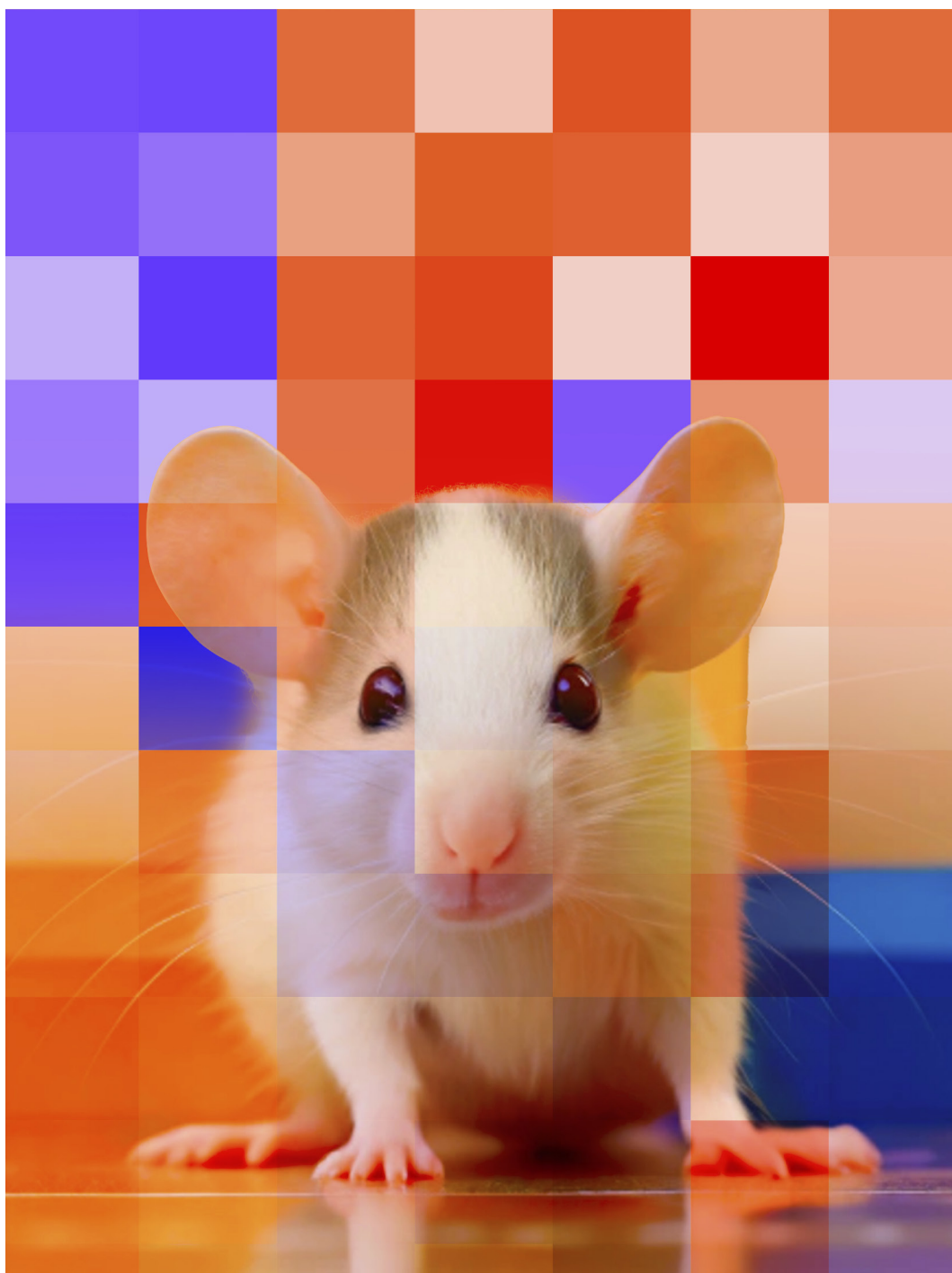


# ВАВИЛОВСКИЙ

## ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

2024 • 28 • 5



Молекулярная и клеточная биология / Генетика и селекция растений / Устойчивость растений  
к стрессовым факторам / Эволюция и видообразование / Генетика животных



Сетевое издание

# ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

## VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

DOI 10.18699/vjgb-24-52

### 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. Афтanas – 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)

Online edition

# VAVILOVSKII ZHURNAL GENETIKI I SELEKTSII

## VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

*Founded in 1997**Published 8 times annually*

DOI 10.18699/vjgb-24-52

**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. Afanassenko*, 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. Beshpalova*, 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

## Молекулярная и клеточная биология

- 467 **ОБЗОР**  
Вольности генома: инсерции фрагментов митохондриальной ДНК в ядерный геном. *М.В. Голубенко, В.П. Пузырёв*
- 476 **ОБЗОР**  
Гипотеза взаимосвязи эпигенетических факторов с транспозонами в формировании памяти. *Р.Н. Мустафин*
- 487 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Получение и характеристика линий эмбриональных стволовых клеток мыши с нокаутом гена *Msrh1* (микроцефалин). *А.М. Юнусова, А.В. Смирнов, Т.А. Шнайдер, И.Е. Пристяжнюк, С.Ю. Кораблёва, Н.Р. Баттулин (на англ. языке)*

## Генетика и селекция растений

- 495 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Сравнительное изучение прорастания семян пшеницы, различающихся антоциановой окраской перикарпа, в условиях естественного и индуцированного старения. *Е.И. Гордеева, О.Ю. Шоева, Е.К. Хлесткина*
- 506 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Изучение влияния транслокации T2DL.2DS-2SS и замещения 5S(5D) от *Aegilops speltoides* на селекционно-ценные признаки мягкой пшеницы. *Р.О. Давоян, И.В. Бебякина, Э.Р. Давоян, А.Н. Зинченко, Ю.С. Зубанова, Д.М. Болдаков, В.И. Басов, Е.Д. Бадаева, И.Г. Адонина, Е.А. Салина*
- 515 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Идентификация количественных локусов признака растрескивания бобов в коллекции сои, выращенной на юго-востоке Казахстана. *Б.Н. Досжанова, А.К. Затыбеков, С.В. Дидоренко, Т. Сузуки, Й. Ямашита, Е.К. Туруспеков (на англ. языке)*
- 523 **ОБЗОР**  
Перспективы биообогащения пшеницы минералами: классическая селекция и агрономия. *И.Н. Леонова, Е.В. Агеева, В.К. Шумный*

## Устойчивость растений к стрессовым факторам

- 536 **ОБЗОР**  
Использование генетического потенциала родов *Thinopyrum* и *Agropyron* для защиты пшеницы от болезней и абиотических стрессов. *Л.Я. Плотникова, В.В. Кнауб*
- 554 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Распространённость и видовой состав вирусов картофеля в Новосибирской области. *В.С. Масленникова, М.Б. Пыхтина, К.А. Табанюхов, Е.В. Шелихова, К.И. Мосалев, А.В. Катохин, А.А. Бондарь, А.Б. Беклемишев, М.И. Воевода*

## Эволюция и видообразование

- 563 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Дождевые черви (*Oligochaeta, Lumbricidae*): соответствие между внутривидовым генетическим разнообразием и плоидностью. *С.В. Шеховцов, Е.А. Держинский, Е.В. Голованова (на англ. языке)*

## Генетика животных

- 571 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Филогеография шерстистого мамонта (*Mammuthus primigenius*) в Минусинской котловине на юге Сибири в позднем плейстоцене. *С.А. Модина, М.А. Куслий, Д.Г. Маликов, А.С. Молодцева*

## Molecular and cell biology

- 467 **REVIEW**  
Liberties of the genome: insertions of mitochondrial DNA fragments into nuclear genome. *M.V. Golubenko, V.P. Puzyrev*
- 476 **REVIEW**  
A hypothesis about interrelations of epigenetic factors and transposable elements in memory formation. *R.N. Mustafin*
- 487 **ORIGINAL ARTICLE**  
Generation and analysis of mouse embryonic stem cells with knockout of the *McpH1* (microcephalin) gene. *A.M. Yunusova, A.V. Smirnov, T.A. Shnaider, I.E. Pristyazhnuk, S.Y. Korableva, N.R. Battulin*

