группы профилей по составу ДЭГ. Пусть A – множество генов, идентифицируемых как ДЭГ хотя бы в одном из m анализируемых списков, а количество этих генов $|A| = N$. Множество A включает в себя: 1) ДЭГ, изменение уровня экспрессии которых в заданной выборке из m списков определяется преимущественно действием целевого фактора, а также 2) гены, изменение уровня экспрессии которых существенно зависит от нецелевых факторов. Очевидно, что, если вычислить значение N_k для подвыборки из k списков ($k < m$) и далее вычислять значения N_{k+i}, добавляя к этой подвыборке по одному списку, то величина N_{k+i} должна не убывать с ростом i. При этом чем более неоднороден исследуемый набор профилей ДЭГ (чем больше он содержит списков, сформированных под влиянием различающихся нецелевых факторов), тем сильнее будет рост величины N_{k+i}.

Используя ресемплинг, мы создали $m - 1$ наборов псевдовыборок списков ДЭГ: в одном наборе i ($i \in \mathbb{N}$, $i = [1; m - 1]$) каждая псевдовыборка состояла из $k_i < m$ списков ДЭГ ($k_1 = m - 1$, $k_{i+1} = k_i - 1$), чтобы оценить, при каком значении k_i будет наблюдаться значимое снижение N_{ki} по сравнению с N_m. Для формирования одной псевдовыборки из оригинального набора списков ДЭГ, состоящего из m элементов, мы случайным образом выбирали с возвращением k_i списков (рис. 1), для которых далее определяли количество генов N_{kij}, идентифицируемых как ДЭГ хотя бы в одном из k_i списков (индекс j обозначает номер псевдовыборки в одном наборе). Одновременно мы создавали псевдовыборку из m списков и рассчитывали соответствующее значение N_{mj}, после чего вычисляли разность $d_j = N_{mj} - N_{kij}$ (см. рис. 1). В результате 5000 итераций ($j \in \mathbb{N}$, $j = [1; 5000]$) формировался вариационный ряд этих разностей. Доверительный интервал определяли методом процентилей (Rousselet et al., 2021). Если при каких-то значениях k_i наблюдалась значимая разница между N_m и N_{ki}, анализируемый набор профилей считали неоднородным. Распределение значений d визуализировали в виде гистограммы.

Программная реализация InterTransViewer. Программа InterTransViewer реализована в виде скрипта на языке R (v.4.1.2) и доступна по ссылке (https://github.com/al-t1/InterTransViewer0/). InterTransViewer принимает на вход таблицу, в которой первый столбец содержит одну группирующую переменную (идентификаторы генов, ID), а каждая следующая пара столбцов содержит $\log_2$-трансформированные значения изменений уровней экспрессии генов (logFC) и соответствующие им скорректированные значения p (p-adjusted) для отдельного эксперимента. Если пользователь осуществляет предобработку сырых транскриптомных данных самостоятельно, такая таблица может

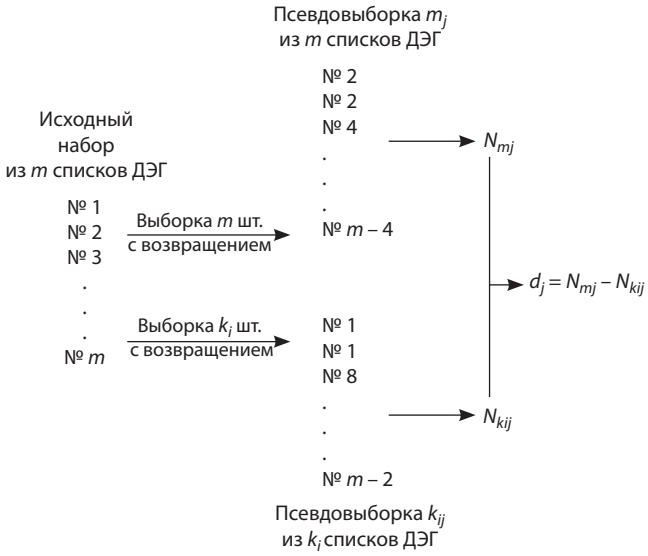


Рис. 1. Процедура создания двух псевдовыборок, каждая из которых состоит из m и k_i ($k_i < m$) случайно выбранных списков ДЭГ с возвращением, и определения разницы d_j между количеством генов, идентифицируемых как ДЭГ хотя бы в одном из m и k_i списков (N_{mj} и N_{kij} соответственно).

Индекс j обозначает номер псевдовыборки. Операцию повторяли 5000 раз ($j \in \mathbb{N}$, j = [1; 5000]), генерируя таким образом распределение значений d, что позволяло оценить значимость различия значений N в псевдовыборках. Такая процедура повторялась для каждого значения k_i ($k_1 = m - 1$; $k_{i+1} = k_i - 1$, где $i \in \mathbb{N}$, i = [1; m – 1]).

быть собрана с использованием функции InterTransViewer DEGweave для объединения результатов, сгенерированных функцией topTable limma и/или функцией results пакета DESeq2 в процессе предобработки сырых данных микрочипов и РНК-секвенирования соответственно. Желательно, чтобы предварительная обработка сырых данных была выполнена максимально единообразно для каждой технологической платформы, а также чтобы дизайн каждого эксперимента предусматривал как минимум по две биологические реплики для контрольных и опытных образцов.

На этапе контроля качества данных рекомендуется обращать особое внимание на разброс данных для реплик: например, для микрочипов с использованием функции plotMDS пакета limma (Ritchie et al., 2015); с помощью программ fastQC и fastp для сырых данных секвенирования РНК (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/; Chen et al., 2018) и с использованием функции plotPCA пакета DESeq2 (Love et al., 2014) для матрицы количества прочтений, соответствующих гену. Необходимо, чтобы все профили дифференциальной экспрессии отражали действие одного целевого фактора. Формально профиль дифференциальной экспрессии подойдет для анализа с помощью InterTransViewer, если в нем есть хотя бы один ДЭГ для установленного уровня значимости, однако рекомендуется более жестко ограничивать этот параметр, выбирая в качестве порогового значения не менее 10.

Вычисление показателей для сравнительного описания профилей ДЭГ и их визуализация реализованы в виде функций, описанных в документации программы InterTransViewer. Например, количество ДЭГ, долю эксперимент-специфичных ДЭГ и отношение R_i для всех экспериментов можно получить с помощью функции DEGsummary, после чего представить результаты в виде столбчатых диаграмм с использованием функций TotalSpecPlot и RmetricPlot. Функция GetSimMatrix позволяет получить матрицу сходства I. Функция DE_bootstrap дает возможность проводить ресемплинг по описанной выше методике. Иерархическая кластеризация выполняется с помощью функции DE_clustering.

В результате работы программа генерирует широкий спектр выходных данных. Для каждого эксперимента формируются две таблицы, содержащие список ДЭГ (для заданного порогового значения p-adj и, если необходимо, logFC) и список эксперимент-специфичных ДЭГ с указанием logFC и p-adj. Также сохраняются общий список генов, которые являются ДЭГ хотя бы в одном эксперименте с указанием количества экспериментов, в которых ген определен как ДЭГ; сводная таблица, сгенерированная функцией DEGsummary, и соответствующие гистограммы; матрица сходства I и тепловая карта; дендрограммы, полученные при кластеризации; таблицы и диаграммы с результатами ресемплинга для оценки однородности наборов профилей дифференциальной экспрессии.

Транскриптомные данные из открытых источников. Мы собрали все доступные в открытых базах транскриптомные данные по обработке *A. thaliana* фитогормонами ауксином, этиленом, их предшественниками или синтетическими аналогами. Из них мы отобрали транскриптомы целых проростков или отдельных органов растений дикого типа, в которых обработки гормонами были дополнены контрольными экспериментами (псевдообработка или отсутствие обработки). Чтобы сделать возможным последующий сравнительный анализ, мы осуществили единообразную предобработку сырых данных. Данные микрочип-экспериментов были загружены из базы данных GEO (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/). Данные секвенирования РНК были взяты из базы данных NCBI Sequence Read Archive (SRA) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/). Последовательность генома *A. thaliana* и его аннотация (TAIR 10) были загружены из Ensembl Plants (https://plants.ensembl.org/index.html, release 52).

Все собранные микрочип-эксперименты выполнены на платформе ATH1. Нормировка сырых данных микрочипов и определение ДЭГ осуществлялись с помощью пакета limma v.3.52.4 (Ritchie et al., 2015). Для контроля качества данных секвенирования РНК использована программа FastQC v.0.11.9 (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Прочтения, полученные на платформе Illumina, подвергались триммингу и фильтрации по качеству с помощью программы fastp v.0.23.2 (Chen et al., 2018), запускаемой со следующими параметрами: -q 20 -u 30 -5 -3 -W 4 -M 20, после чего выполнялось выравнивание прочтений на геном *A. thaliana* с применением HISAT2 v.2.2.1 (Kim et al., 2019). Прочтения SOLiD выравнивались на геном с помощью программы TopHat (Kim et al., 2013). Для подсчета числа уникально картированных прочтений использовали функцию summarizeOverlaps из пакета GenomicAlignments R v.1.30.0

Данные микрочип-экспериментов и РНК-секвенирования, использованные в исследовании