## Plant genetics and breeding

- 495 **ORIGINAL ARTICLE**  
A comparative study on germination of wheat grains with different anthocyanin pigmentation of the pericarp in natural or induced aging. *E.I. Gordeeva, O.Y. Shoeva, E.K. Khlestkina*
- 506 **ORIGINAL ARTICLE**  
A study of the influence of the T2DL.2DS-2SS translocation and the 5S(5D) substitution from *Aegilops speltoides* on breeding-valuable traits of common wheat. *R.O. Davoyan, I.V. Bebyakina, E.R. Davoyan, A.N. Zinchenko, Y.S. Zubanova, D.M. Boldakov, V.I. Basov, E.D. Badaeva, I.G. Adonina, E.A. Salina*
- 515 **ORIGINAL ARTICLE**  
Identification of quantitative trait loci of pod dehiscence in a collection of soybean grown in the southeast of Kazakhstan. *B.N. Doszhanova, A.K. Zatybekov, S.V. Didorenko, T. Suzuki, Y. Yamashita, Y. Turuspekov*
- 523 **REVIEW**  
Prospects for mineral biofortification of wheat: classical breeding and agronomy. *I.N. Leonova, E.V. Ageeva, V.K. Shumny*

## Resistance of plants to stress factors

- 536 **REVIEW**  
Exploitation of the genetic potential of *Thinopyrum* and *Agropyron* genera to protect wheat from diseases and environmental stresses. *L.Ya. Plotnikova, V.V. Knaub*
- 554 **ORIGINAL ARTICLE**  
Distribution and species composition of potato viruses in the Novosibirsk region. *V.S. Maslennikova, M.B. Pykhtina, K.A. Tabanyukhov, E.V. Shelikhova, K.I. Mosalev, A.V. Katokhin, A.A. Bondar, A.B. Beklemishev, M.I. Voevoda*

## Evolution and speciation

- 563 **ORIGINAL ARTICLE**  
Earthworm (*Oligochaeta*, *Lumbricidae*) intraspecific genetic variation and polyploidy. *S.V. Shekhovtsov, Ye.A. Derzhinsky, E.V. Golovanova*

## Animal genetics

- 571 **ORIGINAL ARTICLE**  
Phylogeography of the woolly mammoth (*Mammuthus primigenius*) in the Minusinsk Depression of southern Siberia in the Late Pleistocene. *S.A. Modina, M.A. Kusliy, D.G. Malikov, A.S. Molodtseva*




DOI 10.18699/vjgb-24-53

## Вольности генома: инсерции фрагментов митохондриальной ДНК в ядерный геном

М.В. Голубенко  , В.П. Пузырёв 

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

 maria-golubenko@medgenetics.ru

**Аннотация.** Переход отдельных фрагментов митохондриальной ДНК в ядро и встраивание их в ДНК хромосом являются особым типом генетической изменчивости, характеризующим связь и взаимодействие двух геномов эукариотической клетки. В геноме человека содержится несколько сотен таких инсерций (NUMTS). Статья посвящена обзору современного состояния исследований в этой области. К настоящему времени получены данные о том, что появление новых инсерций мтДНК в ядерном геноме – редкое, но не исключительное событие. Встраивание новых фрагментов мтДНК в ядерный геном происходит при репарации двуниевых разрывов ДНК по механизму негомологичного соединения концов. Наряду с эволюционно стабильными «генетически ископаемыми», встроившимися в ядерный геном миллионы лет назад и общими для многих видов и более крупных таксонов, существуют видоспецифичные, полиморфные и «приватные» NUMTS. Копии фрагментов митохондриальной ДНК в ядерном геноме человека могут интерферировать с митохондриальной ДНК при экспериментальных исследованиях митохондриального генома, таких как генотипирование и изучение гетероплазмы отдельных вариантов мтДНК, анализ метилирования мтДНК, определение числа копий мтДНК в клетке. Кроме того, в некоторых случаях инсерция нескольких копий полной последовательности митохондриального генома может имитировать наследование мтДНК от отца к детям. Вопрос о функциональной значимости NUMTS остается малоизученным. В частности, они могут являться источником изменчивости для модуляции экспрессии и сплайсинга. Роль NUMTS как причины развития моногенной наследственной патологии невелика, поскольку описано всего несколько случаев заболеваний, обусловленных NUMTS. Помимо этого, NUMTS могут служить маркерами для эволюционно-генетических исследований. Отдельный интерес представляет значение NUMTS в эволюции генома эукариот. Постоянный поток функционально неактивных последовательностей ДНК из митохондрий в ядро и его значение можно исследовать с точки зрения современных представлений теории эволюции, связанных с неадаптивностью сложности и центральной ролью стохастических процессов в формировании структуры геномов.

**Ключевые слова:** митохондриальная ДНК; ядерные копии мтДНК; NUMTS; эволюция генома, наследование мтДНК.


**Для цитирования:** Голубенко М.В., Пузырёв В.П. Вольности генома: инсерции фрагментов митохондриальной ДНК в ядерный геном. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(5):467-475. DOI 10.18699/vjgb-24-53

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках программы ФНИ РАН, регистрационный номер НИР 122020300041-7.

## Liberties of the genome: insertions of mitochondrial DNA fragments into nuclear genome

M.V. Golubenko  , V.P. Puzyrev 

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

 maria-golubenko@medgenetics.ru

**Abstract.** The transition of detached fragments of mitochondrial DNA into the nucleus and their integration into chromosomal DNA is a special kind of genetic variability that highlights the relation between the two genomes and their interaction in a eukaryotic cell. The human genome contains several hundreds of insertions of mtDNA fragments (NUMTS). This paper presents an overview of the current state of research in this area. To date, evidence has been obtained that the occurrence of new mtDNA insertions in the nuclear genome is a seldom but not exceptionally rare event. The integration of new mtDNA fragments into the nuclear genome occurs during double-strand DNA break repair through the non-homologous end joining mechanism. Along with evolutionarily stable “genetic fossils” that were integrated into the nuclear genome millions of years ago and are shared by many species, there are NUMTS that could be species-specific, polymorphic in a species, or “private”. Partial copies of mitochondrial DNA

in the human nuclear genome can interfere with mtDNA during experimental studies of the mitochondrial genome, such as genotyping, heteroplasmy assessment, mtDNA methylation analysis, and mtDNA copy number estimation. In some cases, the insertion of multiple copies of the complete mitochondrial genome sequence may mimic paternal inheritance of mtDNA. The functional significance of NUMTS is poorly understood. For instance, they may be a source of variability for expression and splicing modulation. The role of NUMTS as a cause of hereditary diseases is negligible, since only a few cases of diseases caused by NUMTS have been described so far. In addition, NUMTS can serve as markers for evolutionary genetic studies. Of particular interest is the meaning of NUMTS in eukaryotic genome evolution. The constant flow of functionally inactive DNA sequences from mitochondria into the nucleus and its significance could be studied in view of the modern concepts of evolutionary theory suggesting non-adaptive complexity and the key role of stochastic processes in the formation of genomic structure.

**Key words:** mitochondrial DNA; nuclear copies of mtDNA; NUMTS; genome evolution; mtDNA inheritance.

**For citation:** Golubenko M.V., Puzyrev V.P. Liberties of the genome: insertions of mitochondrial DNA fragments into nuclear genome. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(5):467-475. DOI 10.18699/vjgb-24-53

## Введение

Митохондриальная ДНК (мтДНК), локализованная за пределами ядра клетки, является особенной частью генома. Установление симбиоза между предком эукариотической клетки и предком митохондрии стало важнейшим событием биологической эволюции, обусловившим появление эукариот. В процессе дальнейшей эволюции эукариот большинство генов переместилось из митохондрий в ядро. Этот процесс, по-видимому, начался непосредственно после внедрения альфа-протеобактерий в цитоплазму проэукариоты (Панов и др., 2020). Более того, предполагают, что даже мозаичная структура генов эукариот возникла в результате встраивания в геном фрагментов ДНК эндосимбионтов на ранних стадиях эукариотической эволюции, что, в свою очередь, стимулировало компартиментализацию клетки и обособление ядра (Koonin, 2006; Rogozin et al., 2012).

Геномы современных митохондрий содержат очень ограниченный набор генов. У большинства животных мтДНК кодирует только 13 белковых субъединиц дыхательной цепи, а также рибосомные и транспортные РНК. Остальные гены давно и необратимо «переселились» в ядро. Тем не менее сравнительный анализ геномных последовательностей показывает, что встраивание новых фрагментов мтДНК в ядерный геном происходит и в настоящее время, уже как микроэволюционный процесс. Таким образом, в хромосомах современных эукариот – в частности, млекопитающих, и в том числе в геноме человека, есть множество участков, гомологичных митохондриальному геному. Для этих последовательностей используют название NUMT, или NUMTS (NUclear MiTochondrial Sequences – ядерные митохондриальные последовательности). Локализация NUMTS в геноме часто ассоциирована с повторяющимися элементами и транспозонами, но сами по себе эти фрагменты не являются мобильными генетическими элементами. «Предназначение» NUMTS пока не определено. Они вызывают интерес и с практической точки зрения, так как могут проявлять патологический эффект, и в теоретическом аспекте, поскольку могут представлять собой отдельный способ эволюции генома.

Статья посвящена обзору современного состояния исследований феномена NUMTS и их значению в жизни генома человека.

## Распространенность NUMTS в геноме человека

Уже вскоре после определения полной последовательности митохондриальной ДНК человека были обнаружены гомологичные мтДНК фрагменты, встроенные в последовательность ДНК хромосом (Tsuzuki et al., 1983). По мере секвенирования генома человека и анализа гомологии NUMTS с современной мтДНК человека и других видов было показано, что инсерции фрагментов мтДНК в хромосомы – продолжающийся процесс (Mourier et al., 2001). NUMTS найдены на всех хромосомах и чаще всего локализованы в областях, богатых различными повторами. С развитием технологий секвенирования, биоинформатики и накоплением данных об индивидуальных геномах выявляется все больше таких инсерций, и становится ясно, что NUMTS – распространенный феномен. Например, последовательность референсного генома человека версии GRCh37/hg19 содержит 766 вставок фрагментов митохондриального генома, гомологичных современной референсной последовательности мтДНК (Calabrese et al., 2012). Чуть позже анализ данных проекта «1000 геномов» (999 человек из 20 популяций) выявил 141 полиморфный сайт NUMTS в ядерном геноме в дополнение к «фиксированным» в популяциях инсерциям. Из них 42 % полиморфных NUMTS были расположены в интронах генов, а 43 % – в межгенных регионах. Большинство этих NUMTS «младше» миллиона лет (Dayama et al., 2014).

Проведенный недавно анализ полных геномов 66 тыс. индивидов, в том числе более 10 тыс. трио (Wei et al., 2022), выявил уже более 1500 новых NUMTS, подавляющее большинство которых были редкими в популяции либо «приватными», т.е. найденными только у одного индивида. Оценена также частота инсерций NUMTS *de novo*: примерно одна на 10000 рождений и примерно одна на 1000 опухолей. Оценки времени интеграции в ядерный геном для нескольких сотен NUMTS показали, что в 90 % случаев эти события произошли не более 100 тыс. лет назад (Wei et al., 2022). Некоторые показатели, характеризующие многообразие NUMTS в геноме человека, представлены в табл. 1. Следует отметить, что общая длина NUMTS составляет около 630 тыс. п. н. (Tao et al., 2023), или примерно 0.02 % от всей длины генома человека.



**Таблица 1.** Характеристика «ландшафта» NUMTS в ядерном геноме человека

Литературный источник	Количество NUMTS	Медианное значение длины, п. н.	Общая длина, п. н.	Среднее значение гомологии с мтДНК, %
Ramos et al., 2011	755	225	548 250	79.2
Calabrese et al., 2012	766	214	541 113	79.5
Wei et al., 2022	1637 (включая полиморфные)	156	ND	ND
Tao et al., 2023	863	194	631 156	ND
Uvizl et al., 2024	846	ND	548 500	80.9

Примечание. ND – нет данных.

В зависимости от применяемых алгоритмов поиска минимальная длина выявляемых фрагментов мтДНК составляет от 30 п. н., и большинство их короче 500 п. н. Однако встречаются инсерции практически полной последовательности митохондриального генома. В частности, в межгенном регионе на хромосоме 4 расположена вставка длиной 14836 п. н., гомологичная участку длиной 14904 п. н. в последовательности мтДНК (позиции 661–15564) (Calabrese et al., 2012).

Митохондрии – не единственные органеллы, «посылающие» в ядро фрагменты своей ДНК. Этот процесс характерен и для пластид (Zhang et al., 2024). Кроме того, у разных биологических видов это явление может быть более или менее распространенным. Так, поиск NUMTS в геномах 13 различных видов выявил очень большие межвидовые различия: если нематода, представители двукрылых (анофелес, дрозofiла) или рыба фугу имеют в своем ядерном геноме лишь несколько фрагментов мтДНК, то у человека, некоторых насекомых, растений их несколько сотен (Richly, Leister, 2004; Leister, 2005). При этом количество NUMTS может зависеть от размера генома и особенностей процесса видообразования.

Приведенные данные говорят о том, что встраивание фрагментов мтДНК в ДНК хромосом – не редкий случай, а естественное свойство динамики генома человека, и, соответственно, его необходимо учитывать и исследовать в различных аспектах.

### Механизм появления новых NUMTS

Практически все исследования показывают, что общим механизмом встраивания фрагментов мтДНК в ядерный геном является негомологичное соединение концов (Non-Homologous End Joining, NHEJ) как способ репарации двуниевых разрывов ДНК (Газиев, Шайхаев, 2010). Как правило, NUMTS ассоциированы с мобильными генетическими элементами: так, при исследовании 271 NUMTS, характерных для генома человека, было показано, что большинство из них расположены в пределах 150 п. н. от каких-либо повторяющихся элементов, преимущественно LINE и Alu повторов, или даже внутри этих последовательностей (Mishmar et al., 2004). Недавно проведенный поиск и анализ NUMTS в геномах 45 видов млекопитающих, в сущности, подтвердил этот факт (Uvizl et al., 2024).

В работе исследователей из Японии (Onozawa et al., 2015) было показано, что случаи инсерций, относящиеся ко второму классу «матрично-инсерционного полимор-

физма» (templated sequence insertion polymorphism, TSIP), имели характеристики, согласующиеся с их появлением в результате репарации двуцепочечных разрывов по механизму негомологичного соединения концов, и примечательно, что более чем в 20 % случаев «донором» ДНК для таких инсерций служила именно митохондриальная ДНК (Onozawa et al., 2015).

Согласно результатам экспериментов по облучению куриных яиц, у 25 % выживших эмбрионов (2 из 8) были обнаружены новые вставки фрагментов мтДНК (Абдуллаев и др., 2013). В статье о случае патогенной инсерции NUMTS *de novo*, приведшей к развитию синдрома Паллистера–Холла, упоминается, что семья, в которой родился больной ребенок, проживала на территории, подвергшейся воздействию последствий аварии на Чернобыльской АЭС в 1986 г. (Turner et al., 2003). Логично предположить, что, поскольку ионизирующая радиация приводит к двуниевым разрывам в ДНК, то вероятность встраивания фрагментов мтДНК в ядерный геном повышается, так как появление новых NUMTS ассоциировано с процессом репарации этих повреждений.