№ эксперимента	Название эксперимента	Тип	Ткань, стадия развития	Обработка (концентрация, время)	Число реплик	Литературный источник
			Ауксин			
1	ERP021928	P	Меристема и молодые цветы до и во время 10-й стадии	10 мкМ ИУК, 0.5 ч	3	Simonini et al., 2017
2, 4, 9	GSE18975	M	7-дневные проростки	1 мкМ ИУК, 0.5 ч; 1 мкМ ИУК, 1 ч; 1 мкМ ИУК, 3 ч	3	Delker et al., 2010
3	SRP258689	P	Корни 3-дневных проростков	1 мкМ ИУК, 1 ч	3	Freire-Rios et al., 2020
5, 15	GSE3350	M	Корни без корневого апекса 3-дневных проростков, выращенных на среде MS с 10 мкМ НФК	10 мкМ НУК, 2 ч; 10 мкМ НУК, 6 ч	2	Vanneste et al., 2005
6	GSE35580	M	Корни 7-дневных проростков	5 мкМ ИУК, 2 ч	3	Bargmann et al., 2013
7, 16	GSE42896	M	Корни без корневого апекса 3-дневных проростков, выращенных на среде MS с 10 мкМ НФК	10 мкМ НУК, 2 ч; 10 мкМ НУК, 6 ч	3	De Rybel et al., 2012
8	GSE627	M	7-дневные проростки	5 мкМ ИУК, 2 ч	3	Okushima et al., 2005
10	GSE58028	M	7- и 8-дневные проростки	1 мкМ ИУК, 3 ч	3	
11	SRP033494	P	Корни 7-дневных проростков	5 мкМ ИУК, 4 ч	2	Chaiwanon, Wang, 2015
12, 18, 19, 21	GSE42007	M	Корни 6-дневных проростков	1 мкМ ИУК, 4 ч; 1 мкМ ИУК, 8 ч; 1 мкМ ИУК, 12 ч; 1 мкМ ИУК, 24 ч	3	Lewis et al., 2013
13	GSE7432	M	Корни 3-дневных этиолированных проростков	1 мкМ ИУК, 4 ч	2	Stepanova et al., 2007
14	SRP102803	P	Корни 3-дневных проростков	1 мкМ ИУК, 6 ч	3	Omelyanchuk et al., 2017
17	GSE59426	M	Кончики корней 3-дневных проростков	10 мкМ М ИМК, 6 ч	3	Xuan et al., 2015
20	GSE59741	M	Пазушные почки листьев 21- и 28-дневных проростков	1 мкМ НУК, 18 ч	3	Müller et al., 2015
22	SRP074436	P	Апексы побегов и пазушные меристемы 14-дневных проростков	5 мкМ 2,4-Д, 55 ч	3	Mozgová et al., 2017
23	GSE179303	M	Листья одинакового размера и стадии развития	23 мМ 2,4-Д, 72 ч после обработки (опрыскивание)	3	Romero-Puertas et al., 2022
			Этилен			
11, 12	SRP118634	P	4-дневные проростки	10 мкМ АЦК, 2 ч; 10 мкМ АЦК, 4 ч	3	Fu et al., 2021
1, 2, 6, 7	SRA063695	P	3-дневные этиолированные проростки	10 млн$^{-1}$ этилен газ, 4 ч* 10 млн$^{-1}$ этилен газ, 12 ч 10 млн$^{-1}$ этилен газ, 24 ч	3	Chang et al., 2013
3	SRP069072	P	3-дневные этиолированные проростки	10 млн$^{-1}$ этилен газ, 4 ч	2	Zhang et al., 2016a
4, 8	SRP076862	P	Корни и побеги 3-дневных этиолированных проростков отдельно	10 млн$^{-1}$ этилен газ, 4 ч	2	Zhang et al., 2016b
5	SRP168223	P	3-дневные этиолированные проростки	Этилен газ, 4 ч	2	Zander et al., 2019
9	GSE7432	M	Корни 3-дневных этиолированных проростков	10 млн$^{-1}$ этилен газ, 4 ч	2	Stepanova et al., 2007
10	SRP126162	P	Корни 6-дневных проростков	10 млн$^{-1}$ этилен газ, 4 ч	2	Feng et al., 2017
13, 14, 15, 16	GSE84446	M	Корни 6-дневных проростков	1 мкМ АЦК, 4 ч; 1 мкМ АЦК, 8 ч; 1 мкМ АЦК, 12 ч; 1 мкМ АЦК, 24 ч	3	Harkey et al., 2018

* 1, 2 – эксперименты по обработке этиленом с одинаковыми условиями.
Количество биологических реплик, доступных для каждого образца и используемых для идентификации ДЭГ, указано в шестом столбце. Для обнаружения ДЭГ в экспериментах № 2, 4, 5, 7, 9, 16, 17, 22, 23 с ауксином и № 1, 2, 6, 7 с этиленом использовали необработанные контрольные образцы, собранные в начальный момент времени; в остальных случаях для каждого эксперимента были доступны отдельные ложно-обработанные контрольные образцы.
P – РНК-секвенирование; M – микрочип эксперимент; 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; НФК – нафтил-фталаминовая кислота; ИУК – индол-3-уксусная кислота; НУК – 1-нафталинуксусная кислота; ИМК – индол-3-масляная кислота.

(Lawrence et al., 2013) и файл с аннотацией генома *A. thaliana*. Определение ДЭГ выполняли с помощью пакета DESeq2 v.1.34.0 (Love et al., 2014). Для каждого набора данных (как микрочипов, так и РНК-секвенирования) мы применяли поправку на множественное тестирование гипотез по методу Бенджамини–Хохберга (Benjamini, Hochberg, 1995) для контроля доли ложно-положительных результатов (false discovery rate, FDR) при определении дифференциально экспрессирующихся генов. Чтобы детектировать ДЭГ, мы использовали порог FDR, равный 0.05. В результате мы получили 23 списка ДЭГ после обработки ауксином и 16 – после обработки этиленом, в каждом из которых было не менее 300 ДЭГ (см. таблицу).

Результаты и обсуждение

В этой работе мы приводим пример использования InterTransViewer для сравнительного описания профилей дифференциальной экспрессии генов, отражающих транскрипционный ответ на фитогормоны у *A. thaliana*. Для анализа мы отобрали 23 профиля ауксин-индуцированной дифференциальной экспрессии генов из 16 различных исследований и 16 профилей дифференциальной экспрессии, индуцированной этиленом или его предшественником, 1-аминоциклопропановой кислотой (АЦК), из 8 исследований (см. таблицу и раздел «Материалы и методы»).

Рисунок 2 схематично иллюстрирует метаданные для каждого профиля дифференциально экспрессирующихся генов. Видно, что несмотря на общность исследуемого фактора, экспериментальные условия, в которых профили были получены, неоднородны. В частности, различались химическая природа активного вещества, его концентрация, способ и длительность обработки, условия выращивания растений, их возраст в момент сбора образцов, состав образцов, методы профилирования экспрессии. Только два ауксин-индуцированных профиля ДЭГ (№ 9 и 10) из двух исследований и три этилен-индуцированных профиля ДЭГ (№ 1, 2 и 3) также из двух исследований были получены в сходных условиях, согласно метаданным. Таким образом, целью дальнейшего сравнительного анализа стало исследование однородности фитогормон-индуцированных профилей ДЭГ в зависимости от условий, в которых они были получены.

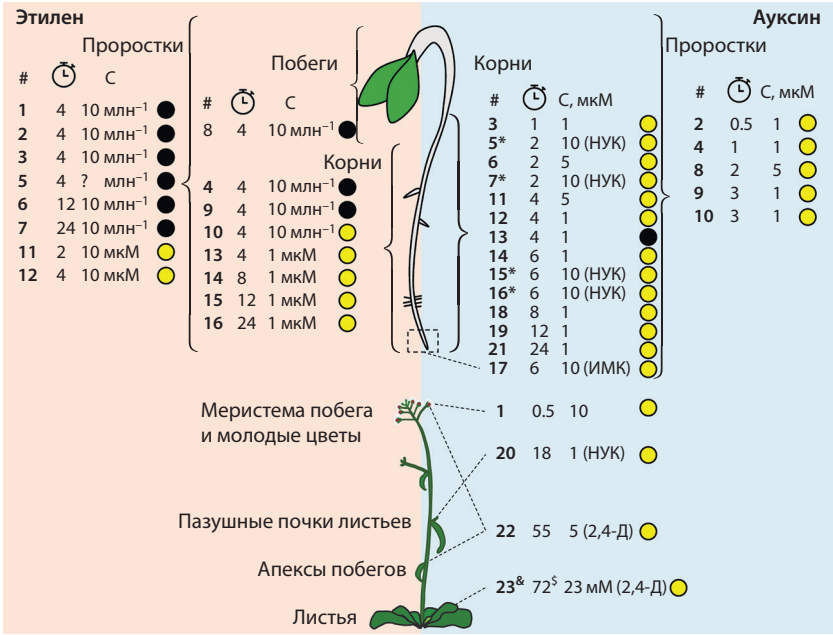


Рис. 2. Схематичное представление экспериментальных условий, в которых получены профили ДЭГ, выбранные для сравнительного анализа.

Звездочкой обозначен сегмент корня между апикальной меристемой корня и корневой шейкой (соединением корень-гипокотиль). Этилен применяли либо в виде газа (концентрация в частях на миллион), либо в виде его биологического предшественника АЦК (мкМ). Ауксин использован в форме ИУК, иначе указано. НУК – 1-нафталинуксусная кислота; ИМК – индолил-3-масляная кислота; 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота. Длительность обработки приведена в часах. Числа, выделенные жирным шрифтом, обозначают номера экспериментов из таблицы. С – концентрация гормона; черные кружки – этиолированные проростки; желтые кружки – проростки, выращенные на свету; & – опрыскивание; $ – после обработки; ? – концентрация газообразного этилена в первоисточнике не указана.