Следует отметить, что в неделящейся клетке ядерный и митохондриальный геномы отделены друг от друга в общей сложности четырьмя мембранами (двойная мембрана оболочки ядра и двойная мембрана митохондрий). Для встраивания фрагмента мтДНК в ДНК хромосомы необходимо, чтобы этот фрагмент смог попасть в ядро. К настоящему времени предложено несколько возможных путей такого переноса. Наиболее приемлемой является гипотеза, что фрагменты мтДНК, образующиеся при воздействии активных форм кислорода, попадают в цитоплазму в результате изменений в митохондриальной мембране (открытие пор, слияние/деление митохондрий и др.) и затем транспортируются в ядро в составе вакуолей (Puertas, González-Sánchez, 2020).

### Исследование NUMTS в эволюционной генетике

В зависимости от времени происхождения NUMTS могут дать информацию об эволюционной истории человеческого вида (Hazkani-Kovo, 2009). При этом можно выделить две особенности эволюции NUMTS по сравнению с гомологичными им регионами мтДНК: с одной стороны, они являются псевдогенами, поэтому отбор на них не действует и мутационный процесс более «равномерен», а с другой стороны, скорость молекулярной эволюции после

встраивания в ядерный геном снижается в соответствии с общими различиями в частоте мутаций для ядерной и митохондриальной ДНК. То есть, с одной стороны, «биологические часы» для NUMTS работают более точно, а с другой – это своего рода «генетические ископаемые», содержащие информацию о гаплотипах мтДНК, которые могли не сохраниться в современных популяциях, а также являются «аутгруппой» для внутривидовой филогении (Bravi et al., 2006). Интересно, например, что два NUMTS в геноме человека, гомологичные гену *COI*, содержат нуклеотидные замены (по сравнению с референсной последовательностью мтДНК), характерные для наиболее древней митохондриальной супергаплогруппы L (Mishmar et al., 2004).

С помощью сравнительного анализа полиморфных NUMTS в геномах *Homo sapiens sapiens*, *H. sapiens neanderthalensis* и *H. sapiens denisova* были выявлены пять инсерций фрагментов мтДНК, произошедших в течение эволюции рода *Homo* и сохранившихся в геномах современных людей. Из них две NUMTS, найденные в геномах нескольких индонезийцев, произошли от митохондриального генома денисовцев, но в геном современного человека попали уже в составе фрагментов ядерной ДНК (Bücking et al., 2019). Анализ NUMTS в геномах человекообразных обезьян выявил несколько фрагментов, для которых характер дивергенции их последовательности от современных мтДНК этих видов указывал на то, что они попали в геномы гоминид тоже в составе ядерной ДНК вследствие гибридизации с неизвестными вымершими видами (Poradin et al., 2022). Интересно, что при анализе времени появления в геноме человека *Homo*-специфичных NUMTS возникновение значительного числа инсерций (треть из 18 анализируемых) по времени совпадало с предполагаемым временным интервалом происхождения рода *Homo*, а также с радикальными климатическими изменениями – около 2.5–2.9 млн лет назад. Таким образом, видообразование, вероятно, ассоциировано с увеличением интенсивности встраивания новых NUMTS в геном. Однако остается открытым вопрос о том, являются ли эти инсерции лишь маркерами периодов геномной нестабильности (“riders”) или же они играют значимую роль в ви-

дообразовании, изменяя структурную и экспрессионную архитектуру генома (“drivers”) (Gunbin et al., 2017). В пользу первой гипотезы свидетельствуют данные об аналогичном «взрыве» частоты NUMTS у сумчатых куниц, произошедшем в этот же период (Hazkani-Covo, 2022). Вторая гипотеза заслуживает внимания в связи с тем фактом, что NUMTS нередко обнаруживаются в участках открытого хроматина, ассоциированных с гиперчувствительностью к ДНКазе I и с регуляцией экспрессии (Wang, Timmis, 2013). О неравномерности скорости инсерций ДНК органелл в хромосомы в процессе эволюции говорят также результаты анализа гомологии NUMTS и «родительских» геномов органелл: распределение NUMTS по степени идентичности митохондриальному геному показывает, что хотя эти события происходят на всем протяжении истории вида, скорость процесса непостоянна. В частности, у *Homo sapiens* большинство NUMTS имеют от 70 до 85 % идентичности с митохондриальным геномом, а, например, у фитофторы – около 100 % (Hazkani-Covo, Martin, 2017).

### Патологические эффекты NUMTS

Случайная вставка любого фрагмента ДНК в экзонные и регуляторные последовательности генов может иметь патогенный эффект. Случаи наследственных болезней, вызванных *de novo* инсерциями фрагментов мтДНК в ядерные гены, действительно описаны, но надо заметить, что они единичны (табл. 2).

В 2002 г. был описан первый случай заболевания, связанного с NUMTS, – тяжелая недостаточность фактора свертывания VII, наблюдаемая у пациентки, которая являлась компаунд-гетерозиготой: одна копия гена имела делецию 7 нуклеотидов, а на другой произошла инсерция 251 п. н. из гена *MT-RNR1* в полипиримидиновый тракт около акцепторного сайта сплайсинга в 4-м интроне *F7* (Borensztajn et al., 2002). В 2003 г. был охарактеризован спорадический случай синдрома Паллистера–Холла: инсерция *de novo* 72 п. н. из мтДНК в экзон 14 гена *GLI3* привела к сдвигу рамки считывания и образованию преждевременного стоп-кодона (Turner et al., 2003). Примечательно, что аллель со вставкой мт-фрагмента был отцовского происхождения. Кроме того, опубликовано еще

**Таблица 2.** Известные случаи заболеваний, обусловленные инсерциями фрагментов мтДНК

Заболевание	Ген	Событие	Литературный источник
Недостаточность фактора свертывания VII	<i>F7</i>	Инсерция 251 п. н. из MT-TF и MT-RNR1 (591–809) около акцепторного сайта сплайсинга в интроне 4, приводящая к пропуску экзона 5 при сплайсинге	Borensztajn et al., 2002
Синдром Ушера IC	<i>USH1C</i>	Инсерция 36 п. н. в экзон 9 из MT-TL2 (12 253–12 288)	Ahmed et al., 2002
Синдром Паллистера–Холла	<i>GLI3</i>	Инсерция <i>de novo</i> 72 п. н. из MT-TS2 и MT-TL2 (12 244–12 315) в экзон 14, сдвиг рамки и преждевременный стоп-кодон	Turner et al., 2003
Муколипидоз, тип IV	<i>MCOLN1</i>	Инсерция 93 п. н. из MT-ND5 в экзон 2, нарушение сплайсинга	Goldin et al., 2004
Лиссэнцефалия	<i>PAFAH1B1</i>	Инсерция 130 п. н. в экзон 2, перед стартом трансляции, из MT-ATP8 (8479–8545) и MT-ATP6 (8775–8835) либо из NUMTS на хромосоме 1	Millar et al., 2010
Х-сцепленный синдром высокого IgM	<i>CD40LG</i>	Инсерция 147 п. н. из MT-RNR1 (664–805) в экзон 1, сдвиг рамки и преждевременный стоп-кодон	Li X. et al., 2021

несколько описаний патогенных NUMTS, разрушающих сайты сплайсинга или сдвигающих рамку считывания. Учитывая большое число проводимых в настоящее время генетических тестов, которые потенциально способны выявить такие инсерции (таргетное и экзомное секвенирование), можно сказать, что случаи патогенетически значимых NUMTS исключительно редки.

В сравнении с немногочисленными случаями NUMTS, приведшими к развитию наследственных болезней и синдромов вследствие нарушения функции соответствующего гена, в злокачественных опухолях вставки *de novo* в пределах экзонов и регуляторных последовательностей не так уж редки. Например, в одном исследовании в пределах генов были идентифицированы 220 соматических «опухоль-специфичных» NUMTS; из них 13 были расположены в кодирующих регионах генов (в том числе 3 и 4 нарушали соответственно терминирующий и стартовый кодоны), а 16 располагались в 3'- или в 5'-нетранслируемых регионах (Wei et al., 2022). Накопление соматических NUMTS с возрастом может также способствовать старению.

Недавно было показано, что инсерции фрагментов мтДНК в интроны могут оказывать влияние на экспрессию гена: транскрипцию и сплайсинг, особенно если встраиваемые фрагменты содержат гены тРНК, которые способны образовывать вторичные структуры. В частности, в исследовании (Hoser et al., 2020) изучено влияние таких инсерций митохондриальных генов тРНК (*nimtRNA*) на сплайсинг с использованием сплайсинг-репортерного генного конструкта. Проведенные эксперименты показали, что *nimtRNA*, вставленные в интрон гена-репортера, усиливают сплайсинг пре-мРНК в зависимости от их числа и локализации, а также от эффективности распознавания сайта сплайсинга, причем инсерция ядерных тРНК не имела такого эффекта. Кроме того, в этой работе продемонстрировано, что частичная делеция *nimtRNA(Lys)*, расположенного в 28-м интроне гена *PPFIBP1*, снижает вероятность включения в мРНК экзона 29 (Hoser et al., 2020). Таким образом, некоторые NUMTS могут выполнять регуляторную функцию.

## NUMTS как источник артефактов в исследованиях митохондриальной ДНК

### Гетероплазмия мтДНК

При исследовании гетероплазмии мтДНК NUMTS могут существенно влиять на результаты, особенно в случае низкого уровня мутантного аллеля (Maude et al., 2019; Хусе et al., 2023). В частности, G. Dayama с коллегами (Dayama et al., 2014) идентифицировали 59 позиций в мтДНК, где может систематически выявляться ложная гетероплазмия, обусловленная полиморфными инсерциями в ядерном геноме. Сравнение методов обогащения для NGS (гибридизация либо ПЦР длинных фрагментов) и подходов к выравниванию (использование всего генома или только мтДНК, установление порогового уровня гетероплазмий) показало, что заметная часть «альтернативных» аллелей в гетероплазмичных позициях на самом деле соответствует аллелям NUMTS, и это влияние больше выражено при использовании низкого порога гетероплазмии, гибриди-

зационного метода обогащения, а также мтДНК как единственного референса для выравнивания. С другой стороны, учет этих факторов приводит к снижению показателей покрытия и упущению истинно гетероплазмичных позиций в мтДНК (Li M. et al., 2012).

Анализ полных митогеномов почти тысячи индивидов из шведской популяции показал, что при средней глубине прочтения мтДНК более 2000x около 40 % (373 из 934) гаплотипов мтДНК имеют «гетероплазмичные» варианты с частотой аллеля более 2 %, т. е. выше «уровня шума», которые обусловлены вариантами в NUMTS (Sturk-Andreaggi et al., 2023). При этом 31 «гетероплазмичная» позиция характеризовалась долей альтернативного (ассоциированного с NUMTS) аллеля более 10 %, но авторы отмечают, что в этих случаях глубина прочтения мтДНК была менее 100x (Sturk-Andreaggi et al., 2023). Учитывая, что мутации мтДНК, приводящие к развитию митохондриальных заболеваний, тоже являются гетероплазмичными и уровень гетероплазмии может колебаться в зависимости от ткани, важно принимать во внимание существование NUMTS при проведении генетической диагностики (Yao et al., 2008).

### NUMTS и оценка уровня метилирования митохондриальной ДНК

Эпигенетические исследования митохондриального генома характеризуются противоречивыми результатами: одни группы исследователей выявляют довольно высокий уровень метилирования цитозинов в мтДНК, другие – очень низкий (Byun et al., 2013; Hong et al., 2013; Зиновкина, Зиновкин, 2015; Maresca et al., 2015; Patil et al., 2019). Анализ публикаций позволяет предположить, что получаемые оценки доли метилированных цитозинов зависят от используемого метода. Так как NUMTS представляют собой, в сущности, псевдогены, то следует ожидать, что они будут метилированы, и это действительно подтверждается данными прямого определения уровня метилирования с помощью технологии Oxford NanoPore (Wei et al., 2022). В частности, наши собственные исследования показали крайне низкий (на уровне ошибки метода) уровень метилирования цитозинов в регуляторном регионе (D-петле) мтДНК; эта оценка была получена путем секвенирования (NGS) ПЦР-продуктов с использованием ДНК, обработанной бисульфитом натрия, в качестве матрицы (Golubenko et al., 2018).

В последних публикациях по этому вопросу было показано, что истинный уровень метилирования цитозинов в мтДНК действительно составляет менее 1 %, а более высокие значения вызваны «интерференцией» сигналов с ядерных псевдогенов (т. е. NUMTS) или влиянием нуклеотидного контекста на коллинг (Vicci et al., 2021; Guitton et al., 2022; Shao et al., 2023). Вместе с тем следует отметить, что в митохондриях обнаружена ДНК-метилтрансфераза DNMT1; митохондриальная изоформа этого фермента синтезируется с альтернативного транскрипта (Shock et al., 2011). Следовательно, нельзя полностью исключать существование феномена метилирования ДНК в митохондриях – например, это может происходить при запрограммированной или патологической деактивации/деградации мтДНК.



### NUMTS и определение числа копий мтДНК в клетке

Наличие NUMTS является основной трудностью при разработке и использовании методов количественного определения числа копий мтДНК в клетке, т. е. отношения числа копий участка мтДНК к числу копий «контрольного» ядерного гена. В настоящее время применяют несколько методов определения числа копий: это ПЦР в реальном времени с использованием флуоресцентных красителей, в том числе TaqMan-зондов, а также цифровая ПЦР. При подборе специфических только к мтДНК праймеров для проведения таких реакций исследователь сталкивается со значительными сложностями, так как практически вся последовательность мтДНК присутствует в виде NUMTS в ядерном геноме, и при этом значительная ее часть представлена большим числом фрагментов, иногда сравнимым с числом копий мтДНК в клетке. Кроме того, каждый индивид имеет в среднем четыре NUMTS, отсутствующих в референсной последовательности генома (Wei et al., 2022). Таким образом, даже тщательный BLAST-анализ последовательности праймеров и проб и степени гомологии NUMTS и мтДНК, в совокупности с высоким уровнем полиморфизма самой мтДНК, не всегда позволяет адекватно оценивать число копий мтДНК в клетке. Вероятно, для этих целей следует использовать одновременно несколько участков мтДНК.

### NUMTS и ДНК-идентификация

Учитывая, что события встраивания в ядерный геном фрагментов мтДНК *de novo* не так уж редки, а длина их может быть велика, следует с осторожностью интерпретировать данные, получаемые судебными экспертами при проведении молекулярно-генетических экспертиз. Если крупная инсерция мтДНК сохранится в геноме в течение нескольких поколений или если ребенок «наследует» частично генотип мтДНК родителей в своем ядерном геноме вследствие инсерции *de novo*, то анализ образца тотальной ДНК даст смесь двух гаплотипов (Lutz-Bonengel et al., 2021) и потенциально может привести к ложной ДНК-идентификации. Кроме того, коамплификация NUMTS может, вероятно, происходить и в других случаях (например, при анализе деградированного образца ДНК, когда число копий мтДНК тоже мало и сопоставимо с числом копий гомологичных NUMTS в исследуемом образце (Bravi et al., 2006)). Показано, что при анализе данных, полученных с использованием методов параллельного секвенирования (NGS, или MPS), возможно отфильтровать NUMTS с помощью методов биоинформатики, однако в криминалистике исследователи часто имеют дело с деградированными образцами ДНК, для которых удается получить только короткие фрагменты, а в этом случае такая биоинформатическая «фильтрация» менее эффективна (Marshall, Parson, 2021).