Ауксин- и этилен-индуцированные профили ДЭГ вариабельны по количеству ДЭГ

Прежде всего, мы охарактеризовали отдельные списки ДЭГ с помощью функции DEGsummary. Ауксин- и этилен-индуцированные профили ДЭГ оказались неоднородны по количеству ДЭГ: этот показатель варьировал от 410 до 11 966 в ауксин-индуцированных профилях (медианное значение 3205) и от 379 до 5253 – в этилен-индуцированных профилях (медианное значение 1428) (рис. 3, *а*, *б*). Отклонение количества ДЭГ от значения медианы в большинстве случаев можно было объяснить специфическими условиями проведения экспериментов. Так, низкое количество ауксин-чувствительных ДЭГ наблюдалось в меристеме побега и молодых цветах после кратковременной обработки ауксином (№ 1; 586 ДЭГ), а также в корне при длительной обработке (24 ч) ауксином низкой концентрации (1 мкМ) в форме индол-3-уксусной кислоты (ИУК) (№ 21; 686 ДЭГ). Низкое количество ДЭГ в последнем случае связано с тем, что при ответе на ауксин пик изменений транскрипционной активности наблюдается при длительности обработки от 2 до 8 ч, в то время как при увеличении времени обработки до 12–24 ч транскрипционная активность большинства генов возвращается к уровню, наблюдаемому в контрольных (без обработки ауксином) образцах, а число генов с измененным уровнем транскрипции становится близким к числу генов при кратковременных (1 ч) обработках ауксином (Lewis et al., 2013). Высокое количество ДЭГ (№ 22, 11 966 ДЭГ) было характерно для продолжительной обработки в течение 55 ч 5 мкМ 2,4-Д кончиков побегов и пазушных меристем с целью инициации каллусообразования, которое сопровождается значительным перепрограммированием транскрипционной активности генома (Xu et al., 2012).

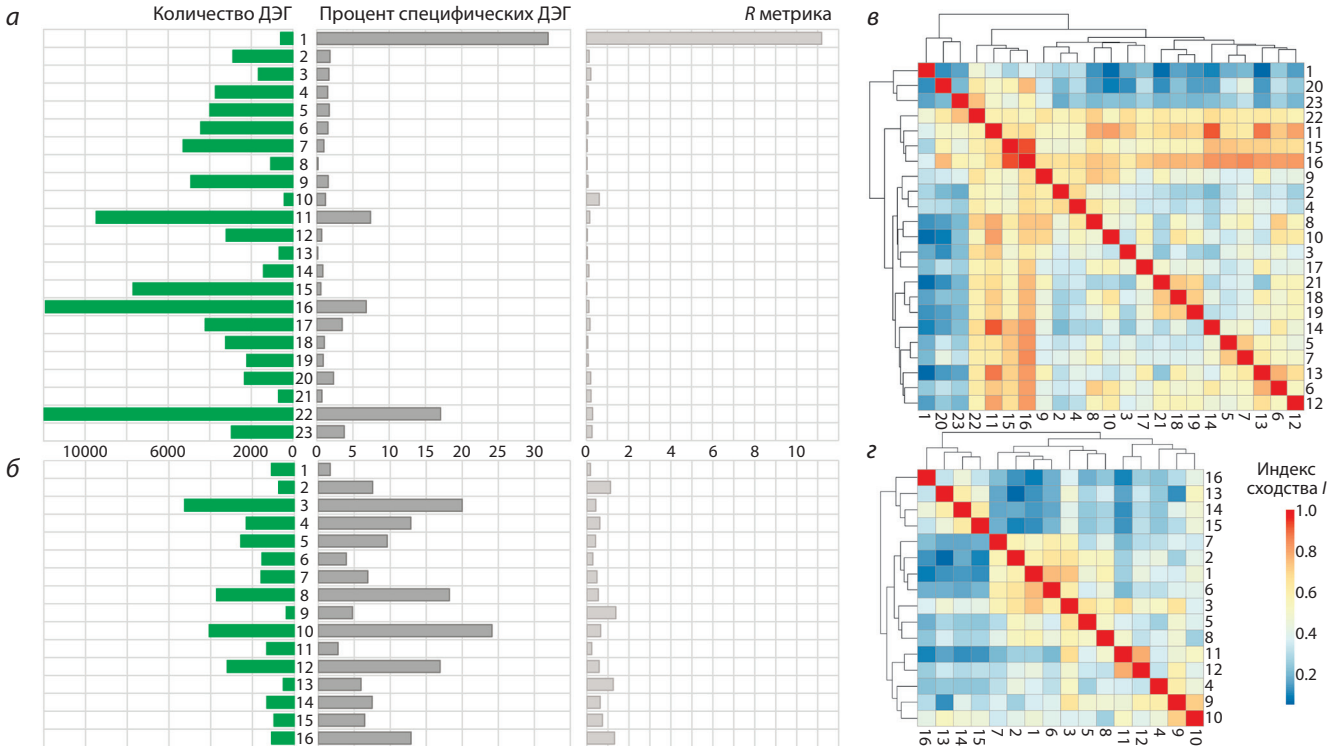


Рис. 3. Сравнительное описание транскрипционного ответа на ауксин и этилен в различных условиях у *A. thaliana*.

а, *б* – количество ДЭГ и доля специфических (уникальных) ДЭГ в наборах данных по ауксину (*а*) и этилену (*б*), а также *R* метрика для каждого набора данных; *в*, *г* – попарное сравнение экспериментов с ауксином (*в*) и экспериментов с этиленом (*г*). Индекс сходства *I*, отражающий долю общих ДЭГ в меньшем списке, описан в разделе «Материалы и методы». Номера экспериментов соответствуют номерам в таблице.

Достаточно большое количество ДЭГ наблюдалось и при менее продолжительной обработке проростков 5–10 мкМ ИУК в течение 4–6 ч, что соответствует пику изменений транскрипционной активности при ответе на ауксин (Lewis et al., 2013). Необходимо отметить, что большое количество ДЭГ наблюдалось в транскриптомах целых корней или корней без кончика корня с большим разнообразием тканей (№ 11, 15 и 16; 9461, 7692 и 11 905 ДЭГ соответственно). Если исследовали, наоборот, только кончик корня (№ 17), то число ДЭГ уменьшалось до 4214, что можно объяснить достаточной биологической однородностью материала (колумелла, ниша стволовых клеток и первые потомки инициалей).

Следует отметить высокое значение отношения *R* для профиля ДЭГ меристемы побега и молодых цветов (№ 1), что свидетельствует о специфическом по составу ДЭГ транскрипционном ответе на ауксин в этих органах по сравнению со всеми остальными представленными в исследовании. Причиной существенного отклонения количества ДЭГ от медианы в профиле № 10 (410 ДЭГ) мог быть стресс из-за резкой смены условий выращивания проростков, когда перед обработкой ауксином проростки, выращенные в течение 6–7 дней на агаризованной среде, помещали на сутки в жидкую среду с постоянным перемешиванием на шейкере. В такой ситуации гены ауксинового ответа, ассоциированные с ответом на стресс, изменили свою экспрессию и в опыте, и в контроле, в результате после обработки ауксином остались ДЭГами только гены, не связанные со стрессом. В то же время, учитывая несколько повышенное значение отношения *R* для профиля № 10 по сравнению с медианой, можно сделать предположение о невысоком качестве этих данных.

Низкое количество этилен-чувствительных ДЭГ наблюдалось в корнях выращенных на свету проростков после непродолжительной (4 ч) обработки биологическим предшественником этилена, АЦК, в низкой (1 мкМ) концентрации (№ 13; 522 ДЭГ), что может быть связано с малым временем обработки для реализации полного ответа на этилен. Увеличение времени обработки до 8, 12 и 24 ч (№ 14, 15, 16) во всех случаях увеличивало число ДЭГ примерно в 2 раза (Harkey et al., 2018).

Таким образом, начиная примерно с 8 ч при такой обработке реализуется полный ответ на этилен, при котором количество ДЭГ близко к медианному. Низкое количество ДЭГ в профиле № 9 (379 ДЭГ) можно связать с техническими особенностями транскриптомных экспериментов в работе (Stepanova et al., 2007), учитывая низкое количество ДЭГ в ауксин-индуцированном профиле № 13 (657 ДЭГ) из этого же исследования. Тем не менее нет оснований говорить о низком качестве этих данных, так как наблюдаемые отклонения не сопровождаются существенным повышением значения отношения *R*. Примечательно, что значения числа ДЭГ, близкие к медианному, дали РНК-секвенирование на SOLiD (№ 1, 2, 6, 7) вне зависимости от времени обработки (Chang et al., 2013), а также секвенирование с помощью Illumina побегов (№ 4) и растений другого экотипа (Ler, Landsberg erecta) (№ 5), а не экотипа Columbia, как во всех остальных случаях. При этом

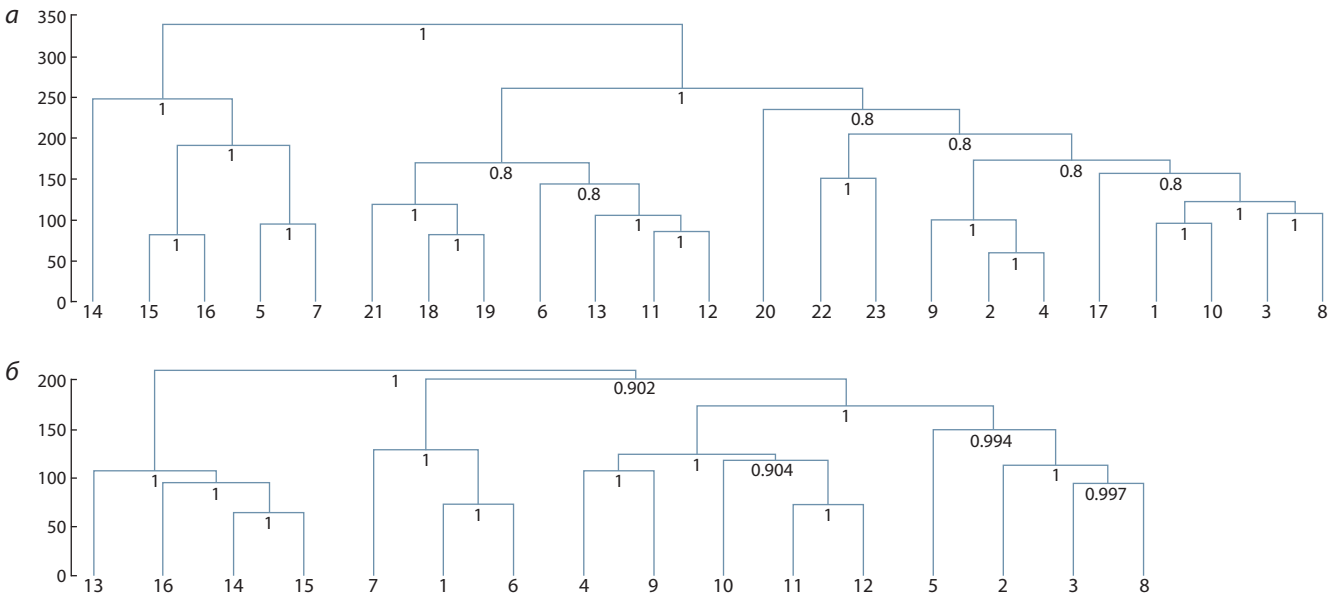


Рис. 4. Иерархическая кластеризация профилей дифференциальной экспрессии в ответ на ауксин (*а*) и этилен (*б*) с использованием метода Ward.D2.

Illumina секвенирование этиолированных проростков и корней дало число ДЭГ, значительно выше медианных (№ 3, 8 и 10; 5253, 3715 и 4067 ДЭГ соответственно).

Профили дифференциальной экспрессии генов в ответ на фитогормоны в образцах, представленных разными частями растения, отличаются по составу ДЭГ

Далее мы более подробно исследовали сходство профилей экспрессии по составу дифференциально экспрессирующихся генов. Попарные сравнения с использованием функций GetSimMatrix подтвердили специфический характер транскрипционного ответа на ауксин в меристеме побега и молодых цветах (профиль № 1) по сравнению со всеми остальными органами (см. рис. 3, *в*). Неудивительно, что относительно высокое значение индекса сходства для этого профиля (I = 0.47) наблюдалось только в паре с профилем дифференциальной экспрессии генов в меристемах побегов (№ 22). Затем выделялись две группы сходных профилей, описывающих транскрипционный ответ на ауксин в целых проростках и в корнях. Разделение профилей, соответствующих целым проросткам и их корням, подтверждается также результатами кластеризации профилей по дифференциальной экспрессии с помощью функции DE_clustering и является очевидным, так как в проростках наряду с корнем присутствует также побег (рис. 4). Однако, несмотря на детектируемое внутригрупповое сходство, нужно отметить очевидную вариабельность профилей внутри каждой из этих двух групп (см. рис. 2, *в*). Наконец, профили с большим количеством ДЭГ (№ 11, 15, 16, 22) демонстрировали достаточно высокий индекс сходства при попарном сравнении со всеми профилями (см. рис. 3, *в*).

Качественное сходство профилей с большим количеством ДЭГ друг с другом, а также с более узкими списками ДЭГ свидетельствует об их корректности. Профили дифференциальной экспрессии генов на почках стеблевых листьев (№ 20) и в листьях (№ 23) демонстрировали умеренное сходство ($I \geq 0.42$) только с профилями с большим количеством ДЭГ. Можно предположить, что обработка высокими концентрациями ауксина (№ 11, 15, 16, 22) изменяет экспрессию разных групп генов, каждая из которых отвечает на низкие концентрации ауксина только в определенных условиях. Помимо этого, большое число ДЭГ в позднем ответе может объясняться широкой представленностью в них генов вторичного ответа на ауксин.

Попарные сравнения этилен-индуцированных профилей дифференциальной экспрессии выявили обособленную группу (№ 13–16) из исследования A.F. Harkey с коллегами (2018) (см. рис. 2, *г*). Они описывали изменение экспрессии генов в корнях обработанных АЦК (предшественником этилена) проростков, растущих в условиях постоянной освещенности. Считается, что АЦК также имеет независимую от этилена биологическую активность (Vanderstraeten et al., 2019), а свет оказывает существенное влияние на формирование транскрипционного ответа на этилен у *A. thaliana* (Shi et al., 2016a, b; Luo, Shi, 2019). Мы предположили, что химическая природа активного вещества и условия освещенности при выращивании проростков могли выступать весомыми нецелевыми факторами в данном случае. Однако профили № 13–16 демонстрировали лишь умеренное сходство с профилем дифференциальной экспрессии в корнях обработанных этиленом проростков, выращенных при долгом (16 ч) дне (№ 10) (I = 0.59, 0.54, 0.52 и 0.49), и достаточно сильно отличались от профилей дифференциальной экспрессии генов в целых проростках, выращенных при 12-часовом дне и обработанных АЦК (№ 11 и 12) ($0.22 < I < 0.42$) (см. рис. 3, *г*). Таким образом, нельзя исключить, что обособленность профилей № 13–16 может быть следствием пакетного эффекта.

Остальные профили распадались на две группы сходных списков. Первые характеризовали транскрипцион-

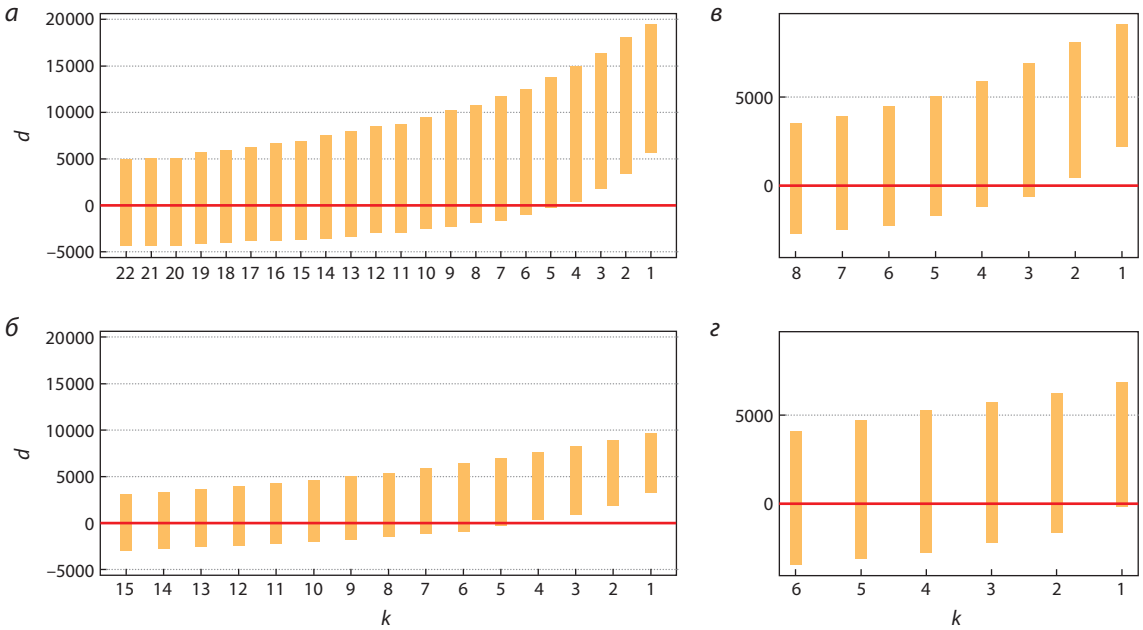


Рис. 5. Оценка однородности профилей дифференциальной экспрессии ответа на ауксин (*а*, *б*) и этилен (*в*, *г*) посредством ресемплинга.

Столбцы отражают 95 % доверительный интервал значений $d = N_m - N_k$, где N_m – число генов, которые являются ДЭГ хотя бы в одном из списков в псевдовыборке размера *m*; N_k – число генов, которые определяются как ДЭГ хотя бы в одном из списков в псевдовыборке размера *k*, *m* > *k*. Детальное описание процедуры представлено в разделе «Материалы и методы». *а* – результаты расчетов для *m* = 23 (все ауксин-индуцированные профили ДЭГ); *б* – результаты расчетов для *m* = 9 (ауксин-индуцированные профили ДЭГ № 5–7, 12–14, 18, 19, 21); *в* – результаты расчетов для *m* = 16 (все этилен-индуцированные профили ДЭГ); *г* – результаты расчетов для *m* = 7 (ауксин-индуцированные профили ДЭГ № 1–3, 5–8). Жирной линией отмечено значение *d* = 0.

ный ответ на этилен в корнях проростков независимо от режима освещенности, а также в целых проростках, выращенных в присутствии света. Вторые описывали ответ на этилен в этиолированных проростках или побегах. Таким образом, мы подтвердили известные факты, что свет играет существенную роль в формировании ответа на этилен (Shi et al., 2016a, b; Luo, Shi, 2019), но дополнительно показали, что этот эффект наблюдается в побеге, но не в корне. Следут отметить, что при кластеризации с учетом величины изменения экспрессии временной ряд по обработке этиленом этиолированных проростков из исследования K.N. Chang с коллегами (2013) выделяется в отдельную группу (см. рис. 4), что также поднимает вопрос о возможном пакетном эффекте.

Набор из семи этилен-индуцированных профилей является однородным по составу ДЭГ

Количество генов, идентифицируемых как ДЭГ хотя бы в одном из анализируемых списков, в существенной мере определяется однородностью набора профилей. В нашем случае 20552 и 10988 генов были определены как ДЭГ по крайней мере в одном профиле дифференциальной экспрессии, индуцированной ауксином и этиленом/АЦК соответственно. С учетом размера генома *A. thaliana*, который содержит немногим более 30000 генов, это неожиданно большое количество ДЭГ, которое заметно превышает количество ДЭГ в отдельных экспериментах и, вероятно, обусловлено изменчивостью индукции транскриптомов в зависимости от условий проведения экспериментов. Количественная оценка однородности наборов профилей посредством ресемплинга (с использованием функции DE_bootstrap) ожидаемо показала их неоднородность по составу ДЭГ (рис. 5, *а*, *б*).