### «Отцовское наследование» мтДНК

Интересна история поиска возможности наследования мтДНК человека по отцовской линии. Описание случаев предполагаемого вклада мтДНК из митохондрий сперматозоида в общий пул мтДНК зиготы и развивающегося из нее организма периодически появляется в научной печати.

В последней резонансной публикации на эту тему (Luo et al., 2018) продемонстрировано, что как минимум в трех родословных дети наследовали мтДНК отца в определенной пропорции и затем в той же пропорции передавали ее некоторым из своих детей. Авторы предположили, что возможность наследования отцовской мтДНК обусловлена вариантом некоего ядерного гена с доминантным эффектом. Статья породила настоящую научную дискуссию (Luo et al., 2019; Lutz-Bonengel, Parson, 2019; McWilliams, Suomalainen, 2019), а также стимулировала дальнейшие исследования в этой области, в результате которых было показано, что подобные случаи на самом деле объясняются вставками конкатемеров (тандемных линейных копий) мтДНК в ядерный геном, так называемых mega-NUMTS (Wei et al., 2020; Bai et al., 2021). Один из таких конкатемеров, обнаруженный на хромосоме 14, состоял из 50 копий мтДНК (Lutz-Bonengel et al., 2021).

И все же заключительного вердикта по теме «наследование отцовского митохондриального генома» до сих пор не вынесено, поскольку неясно, как именно обеспечивается облигатная элиминация отцовских мтДНК в зиготе. Исследования показывают, что универсального механизма такой элиминации не существует. К примеру, у нематод митохондрии сперматозоида «перевариваются» в зиготе после оплодотворения по механизму аутофагии, и если этого не произошло, то эмбрионы нежизнеспособны. У мышей (и, вероятно, человека) отцовский митохондриальный геном элиминируется уже в митохондриях сперматозоида, которые, таким образом, вообще не содержат мтДНК. Однако если по какой-то причине мтДНК не полностью деградировала, то ее присутствие в эмбрионе мышей может проследиваться до стадии морулы (Luo et al., 2013).

В связи с этим вызывают интерес результаты экспериментов по введению человеческой мтДНК в зиготы мышей с помощью микроинъекций, проведенные в Институте экспериментальной медицины в Санкт-Петербурге. У некоторых эмбрионов и новорожденных мышеч человеческая мтДНК сохранялась в некоторых тканях, а в отдельных случаях передавалась потомству F<sub>1</sub> и даже F<sub>2</sub> (Sokolova et al., 2004; Bass et al., 2006). Позже американские исследователи продемонстрировали, что мышечные и человеческие митохондрии успешно объединяются друг с другом в экспериментах по слиянию клеток, а также получили «ксеноцибриды», содержащие ядро клетки мыши и митохондрии человека, хотя они не могли расти на среде, требующей нормальной функции митохондрий (Yoon et al., 2007). Таким образом, образование химерных митохондрий человека и мыши в принципе возможно, и вероятно, что после микроинъекции в зиготу мыши человеческие митохондрии соединялись с мышечными. Происходило ли в данном случае встраивание мтДНК человека в ядерный геном мышей, неизвестно. Для выяснения этого нужны дополнительные эксперименты, но учитывая то, что человеческая мтДНК была найдена у малой части потомства, да и не во всех тканях, а также то, что инъекции митохондрий проводили в уже оплодотворенные зиготы, можно предположить, что она содержалась не в ядре, а именно в митохондриях.

## Заключение

Феномен транслокации фрагментов мтДНК в ядерный геном представляет собой особый тип геномной изменчивости, который заслуживает пристального внимания исследователей. Результаты работ последних лет показали, что распространенность этих событий гораздо выше, чем считалось ранее. Геном митохондрий неожиданно предстал не подчиненным «узником» эукариотической клетки, а самостоятельным источником нового материала для ядерного генома. Остается пока неизвестной роль этого явления в жизни клетки. Возможно, его понимание выходит за рамки классической «детерминистской» генетики и может быть исследовано в парадигме нового, «постмодернистского» подхода, предполагающего множественность паттернов и процессов эволюции живых форм, а также центральную роль непредсказуемых событий, т. е. неадаптивность основного пути эволюции (Кунин, 2014). Это предполагает необходимость стохастического преобразования генома в эволюции, «непостоянство генома» (Хесин, 1985) или «вольности генома» (Пузырев, 2002). Отметим, что несмотря на более чем полувековое развитие генетики в русле классических, упрощенных представлений о генах, мутациях и наследственности, мысли о подвижности генов, скачкообразности мутационных изменений, множественности проявления генов на уровне фенотипа высказывались многими исследователями начиная с конца XIX в. (Пузырев, 2002; Голубовский, 2011).

Интересно, что в предложенной Е.В. Куниным модели эволюции энтропии и сложности генома рассматриваются два сценария: «высокоэнтропийный», который сопровождается снижением плотности генов, и противоположный ему «низкоэнтропийный», заключающийся в оптимизации генома и максимальной плотности информации (Кунин, 2014). Можно сказать, что явление переноса фрагментов мтДНК в ядерный геном способствует его эволюции по «высокоэнтропийному» пути, в то время как сам митохондриальный геном пошел по противоположному «низкоэнтропийному» сценарию. Примечательно, что эти два пути определяются в том числе эффективной численностью популяции: она невелика в первом случае (высокоэнтропийном) и высока во втором (низкоэнтропийном) – и это условие, кстати, удивительным образом соотносится с диплоидностью (в большинстве случаев) эукариотических клеток, с одной стороны, и большим числом населяющих их митохондрий, с другой. Следует также отметить, что именно упрощение генома, следующее за скачкообразным увеличением его сложности, предполагается данной моделью как общая тенденция в эволюции (Wolf, Koornin, 2013), а «увеличение энтропии генома... может закономерно рассматриваться как “геномный синдром”, как неспособность организмов с небольшим эффективным размером популяции справиться с распространением эгоистичных элементов и других процессов, ведущих к росту энтропии» (Кунин, 2014, с. 286).

Если же рассматривать NUMTS с «практической» точки зрения, то на сегодня продемонстрировано, что ядерные копии фрагментов митохондриальной ДНК в геноме человека могут вносить нежелательный шум в данные, получаемые при экспериментальных исследованиях митохондриального генома, а также, возможно, несут неко-

торую функциональную нагрузку – по крайней мере, являются источником изменчивости для модуляции экспрессии и сплайсинга. Кроме того, они обладают значительным потенциалом как полиморфные маркеры для эволюционно-генетических исследований. NUMTS могут участвовать в видообразовании, однако этот вопрос требует дополнительных исследований. Значение NUMTS в развитии моногенной наследственной патологии, по-видимому, невелико, а их роль в старении и развитии многофакторных заболеваний, в том числе онкологических, еще предстоит изучить.