В то же время на основании описанных в предыдущем разделе результатов попарного сравнения профилей (см. рис. 3, *в*, *г*) можно сделать предположение о потенциальной однородности ауксин-индуцированных профилей ДЭГ в корне (№ 5–7, 12–14, 18–21) и этилен-индуцированных профилей ДЭГ в проростках/побегах (№ 1–3, 5–8). Чтобы проверить это предположение, мы осуществили анализ соответствующих наборов профилей дифференциальной экспрессии с применением функции DE_bootstrap. В то время как группа профилей ответа на ауксин в корнях все еще демонстрировала неоднородность (вероятно, длительность обработки обуславливала различия по составу ДЭГ), значимых отличий количества этилен-индуцированных ДЭГ в этиолированных проростках не обнаруживалось. Таким образом, набор этилен-индуцированных профилей ДЭГ в этиолированных проростках/побегах (№ 1–3, 5–8) в силу их однородности целесообразно в дальнейшем использовать для метаанализа (например, с целью более эффективного выявления слабых закономерностей).

Заключение

Метаанализ транскриптомных данных открывает широкие возможности для увеличения мощности статистического анализа при условии их однородности. Однако осмысленный выбор экспериментов для метаанализа зачастую затруднен отсутствием стандартов в этой области и удобных программных средств для сравнительной характери-

стики профилей дифференциальной экспрессии генов, в особенности для построения интуитивно понятных визуализаций. В настоящей работе мы предложили набор количественных индикаторов для сравнительной характеристики профилей ДЭГ (n – количество ДЭГ; δ – доля ДЭГ, специфичных для данного списка; R – отношение, характеризующее специфичность транскрипционного ответа; I – индекс сходства пары списков по составу ДЭГ; оценка однородности профилей ДЭГ), а также реализовали их вычисление и визуализацию в виде программы InterTransViewer. Продемонстрировано, что комплексное рассмотрение характеристик отдельных профилей ДЭГ (n, δ, R) с учетом результатов попарных сравнений профилей по составу ДЭГ (как с использованием индекса сходства I, так и посредством кластеризации с учетом величины изменения уровней экспрессии) позволяет позиционировать эксперименты в контексте друг друга, оценивать тенденцию к их интеграции или сегрегации, генерировать гипотезы о влиянии весомых нецелевых факторов на исследуемый транскрипционный ответ. В результате это дает возможность выделять потенциально однородные группы экспериментов.

Последующий анализ однородности этих групп профилей с применением процедуры ресемплинга и установления порога уровня значимости позволяет принять решение о целесообразности использования этих данных для метаанализа. В целом программа InterTransViewer дает возможность эффективно формировать выборки экспериментов в зависимости от задачи и методов метаанализа.

Список литературы / References

Bairakdar M.D., Tewari A., Truttmann M.C. A meta-analysis of RNA-Seq studies to identify novel genes that regulate aging. *Exp. Gerontol*. 2023;173:112107. DOI 10.1016/j.exger.2023.112107

Bargmann B.O., Vanneste S., Krouk G., Nawy T., Efroni I., Shani E., Choe G., Friml J., Bergmann D.C., Estelle M., Birnbaum K.D. A map of cell type-specific auxin responses. *Mol. Syst. Biol.* 2013; 9:688. DOI 10.1038/msb.2013.40

Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. B. Methodol.* 1995;57(1):289-300. DOI 10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x

Brazma A. Minimum information about a microarray experiment (MIAME) – successes, failures, challenges. *Sci. World J*. 2009; 29(9):420-423. DOI 10.1100/tsw.2009.57

Brazma A., Hingamp P., Quackenbush J., Sherlock G., Spellman P., Stoeckert C., Aach J., Ansorge W., Ball C.A., Causton H.C., Gaasterland T., Glenisson P., Holstege F.C., Kim I.F., Markowitz V., Matese J.C., Parkinson H., Robinson A., Sarkans U., Schulze-Kremer S., Stewart J., Taylor R., Vilo J., Vingron M. Minimum information about a microarray experiment (MIAME) – toward standards for microarray data. *Nat. Genet*. 2001;29(4):365-371. DOI 10.1038/ng1201-365

Cahan P., Rovegno F., Mooney D., Newman J.C., St. Laurent G. 3rd, McCaffrey T.A. Meta-analysis of microarray results: challenges, opportunities, and recommendations for standardization. *Gene*. 2007; 401(1-2):12-18. DOI 10.1016/j.gene.2007.06.016

Chaiwanon J., Wang Z.Y. Spatiotemporal brassinosteroid signaling and antagonism with auxin pattern stem cell dynamics in *Arabidopsis* roots. *Curr. Biol.* 2015;25(8):1031-1042. DOI 10.1016/j.cub.2015.02.046

Chang K.N., Zhong S., Weirauch M.T., Hon G., Pelizzola M., Li H., Huang S.S., Schmitz R.J., Urich M.A., Kuo D., Nery J.R., Qiao H., Yang A., Jamali A., Chen H., Ideker T., Ren B., Bar-Joseph Z., Hughes T.R., Ecker J.R. Temporal transcriptional response to ethylene gas drives growth hormone cross-regulation in *Arabidopsis*. *eLife.* 2013;2:e00675. DOI 10.7554/eLife.00675

Chen S., Zhou Y., Chen Y., Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics.* 2018;34(17):i884-i890. DOI 10.1093/bioinformatics/bty560

Clough E., Barrett T. The gene expression omnibus database. *Methods Mol. Biol.* 2016;1418:93-110. DOI 10.1007/978-1-4939-3578-9_5

De Rybel B., Audenaert D., Xuan W., Overvoorde P., Strader L.C., Kepinski S., Hoye R., Brisbois R., Parizot B., Vanneste S., Liu X., Gilday A., Graham I.A., Nguyen L., Jansen L., Njo M.F., Inzé D., Bartel B., Beeckman T. A role for the root cap in root branching revealed by the non-auxin probe naxillin. *Nat. Chem. Biol.* 2012;8(9): 798-805. DOI 10.1038/nchembio.1044

Delker C., Pöschl Y., Raschke A., Ullrich K., Ettingshausen S., Hauptmann V., Grosse I., Quint M. Natural variation of transcriptional auxin response networks in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 2010; 22(7):2184-2200. DOI 10.1105/tpc.110.073957

Feng Y., Xu P., Li B., Li P., Wen X., An F., Gong Y., Xin Y., Zhu Z., Wang Y., Guo H. Ethylene promotes root hair growth through coordinated EIN3/EIL1 and RHD6/RSL1 activity in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2017;114:13834-13839. DOI 10.1073/pnas.1711723115

Freire-Rios A., Tanaka K., Crespo I., van der Wijk E., Sizentsova Ya., Levitsky V., Lindhoud S., Fontana M., Hohlbein J., Boer R., Mironova V., Weijers D. Architecture of DNA elements mediating ARF transcription factor binding and auxin-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2020;117(39):24557-24566. DOI 10.1073/pnas.2009554117

Fu L., Liu Y., Qin G., Wu P., Zi H., Xu Z., Zhao X., Wang Y., Li Y., Yang S., Peng C., Wong C.C.L., Yoo S.D., Zuo Z., Liu R., Cho Y.H., Xiong Y. The TOR–EIN2 axis mediates nuclear signalling to modulate plant growth. *Nature.* 2021;591(7849):288-292. DOI 10.1038/s41586-021-03310-y

Harkey A.F., Watkins J.M., Olex A.L., DiNapoli K.T., Lewis D.R., Fetrow J.S., Binder B.M., Muday G.K. Identification of transcriptional and receptor networks that control root responses to ethylene. *Plant Physiol.* 2018;176(3):2095-2118. DOI 10.1104/pp.17.00907

Kang D.D., Sibille E., Kaminski N., Tseng G.C. MetaQC: objective quality control and inclusion/exclusion criteria for genomic meta-analysis. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(2):e15. DOI 10.1093/nar/gkr1071

Keel B.N., Lindholm-Perry A.K. Recent developments and future directions in meta-analysis of differential gene expression in livestock RNA-Seq. *Front. Genet.* 2022;19(13):983043. DOI 10.3389/fgene.2022.983043

Kim D., Pertea G., Trapnell C., Pimentel H., Kelley R., Salzberg S.L. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* 2013;14:R36. DOI 10.1186/gb-2013-14-4-r36

Kim D., Paggi J.M., Park C., Bennett C., Salzberg S.L. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat. Biotechnol.* 2019;37:907-915. DOI 10.1038/s41587-019-0201-4

Lawrence M., Huber W., Pagès H., Aboyoun P., Carlson M., Gentleman R., Morgan M.T., Carey V.J. Software for computing and annotating genomic ranges. *PLoS Comput. Biol.* 2013;9:e1003118. DOI 10.1371/journal.pcbi.1003118

Lewis D.R., Olex A.L., Lundy S.R., Turkett W.H., Fetrow J.S., Muday G.K. A kinetic analysis of the auxin transcriptome reveals cell wall remodeling proteins that modulate lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2013;25:3329-3346. DOI 10.1105/tpc.113.114868

Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014; 15(12):550. DOI 10.1186/s13059-014-0550-8

Luo Y., Shi H. Direct regulation of phytohormone actions by photoreceptors. *Trends Plant Sci*. 2019;24:105-108. DOI 10.1016/j.tplants.2018.11.002

McDermaid A., Monier B., Zhao J., Liu B., Ma Q. Interpretation of differential gene expression results of RNA-seq data: review and integration. *Brief. Bioinform*. 2019;20(6):2044-2054. DOI 10.1093/bib/bby067

Mozgová I., Muñoz-Viana R., Hennig L. PRC2 represses hormone-induced somatic embryogenesis in vegetative tissue of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 2017;13(1):e1006562. DOI 10.1371/journal.pgen.1006562

Müller D., Waldie T., Miyawaki K., To J.P., Melnyk C.W., Kieber J.J., Kakimoto T., Leyser O. Cytokinin is required for escape but not release from auxin mediated apical dominance. *Plant J.* 2015;82(5):874-886. DOI 10.1111/tpj.12862

Okushima Y., Overvoorde P.J., Arima K., Alonso J.M., Chan A., Chang C., Ecker J.R., Hughes B., Lui A., Nguyen D., Onodera C., Quach H., Smith A., Yu G., Theologis A. Functional genomic analysis of the *AUXIN RESPONSE FACTOR* gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of ARF_7 and ARF_{19}. *Plant Cell.* 2005;17(2):444-463. DOI 10.1105/tpc.104.028316

Omelyanchuk N.A., Wiebe D.S., Novikova D.D., Levitsky V.G., Klimova N., Gorelova V., Weinholdt C., Vasiliev G.V., Zemlyanskaya E.V., Kolchanov N.A., Kochetov A.V. Auxin regulates functional gene groups in a fold-change-specific manner in *Arabidopsis thaliana* roots. *Sci. Rep.* 2017;7(1):2489. DOI 10.1038/s41598-017-02476-8

Ritchie M.E., Phipson B., Wu D., Hu Y., Law C.W., Shi W., Smyth G.K. *limma* powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:e47. DOI 10.1093/nar/gkv007

Romero-Puertas M.C., Peláez-Vico M.Á., Pazmiño D.M., Rodríguez-Serrano M., Terrón-Camero L., Bautista R., Gómez-Cadenas A., Claros M.G., León J., Sandalio L.M. Insights into ROS-dependent signalling underlying transcriptomic plant responses to the herbicide 2,4-D. *Plant Cell Environ.* 2022;45(2):572-590. DOI 10.1111/pce.14229

Rousselet G.A., Pernet C.R., Wilcox R.R. The percentile bootstrap: a primer with step-by-step instructions in R. *Adv. Meth. Pract. Psychol. Sci.* 2021;4(1). DOI 10.1177/2515245920911881

Rung J., Brazma A. Reuse of public genome-wide gene expression data. *Nat. Rev. Genet*. 2013;14(2):89-99. DOI 10.1038/nrg3394

Sarkans U., Füllgrabe A., Ali A., Athar A., Behrangi E., Diaz N., Fexova S., George N., Iqbal H., Kurri S., Munoz J., Rada J., Papatheodorou I., Brazma A. From arrayexpress to biostudies. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(D1):D1502-D1506. DOI 10.1093/nar/gkaa1062

Shi H., Liu R., Xue C., Shen X., Wei N., Deng X.W., Zhong S. Seedlings transduce the depth and mechanical pressure of covering soil using COP1 and ethylene to regulate EBF1/EBF2 for soil emergence. *Curr. Biol*. 2016a;26(2):139-149. DOI 10.1016/j.cub.2015.11.053

Shi H., Shen X., Liu R., Xue C., Wei N., Deng X.W., Zhong S. The red light receptor phytochrome B directly enhances substrate–E3 ligase interactions to attenuate ethylene responses. *Dev. Cell*. 2016b;39(5):597-610. DOI 10.1016/j. devcel.2016.10.020

Simonini S., Bencivenga S., Trick M., Østergaard L. Auxin-induced modulation of ETTIN activity orchestrates gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2017;29(8):1864-1882. DOI 10.1105/tpc.17.00389

Stelpflug S.C., Sekhon R.S., Vaillancourt B., Hirsch C.N., Buell C.R., de Leon N., Kaeppler S.M. An expanded maize gene expression atlas based on RNA sequencing and its use to explore root development. *Plant Genome*. 2016;9(1):1-16. DOI 10.3835/plantgenome2015.04.0025

Stepanova A.N., Yun J., Likhacheva A.V., Alonso J.M. Multilevel interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell.* 2007;19(7):2169-2185. DOI 10.1105/tpc.107.052068

Sudmant P.H., Alexis M.S., Burge C.B. Meta-analysis of RNA-seq expression data across species, tissues and studies. *Genome Biol.* 2015;16:287. DOI 10.1186/s13059-015-0853-4

Tello-Ruiz M.K., Stein J., Wei S., Preecem J., Olson A., Naithani S., Amarasinghe V., Dharmawardhana P., Jiao Y., Mulvaney J., Kumari S., Chougule K., Elser J., Wang B., Thomason J., Bolser D.M., Kerhornou A., Walts B., Fonseca N.A., Huerta L., Keays M., Tang Y.A., Parkinson H., Fabregat A., McKay S., Weiser J., D'Eustachio P., Stein L., Petryszak R., Kersey P.J., Jaiswal P., Ware D. Gramene 2016: comparative plant genomics and pathway resources. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D1133-D1140. DOI 10.1093/nar/gkv1179

Vanderstraeten L., Depaepe T., Bertrand S., Van Der Straeten D. The ethylene precursor ACC affects early vegetative development independently of ethylene signaling. *Front. Plant Sci.* 2019;10:1591. DOI 10.3389/fpls.2019.01591

Vanneste S., De Rybel B., Beemster G.T., Ljung K., De Smet I., Van Isterdael G., Naudts M., Iida R., Gruissem W., Tasaka M., Inzé D., Fukaki H., Beeckman T. Cell cycle progression in the pericycle is not sufficient for SOLITARY ROOT/IAA_{14}-mediated lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 2005;17(11):3035-3050. DOI 10.1105/tpc.105.035493

Winter C., Kosch R., Ludlow M., Osterhaus A.D.M.E., Jung K. Network meta-analysis correlates with analysis of merged independent transcriptome expression data. *BMC Bioinformatics.* 2019;20(1):144. DOI 10.1186/s12859-019-2705-9

Xu K., Liu J., Fan M., Xin W., Hu Y., Xu C. A genome-wide transcriptome profiling reveals the early molecular events during callus initiation in *Arabidopsis* multiple organs. *Genomics*. 2012;100(2):116-124. DOI 10.1016/j.ygeno.2012.05.013

Xuan W., Audenaert D., Parizot B., Möller B.K., Njo M.F., De Rybel B., De Rop G., Van Isterdael G., Mähönen A.P., Vanneste S., Beeckman T. Root cap-derived auxin pre-patterns the longitudinal axis of the *Arabidopsis* root. *Curr. Biol.* 2015;25(10):1381-1388. DOI 10.1016/j.cub.2015.03.046

Yu X.T., Zeng T. Integrative analysis of omics big data. *Methods Mol. Biol.* 2018;1754:109-135. DOI 10.1007/978-1-4939-7717-8_7

Zander M., Willige B.C., He Y., Nguyen T.A., Langford A.E., Nehring R., Howell E., McGrath R., Bartlett A., Castanon R., Nery J.R., Chen H., Zhang Z., Jupe F., Stepanova A., Schmitz R.J., Lewsey M.G., Chory J., Ecker J.R. Epigenetic silencing of a multifunctional plant stress regulator. *eLife.* 2019;8:e47835. DOI 10.7554/eLife.47835

Zhang F., Qi B., Wang L., Zhao B., Rode S., Riggan N.D., Ecker J.R., Qiao H. EIN2-dependent regulation of acetylation of histone H3K14 and non-canonical histone H3K23 in ethylene signalling. *Nat. Commun.* 2016a;7(1):13018. DOI 10.1038/ncomms13018

Zhang F., Wang L., Lim J.Y., Kim T., Pyo Y., Sung S., Shin C., Qiao H. Phosphorylation of CBP20 links microRNA to root growth in the ethylene response. *PLoS Genet.* 2016b;12(11):e1006437. DOI 10.1371/journal.pgen.1006437

Zhou G., Soufan O., Ewald J., Hancock R.E.W., Basu N., Xia J. NetworkAnalyst 3.0: a visual analytics platform for comprehensive gene expression profiling and meta-analysis. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(W1):W234-W241. DOI 10.1093/nar/gkz240

ORCID

A.V. Tyapkin orcid.org/0000-0002-5969-3628
V.V. Lavrekha orcid.org/0000-0001-8813-8941
D.Yu. Oshchepkov orcid.org/0000-0002-6097-5155
E.V. Zemlyanskaya orcid.org/0009-0005-7316-7690

Благодарности. Разработка метода выполнена в рамках бюджетного проекта FWNR-2022-0020. Сравнительный анализ транскриптомов выполнен при поддержке Российского научного фонда, грант № 20-14-00140.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.08.2023. После доработки 18.10.2023. Принята к публикации 02.11.2023.

Алфавитный указатель авторов статей, опубликованных в журнале в 2023 г.