## Список литературы / References

- Абдуллаев С.А., Фоменко Л.А., Кузнецова Е.А., Газиев А.И. Экспериментальное выявление интеграции мтДНК в ядерном геноме, индуцированной ионизирующей радиацией. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2013;53(4):380-388. DOI 10.7868/S0869803113040036
- [Abdullaev S.A., Fomenko L.A., Kuznetsova E.A., Gaziev A.I. Experimental detection of integration of mtDNA in the nuclear genome induced by ionizing radiation. *Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya = Radiation Biology. Radioecology*. 2013;53(4):380-388. DOI 10.7868/S0869803113040036 (in Russian)]
- Газиев А.И., Шайхаев Г.О. Ядерно-митохондриальные псевдогены. *Молекуляр. биология*. 2010;44(3):405-417
- [Gaziev A.I., Shaikhaev G.O. Nuclear mitochondrial pseudogenes. *Mol. Biol.* 2010;44(3):358-368. DOI 10.1134/S0026893310030027]
- Голубовский М.Д. Нестабильность генов и мобильные элементы: к истории изучения и открытия. *Ист.-биол. исследования*. 2011;3(4):60-78
- [Golubovsky M.D. Gene instability and mobile elements: a history of its research and discovery. *Istoriko-biologicheskie Issledovaniya = Studies in the History of Biology*. 2011;3(4):60-78 (in Russian)]
- Зиновкина Л.А., Зиновкин Р.А. Метилирование ДНК, митохондрии и программируемое старение. *Биохимия*. 2015;80(12):1830-1837
- [Zinovkina L.A., Zinovkin R.A. DNA methylation, mitochondria, and programmed aging. *Biochemistry (Moscow)*. 2015;80(12):1571-1577. DOI 10.1134/S0006297915120044]
- Кунин Е.В. Логика случая. О природе и происхождении биологической эволюции. М., 2014
- [Koonin E.V. Logic of Chance. The Nature and Origin of Biological Evolution. Moscow, 2014 (in Russian)]
- Панов А.В., Голубенко М.В., Даренская М.А., Колесников С.И. Происхождение митохондрий и их роль в эволюции жизни и здоровья человека. *Acta Biomedica Scientifica*. 2020;5(5):12-25. DOI 10.29413/ABS.2020-5.5.2
- [Panov A.V., Golubenko M.V., Darenskaya M.A., Kolesnikov S.I. The origin of mitochondria and their role in the evolution of life and human health. *Acta Biomedica Scientifica*. 2020;5(5):12-25. DOI 10.29413/ABS.2020-5.5.2 (in Russian)]
- Пузырев В.П. Вольности генома и медицинская патогенетика. *Бюл. сиб. медицины*. 2002;2:16-29. DOI 10.20538/1682-0363-2002-2-16-29
- [Puzyrev V.P. Liberties of genome and medical pathogenetics. *Byulleten' Sibirskoj Meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*. 2002;2:16-29. DOI 10.20538/1682-0363-2002-2-16-29 (in Russian)]
- Хесин Р.Б. Непостоянство генома. М., 1985
- [Khesin R.B. Inconstancy of the Genome. Moscow, 1985 (in Russian)]
- Ahmed Z.M., Smith T.N., Riazuddin S., Makishima T., Ghosh M., Bokhari S., Menon P.S., Deshmukh D., Griffith A.J., Riazuddin S., Friedman T.B., Wilcox E.R. Nonsyndromic recessive deafness *DFNB18* and Usher syndrome type IC are allelic mutations of *USH1C*. *Hum. Genet.* 2002;110(6):527-531. DOI 10.1007/s00439-002-0732-4

- Bai R., Cui H., Devaney J.M., Allis K.M., Balog A.M., Liu X., Schnur R.E., Shapiro F.L., Brautbar A., Estrada-Veras J.I., Hochstetler L., McConkie-Rosell A., McDonald M.T., Solomon B.D., Hofherr S., Richard G., Suchy S.F. Interference of nuclear mitochondrial DNA segments in mitochondrial DNA testing resembles biparental transmission of mitochondrial DNA in humans. *Genet. Med.* 2021;23(8):1514-1521. DOI 10.1038/s41436-021-01166-1
- Bass M.G., Sokolova V.A., Kustova M.E., Grachyova E.V., Kidgotko O.V., Sorokin A.V., Vasilyev V.B. Assaying the probabilities of obtaining maternally inherited heteroplasmy as the basis for modeling OXPHOS diseases in animals. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; 1757(5-6):679-685. DOI 10.1016/j.bbabi.2006.05.021
- Bicci I., Calabrese C., Golder Z.J., Gomez-Duran A., Chinnery P.F. Single-molecule mitochondrial DNA sequencing shows no evidence of CpG methylation in human cells and tissues. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(22):12757-12768. DOI 10.1093/nar/gkab1179
- Borensztajn K., Chafa O., Alhenc-Gelas M., Salha S., Reghis A., Fischer A.M., Tapon-Breaudière J. Characterization of two novel splice site mutations in human factor VII gene causing severe plasma factor VII deficiency and bleeding diathesis. *Br. J. Haematol.* 2002;117(1):168-171. DOI 10.1046/j.1365-2141.2002.03397.x
- Bravi C.M., Parson W., Bandelt H.-J. Numts revisited. In: Bandelt H.-J., Macaulay V., Richards M. (Eds.) *Human Mitochondrial DNA and the Evolution of Homo sapiens*. Nucleic Acids and Molecular Biology. Vol. 18. Berlin; Heidelberg: Springer, 2006;31-46. DOI 10.1007/3-540-31789-9\_3
- Bücking R., Cox M.P., Hudjashov G., Saag L., Sudoyo H., Stoneking M. Archaic mitochondrial DNA inserts in modern day nuclear genomes. *BMC Genomics.* 2019;20(1):1017. DOI 10.1186/s12864-019-6392-8. Erratum in: *BMC Genomics.* 2020;21(1):55
- Byun H.M., Panni T., Motta V., Hou L., Nordio F., Apostoli P., Bertazzi P.A., Baccarelli A.A. Effects of airborne pollutants on mitochondrial DNA methylation. *Part. Fibre Toxicol.* 2013;10:18. DOI 10.1186/1743-8977-10-18
- Calabrese F.M., Simone D., Attimonelli M. Primates and mouse NumtS in the UCSC Genome Browser. *BMC Bioinformatics.* 2012; 13(Suppl.4):S15. DOI 10.1186/1471-2105-13-S4-S15
- Dayama G., Emery S.B., Kidd J.M., Mills R.E. The genomic landscape of polymorphic human nuclear mitochondrial insertions. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(20):12640-12649. DOI 10.1093/nar/gku1038
- Goldin E., Stahl S., Cooney A.M., Kaneski C.R., Gupta S., Brady R.O., Ellis J.R., Schiffmann R. Transfer of a mitochondrial DNA fragment to *MCOLN1* causes an inherited case of mucopolipidosis IV. *Hum. Mutat.* 2004;24(6):460-465. DOI 10.1002/humu.20094
- Golubenko M.V., Markov A.V., Zarubin A.A., Slepsov A.A., Kazantsev A.N., Makeeva O.A., Markova V.V., Koroleva I.A., Nazarenko M.S., Barbarash O.L., Puzyrev V.P. DNA methylation level in regulatory regions of mtDNA and three mitochondria-related nuclear genes in atherosclerosis. In: *Systems Biology and Biomedicine (SBioMed-2018): Symposium. Abstracts. The Eleventh Int. Conf., Novosibirsk, 21–22 Aug. 2018.* Novosibirsk, 2018;45
- Guitton R., Dölle C., Alves G., Ole-Björn T., Nido G.S., Tzoulis C. Ultra-deep whole genome bisulfite sequencing reveals a single methylation hotspot in human brain mitochondrial DNA. *Epigenetics.* 2022;17(8):906-921. DOI 10.1080/15592294.2022.2045754
- Gunbin K., Peshkin L., Popadin K., Annis S., Ackermann R.R., Khrapko K. Integration of mtDNA pseudogenes into the nuclear genome coincides with speciation of the human genus. A hypothesis. *Mitochondrion.* 2017;34:20-23. DOI 10.1016/j.mito.2016.12.001
- Hazkani-Covo E. Mitochondrial insertions into primate nuclear genomes suggest the use of numts as a tool for phylogeny. *Mol. Biol. Evol.* 2009;26(10):2175-2179. DOI 10.1093/molbev/msp131
- Hazkani-Covo E. A burst of numt insertion in the Dasyuridae family during marsupial evolution. *Front. Ecol. Evol.* 2022;10:844443. DOI 10.3389/fevo.2022.844443
- Hazkani-Covo E., Martin W.F. Quantifying the number of independent organelle DNA insertions in genome evolution and human health. *Genome Biol. Evol.* 2017;9(5):1190-1203. DOI 10.1093/gbe/evx078
- Hong E.E., Okitsu C.Y., Smith A.D., Hsieh C.L. Regionally specific and genome-wide analyses conclusively demonstrate the absence of CpG methylation in human mitochondrial DNA. *Mol. Cell. Biol.* 2013;33(14):2683-2690. DOI 10.1128/MCB.00220-13
- Hoser S.M., Hoffmann A., Meindl A., Gamper M., Fallmann J., Bernhart S.H., Müller L., Ploner M., Misslinger M., Kremser L., Lindner H., Geley S., Schaal H., Stadler P.F., Huettenhofer A. Intronic tRNAs of mitochondrial origin regulate constitutive and alternative splicing. *Genome Biol.* 2020;21(1):299. DOI 10.1186/s13059-020-02199-6
- Koonin E.V. The origin of introns and their role in eukaryogenesis: a compromise solution to the introns-early versus introns-late debate? *Biol. Direct.* 2006;1:22. DOI 10.1186/1745-6150-1-22
- Leister D. Origin, evolution and genetic effects of nuclear insertions of organelle DNA. *Trends Genet.* 2005;21(12):655-663. DOI 10.1016/j.tig.2005.09.004
- Li M., Schroeder R., Ko A., Stoneking M. Fidelity of capture-enrichment for mtDNA genome sequencing: influence of NUMTs. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(18):e137. DOI 10.1093/nar/gks499
- Li X., Xu D., Cheng B., Zhou Y., Chen Z., Wang Y. Mitochondrial DNA insert into CD40 ligand gene-associated X-linked hyper-IgM syndrome. *Mol. Genet. Genomic Med.* 2021;9(5):e1646. DOI 10.1002/mgg3.1646
- Luo S.M., Schatten H., Sun Q.Y. Sperm mitochondria in reproduction: good or bad and where do they go? *J. Genet. Genomics.* 2013; 40(11):549-556. DOI 10.1016/j.jgg.2013.08.004
- Luo S., Valencia C.A., Zhang J., Lee N.C., Slone J., Gui B., Wang X., Li Z., Dell S., Brown J., Chen S.M., Chien Y.H., Hwu W.L., Fan P.C., Wong L.J., Atwal P.S., Huang T. Biparental inheritance of mitochondrial DNA in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018; 115(51):13039-13044. DOI 10.1073/pnas.1810946115
- Luo S., Valencia C.A., Zhang J., Lee N.C., Slone J., Gui B., Wang X., Li Z., Dell S., Brown J., Chen S.M., Chien Y.H., Hwu W.L., Fan P.C., Wong L.J., Atwal P.S., Huang T. Reply to Lutz-Bonengel et al.: Biparental mtDNA transmission is unlikely to be the result of nuclear mitochondrial DNA segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019;116(6):1823-1824. DOI 10.1073/pnas.1821357116
- Lutz-Bonengel S., Parson W. No further evidence for paternal leakage of mitochondrial DNA in humans yet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019;116(6):1821-1822. DOI 10.1073/pnas.1820533116
- Lutz-Bonengel S., Niederstätter H., Naue J., Koziel R., Yang F., Sännger T., Huber G., Berger C., Pflugradt R., Strobl C., Xavier C., Volleth M., Weiß S.C., Irwin J.A., Romsos E.L., Vallone P.M., Ratzinger G., Schmutz M., Jansen-Dürr P., Liehr T., Lichter P., Parsons T.J., Pollak S., Parson W. Evidence for multi-copy Mega-NUMTS in the human genome. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(3):1517-1531. DOI 10.1093/nar/gkaa1271
- Maresca A., Zaffagnini M., Caporali L., Carelli V., Zanna C. DNA methyltransferase 1 mutations and mitochondrial pathology: is mtDNA methylated? *Front. Genet.* 2015;6:90. DOI 10.3389/fgene.2015.00090
- Marshall C., Parson W. Interpreting NUMTs in forensic genetics: seeing the forest for the trees. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2021;53: 102497. DOI 10.1016/j.fsigen.2021.102497
- Maude H., Davidson M., Charitakis N., Diaz L., Bowers W.H.T., Gradvovich E., Andrew T., Huntley D. NUMT confounding biases mitochondrial heteroplasmy calls in favor of the reference allele. *Front. Cell Dev. Biol.* 2019;7:201. DOI 10.3389/fcell.2019.00201
- McWilliams T.G., Suomalainen A. Mitochondrial DNA can be inherited from fathers, not just mothers. *Nature.* 2019;565(7739):296-297. DOI 10.1038/d41586-019-00093-1
- Millar D.S., Tysoc C., Lazarou L.P., Pilz D.T., Mohammed S., Anderson K., Chuzhanova N., Cooper D.N., Butler R. An isolated case of lissencephaly caused by the insertion of a mitochondrial genome-derived DNA sequence into the 5' untranslated region of the