Абдукаримов Ш.С. 8, 958
Абидуева Е.Ю. 4, 411
Абугалиева С. 6, 565
Аглямова А. 8, 1031
Адамовская А.В. 7, 784
Адонина И.Г. 6, 623
Азарова Д.С. 7, 890
Азнабаева Ю.Г. 5, 512
Айтбаев К.А. 2, 162; 5, 488
Александрович Ю.В. 6, 651
Аль-Накиб Е.А. 5, 454
Амстиславская Т.Г. 2, 177
Амстиславский С.Я. 2, 177
Андреева И.В. 3, 240
Андреева Т.В. 5, 502
Анисимова М.В. 4, 357
Антонов Е.В. 6, 651
Антонцева Е.В. 6, 662
Антропова Е.А. 7, 776, 784; 8, 1031
Апарина В.А. 8, 988
Артеменко Н.В. 7, 859
Архестова Д.Х. 5, 440
Аульченко Ю.С. 3, 224
Афонников Д.А. 7, 737, 859
Ахмадишина Л.З. 5, 512
Ахмед М.Ш. 6, 609

Бабушкина Н.П. 1, 72
Бадаева Е.Д. 6, 545
Бажан Н.М. 4, 333
Базовкина Д.В. 4, 342
Балдин М.Н. 5, 480
Балыбина Н.В. 4, 333
Баранов К.О. 4, 333
Баранова О.А. 6, 623
Барзали М. 2, 135
Барсуков П.А. 6, 703
Барцев С.И. 7, 869, 884
Басов Н.В. 7, 768
Батурина О.А. 6, 703
Бейшеналиева С.Б. 5, 488
Бектуров А.Б. 2, 162
Беленькая С.В. 4, 421
Беловежец Л.А. 3, 276
Беляева Е.О. 1, 83
Блинова Е.В. 8, 921
Бобохужаев Ш.У. 8, 958
Богомолов А.Г. 7, 728, 794
Бойко Н.И. 8, 988
Борис К.В. 6, 572
Бородин П.М. 6, 641
Бородко Д.Д. 7, 820
Бочаров Г.А. 7, 755
Брагина Е.Ю. 1, 7
Брусенцев Е.Ю. 2, 177
Бурханова Г.Ф. 8, 1000
Бусов И.Д. 7, 859
Бухарина Т.А. 7, 746
Буянтуева Л.Б. 4, 411

Вагайцева К.В. 1, 55
Вакар С. 6, 609
Вакула С.И. 3, 197
Валихова Л.В. 1, 36, 46
Васильев Г.В. 2, 146
Васильев С.А. 1, 28, 63
Васильченко Е.Н. 3, 207
Вензель А.С. 7, 768, 776, 784; 8, 1031
Весна Э. 1, 83
Викторова Т.В. 5, 512
Виниченко Н.А. 8, 988
Вишнякова М.А. 2, 119
Волобаев В.П. 5, 495
Волянская А.Р. 8, 1031

Гайслер Е.В. 7, 768
Гайфуллина Л.Р. 4, 366
Галимова А.А. 4, 297; 5, 433
Генаев М.А. 7, 859
Гербек Ю.Э. 6, 651
Герлинская Л.А. 4, 357; 5, 480
Глаголева А.Ю. 7, 859
Гнутиков А.А. 8, 921
Голубятников В.П. 7, 746
Голышев В.М. 7, 807
Гон Л. 4, 357
Гончаров Н.П. 8, 933
Гончарова И.А. 1, 72
Горбунов И.В. 4, 316
Горбунова А.О. 3, 189
Горшкова Т.А. 8, 1031
Гребенников Д.С. 7, 755
Гридина М.М. 1, 83
Грузнов В.М. 5, 480
Гулевич Р.Г. 6, 651

Дамаров И.С. 6, 662
Даркова Я.А. 1, 63

Дегерменджи А.Г. 7, 878
Дегтярева А.О. 6, 662
Деменева В.В. 1, 63
Деменков П.С. 7, 768, 776, 784; 8, 1031
Деренко М.В. 3, 218
Джавайд Р.А. 6, 609
Дивашук М.Г. 8, 947
Дидоренко С. 6, 565
Дмитриев А.Е. 1, 63
Дружин А.Е. 6, 623
Дубовец Н.И. 6, 553
Дубровский М.Л. 6, 572

Егозова Е.С. 3, 250
Егорова Г.П. 2, 119
Елизова К.Д. 8, 971
Ельчанинов В.В. 4, 421
Емелин А.Д. 3, 250
Епифанова Н.В. 3, 264
Ершов Н.И. 7, 794
Есина Т.И. 4, 421

Женило С.В. 7, 820
Жигайлов А.В. 2, 93
Жужжалова Т.П. 3, 207
Журавлев А.В. 3, 250

Завьялов Е.Л. 5, 480; 6, 633
Загидуллин Н.Ш. 5, 512
Заломаева Е.С. 3, 250
Зарубин А.А. 1, 36, 46, 55, 72
Затыбеков А. 6, 565
Зеленева Ю.В. 6, 582
Землянская Е.В. 7, 890; 8, 1042
Золотарева К.А. 7, 794
Зубаирова У.С. 8, 1031
Зуев А.С. 1, 63
Зуев Е.В. 8, 988

Иванисенко В.А. 7, 768, 776, 784; 8, 1031
Иванисенко Н.В. 7, 784
Иванисенко Т.В. 7, 768, 776, 784; 8, 1031
Иванов Р.А. 7, 815
Иванова В. 5, 447
Иванова Ю.Н. 4, 323
Иванощук Д.Е. 5, 522
Иванченко О.Б. 3, 189
Игнатьева Е.В. 3, 283; 7, 829
Ильницкая Е.Т. 2, 129; 4, 316
Ирсалиев М.И. 5, 488
Исакова Ж.Т. 2, 162; 5, 488
Искаков Б.К. 2, 93
Исмагилов К.Р. 4, 297
Истомина Н.А. 7, 851

Кабилов М.Р. 6, 694, 703
Казанцев Ф.В. 7, 898
Казанцева А.Ю. 4, 333
Камар М. 6, 609
Камионская А.М. 8, 980
Капко Т.Н. 8, 1022
Каримизаде Р. 2, 135
Карлов Г.И. 8, 947
Каскинова М.Д. 4, 366
Каспаров Э.В. 4, 393
Кашников А.Ю. 3, 264
Кильчевский А.В. 3, 197
Кипень В.Н. 2, 162; 5, 488
Клемешова Д.И. 7, 851
Клещев М.А. 7, 768
Климова Н.В. 7, 794
Ковалева Н.В. 2, 111
Коваль В.С. 7, 859
Ковальская В.А. 6, 676
Кожевников Е.А. 4, 316
Кожевникова О.С. 7, 794
Кожекин М.В. 7, 859
Кожемякина Р.В. 7, 794
Козина Т.Д. 4, 316
Колесников Н.А. 1, 36, 46, 55
Колкер А.Б. 5, 522
Колосова Н.Г. 7, 794
Колчанов Н.А. 7, 725, 768, 829; 8, 1031
Комахин Р.А. 2, 99
Комышев Е.Г. 7, 859
Кондратюк Е.Ю. 7, 794
Константинов Ю.М. 8, 971
Концевая Г.В. 4, 357
Конькова Э.А. 6, 582
Копылова К.В. 4, 393
Корболина Е.Е. 6, 662
Кореньков П.А. 4, 306
Коренькова О.О. 4, 306
Королева Ю.А. 1, 72
Корытина Г.Ф. 5, 512
Костерин О.Э. 2, 153
Костина Н.Е. 4, 333
Коталевская Ю.Ю. 1, 18
Котляр В.К. 4, 316
Кочетова О.В. 5, 512
Кочешкова А.А. 8, 947
Кочиева Е.З. 5, 440
Кравцова Л.С. 6, 694
Крупин П.Ю. 8, 947
Крюков А.А. 3, 189
Кудрявцев А.М. 6, 572
Кудряшова Т.Р. 3, 189
Кузнецова И.Л. 5, 502
Кулинченко М.В. 8, 971
Кулуев А.Р. 4, 297
Кулуев Б.Р. 4, 297; 5, 433
Кунижева С.С. 5, 495
Куприянова Д.А. 5, 495
Кыдыралиева Б.У. 5, 488

Лавреха В.В. 7, 890; 8, 1042
Лаврик И.Н. 7, 784
Лантушенко А.О. 4, 306

Ларкин Д.М. 3, 283; 5, 463
Ларкина А.П. 5, 512
Латиф Р. 2, 146
Лашин С.А. 7, 815, 829, 898
Лебедев И.Н. 1, 5, 28, 63, 83
Леонова И.Н. 6, 553; 8, 988
Липина Т.В. 2, 177
Ломзов А.А. 7, 807
Ломиворотов В.В. 7, 768
Лоскутов И.Г. 8, 921

Макаркина М.В. 2, 129; 4, 316
Макарова А.А. 7, 768, 776; 8, 1031
Макарова Е.Н. 4, 333
Макась А.Л. 5, 480
Маковка Ю.В. 6, 651
Максимов И.В. 8, 1000
Малинчик М.А. 4, 393
Малышев Л.Л. 2, 111
Малышева Н.Ю. 2, 111
Мальчиков П.Н. 6, 591
Малявко А.А. 5, 530
Малярчук Б.А. 3, 218; 4, 373
Маркелов В.А. 5, 512
Маркель А.Л. 5, 530; 7, 794
Маркова Ю.А. 3, 276
Марусин А.В. 1, 46
Масленникова С.О. 5, 480
Матушкин Ю.Г. 7, 725
Мауленбай А. 6, 565
Махмутходжаев А.Ш. 1, 63
Мглинец А.В. 2, 153
Мегер Я.В. 4, 306
Медведев С.С. 8, 980
Мейстер Л.В. 6, 651
Меркулова Т.И. 6, 662
Миньженкова М.Е. 1, 83
Мирзаи А. 2, 135
Миронов И.В. 7, 755
Миронова В.В. 7, 890
Михайлова С.В. 6, 684
Мищенко Е.Л. 7, 776, 784
Мороз Г.Б. 7, 768
Морозова Е.В. 8, 988
Мошкин М.П. 4, 357; 5, 480
Мукеева С.Б. 2, 162; 5, 488
Мусинов К.К. 8, 988
Мустафин З.С. 7, 829
Мухин А.М. 7, 898
Мясникова М.Г. 6, 591

Нагиев Т.Б. 2, 111
Надыршина Д.Д. 4, 383
Назаренко Л.П. 1, 63, 83
Назаренко М.С. 1, 72
Наим А. 6, 609
Налбандян А.А. 3, 207
Напримеров В.А. 2, 177
Насибуллин Т.Р. 5, 512
Науменко В.С. 4, 342
Наумова Л.Г. 2, 129
Наумова Н.Б. 6, 703
Небесных И.А. 6, 694
Нечепуренко Ю.М. 7, 755
Низкородова А.С. 2, 93
Никитина Е.А. 3, 250
Никитина Е.П. 4, 411
Никитина Т.В. 1, 28, 63
Новикова Л.Ю. 2, 119
Новикова Н.А. 3, 264

Огиенко А.А. 7, 906
Окотруб С.В. 2, 177
Омелина Е.С. 7, 906
Омельянчук Н.А. 7, 890; 8, 1042
Орешко А.С. 4, 342
Орлов П.Е. 4, 333
Орлов Ю.Л. 8, 1031
Орловская О.А. 3, 197; 6, 553
Осмоналиев С.К. 2, 162
Ощепков Д.Ю. 7, 794; 8, 1042

Пальянов А.Ю. 7, 839
Пальянова Н.В. 7, 839
Патрушев Ю.В. 7, 768
Пезешкпур П. 2, 135
Пельтек С.Е. 2, 146
Перетолчина Т.Е. 4, 349; 6, 694
Першина Л.А. 6, 545
Петраш Н.В. 8, 1022
Петровский Д.В. 5, 480
Петрушин И.С. 3, 276
Пиндюрин А.В. 7, 906
Пискарев В.В. 8, 988
Плеско В.В. 7, 768
Плугатарь Ю.В. 5, 454
Подколодная О.А. 7, 728
Подколодный Н.Л. 7, 728, 794
Покровский А.Г. 7, 768
Полимбетова Н.С. 2, 93
Политыко Ю.К. 5, 530
Полубоярова Т.В. 2, 146
Поляков А.В. 6, 676
Пономаренко М.П. 7, 728, 794
Пономаренко П.М. 7, 728
Пронозин А.Ю. 7, 737
Пузырёв В.П. 1, 7
Пышный Д.В. 7, 807
Пьянков С.А. 6, 712

Разуваева А.В. 3, 240
Разумов И.А. 6, 633
Рапопорт И.Б. 2, 146
Рассказов Д.А. 7, 728, 794
Редина О.Е. 7, 794
Рогаев Е.И. 5, 495, 502
Рогачев А.Д. 7, 768
Родионов А.В. 8, 921

Родный А.Я. 4, 342
Рожкова И.Н. 2, 177
Романова Е.В. 4, 349
Ромащенко А.В. 4, 357
Рсалиев А. 6, 565
Русалимова О.А. 6, 703
Рыжкова О.П. 1, 83; 6, 676
Рязанова М.А. 7, 794

Савватеева-Попова Е.В. 3, 250
Савостьянов А.Н. 7, 851
Саженова Е.А. 1, 28, 63
Саликова А.В. 2, 119
Салина Е.А. 7, 737
Салихова А.М. 4, 366
Салтыкова Е.С. 4, 366
Санамьян М.Ф. 8, 958
Сапрыгин А.Е. 7, 851
Сарангова А.Б. 7, 869
Сафари Мотлах М.Р. 2, 135
Сваровская М.Г. 1, 46
Семаев С.Е. 5, 522
Семёнов Д.А. 7, 878
Сергеев А.А. 6, 712
Серяпина А.А. 5, 530
Сибикеев С.Н. 6, 623
Силкова О.Г. 4, 323; 8, 958
Сколотнева Е.С. 3, 240
Смарагдов М.Г. 5, 471
Смоленская С.Э. 8, 933
Смоликова Г.Н. 8, 980
Смольникова М.В. 4, 393
Советов В.В. 8, 1022
Сокурова В.В. 3, 250
Соловей Л.А. 6, 553
Соловьева А.Е. 2, 111
Сотникова Ю.С. 7, 768
Сочалова Л.П. 8, 988
Станова А.К. 4, 357
Степанов В.А. 1, 5, 18, 36, 46, 55
Степанов И.В. 4, 316; 5, 454
Степанова Н.В. 8, 980
Стефанова Н.А. 7, 794
Стёпочкин П.И. 4, 323
Стрельникова С.Р. 2, 99
Сун Ч.-Х. 4, 411
Супрун И.И. 5, 454
Суханова Н.Н. 1, 28
Сыровец А.А. 4, 306

Таможников С.С. 7, 851
Танвир С.Х. 6, 609
Тарасенко В.И. 8, 971
Тарасенко Т.А. 8, 971
Твердохлеб Н.Н. 7, 728
Тимощенко О.В. 5, 522
Тимощук А.Н. 3, 224
Титова К.А. 6, 712
Токмаков С.В. 2, 129
Толмачева Е.Н. 1, 28, 63
Трибой Т.И. 6, 694
Трифонова А.А. 6, 572
Трошков М.Л. 5, 480
Трубачеева Н.В. 6, 545
Тупикин А.Е. 6, 694
Туруспеков Е. 6, 565
Тяжелова Т.В. 5, 502
Тяпкин А.В. 8, 1042

Убогоева Е.В. 8, 1042
Ульданова Е.Е. 2, 177
Ульянов Д.С. 8, 947
Ульянова Е.Г. 3, 240
Уральский Л.И. 5, 495, 502

Фанг Ч. 6, 565
Федосеева Л.А. 7, 794
Филатова С.А. 1, 63
Филонов С.В. 7, 728, 794
Фишман В.С. 1, 83
Фу С. 7, 851
Фурман Д.П. 7, 746

Хандаев Б.М. 7, 794
Харламова А.В. 6, 651
Харьков В.Н. 1, 36, 46, 55
Хитринская И.Ю. 1, 36, 46
Хлебодарова Т.М. 7, 784
Холин С.К. 2, 169
Хотылева Л.В. 3, 197
Хохлов С.Ю. 5, 454
Хоцкин Н.В. 4, 357
Хоцкина А.С. 5, 480
Христиченко М.Ю. 7, 755
Хусаинова Р.И. 4, 383, 401
Хусейн И. 6, 609
Хуснутдинова Н.Н. 5, 512

Центалович Ю.П. 5, 530

Чадаева И.В. 7, 794
Чекиров К.Б. 5, 488
Чен М. 8, 1031
Череватова Т.Б. 6, 676
Черкасова Н.Н. 3, 207
Черкасова О.П. 6, 633
Чортонбаев Т.Д. 2, 162
Чуйко Э.А. 2, 177

Шамшин И.Н. 6, 572
Шаповал А.И. 4, 421
Шарапов С.Ж. 3, 224
Шарипов К.О. 2, 93
Шарифи П. 2, 135
Шарко Ф.С. 7, 820
Шаршеналиева Г.А. 5, 488
Шахтшнейдер Е.В. 5, 522
Шевелев О.Б. 6, 633

Шевчук О.М. 4, 306
Шеин М.Ю. 8, 1000
Шеленга Т.В. 2, 111, 119
Шепелева Д.В. 6, 651
Шеховцов С.В. 2, 146
Шилова Н.В. 1, 83
Шихевич С.Г. 6, 651; 7, 794
Шишова М.Ф. 3, 189
Шнайдер Е.П. 5, 480
Шомахов Б.Р. 5, 440
Шумный В.К. 6, 545

Щелкунов С.Н. 6, 712
Щенникова А.В. 5, 440
Щербаков Д.Н. 4, 421
Щербаков Д.Ю. 4, 349
Щербань А.Б. 8, 1010

Юдин Н.С. 3, 283; 5, 463
Юйсян Ван 4, 349
Юркина А.И. 8, 947
Юрков А.П. 3, 189
Юрьев С.Ю. 1, 63
Юшин И.И. 7, 807

Яковлева Т.В. 4, 333
Якубицкий С.Н. 6, 712
Ялаев Б.И. 4, 401
Яньшоле Л.В. 5, 530
Яринич Л.А. 7, 906
Яцевич К.К. 3, 197

Прием статей через электронную редакцию на сайте http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour
Предварительно нужно зарегистрироваться как автору, затем в правом верхнем углу страницы выбрать «Отправить рукопись». После завершения загрузки материалов обязательно выбрать опцию «Отправить письмо», в этом случае редакция автоматически будет уведомлена о получении новой рукописи.

«Вавиловский журнал генетики и селекции»/"Vavilov Journal of Genetics and Breeding"
до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС»/
"The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists".

Сетевое издание «Вавиловский журнал генетики и селекции» – реестровая запись СМИ Эл № ФС77-85772, зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 14 августа 2023 г.

Издание включено ВАК Минобрнауки России в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, Russian Science Citation Index на платформе Web of Science, Российский индекс научного цитирования, ВИНИТИ, Web of Science CC, Scopus, PubMed Central, DOAJ, ROAD, Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar.

Открытый доступ к полным текстам:
русскоязычная версия – на сайте ИЦиГ СО РАН, https://vavilovj-icg.ru/
и платформе Научной электронной библиотеки, elibrary.ru/title_about.asp?id=32440

англоязычная версия – на сайте vavilov.elpub.ru/index.php/jour
и платформе PubMed Central, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/3805/

При перепечатке материалов ссылка обязательна.

✉ email: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Издатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»,
проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.
Адрес редакции: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.
Секретарь по организационным вопросам С.В. Зубова. Тел.: (383)3634977.
Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Тел.: (383)3634963*5218.
Начальник отдела: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: В.Д. Ахметова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич.
Компьютерная графика и верстка: Т.Б. Коняхина, О.Н. Савватеева.
Фотография на обложке О.В. Андреенкова.