- PAFAH1B1* (LIS1) gene. *Hum. Genomics*. 2010;4(6):384-393. DOI 10.1186/1479-7364-4-6-384
- Mishmar D., Ruiz-Pesini E., Brandon M., Wallace D.C. Mitochondrial DNA-like sequences in the nucleus (NUMTs): insights into our African origins and the mechanism of foreign DNA integration. *Hum. Mutat.* 2004;23(2):125-133. DOI 10.1002/humu.10304
- Mourier T., Hansen A.J., Willerslev E., Arctander P. The Human Genome Project reveals a continuous transfer of large mitochondrial fragments to the nucleus. *Mol. Biol. Evol.* 2001;18(9):1833-1837. DOI 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003971
- Onozawa M., Goldberg L., Aplan P.D. Landscape of insertion polymorphisms in the human genome. *Genome Biol. Evol.* 2015;7(4):960-968. DOI 10.1093/gbe/evv043
- Patil V., Cuenin C., Chung F., Aguilera J.R.R., Fernandez-Jimenez N., Romero-Garmendia I., Bilbao J.R., Cahais V., Rothwell J., Herczeg Z. Human mitochondrial DNA is extensively methylated in a non-CpG context. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(19):10072-10085. DOI 10.1093/nar/gkz762
- Popadin K., Gunbin K., Peshkin L., Annis S., Fleischmann Z., Franco M., Kraytsberg Y., Markuzon N., Ackermann R.R., Khrapko K. Mitochondrial pseudogenes suggest repeated inter-species hybridization among direct human ancestors. *Genes (Basel)*. 2022;13(5):810. DOI 10.3390/genes13050810
- Puertas M.J., González-Sánchez M. Insertions of mitochondrial DNA into the nucleus-effects and role in cell evolution. *Genome*. 2020;63(8):365-374. DOI 10.1139/gen-2019-0151
- Ramos A., Barbena E., Mateiu L., del Mar González M., Mairal Q., Lima M., Montiel R., Aluja M.P., Santos C. Nuclear insertions of mitochondrial origin: database updating and usefulness in cancer studies. *Mitochondrion*. 2011;11(6):946-953. DOI 10.1016/j.mito.2011.08.009
- Richly E., Leister D. NUMTs in sequenced eukaryotic genomes. *Mol. Biol. Evol.* 2004;21(6):1081-1084. DOI 10.1093/molbev/msh110
- Rogozin I.B., Carmel L., Csuros M., Koonin E.V. Origin and evolution of spliceosomal introns. *Biol. Direct.* 2012;7:11. DOI 10.1186/1745-6150-7-11
- Shao Z., Han Y., Zhou D. Optimized bisulfite sequencing analysis reveals the lack of 5-methylcytosine in mammalian mitochondrial DNA. *BMC Genomics*. 2023;24(1):439. DOI 10.1186/s12864-023-09541-9
- Shock L.S., Thakkar P.V., Peterson E.J., Moran R.G., Taylor S.M. DNA methyltransferase 1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011;108(9):3630-3635. DOI 10.1073/pnas.1012311108
- Sokolova V.A., Kustova M.E., Arbuzova N.I., Sorokin A.V., Moskaliova O.S., Bass M.G., Vasilyev V.B. Obtaining mice that carry human mitochondrial DNA transmitted to the progeny. *Mol. Reprod. Dev.* 2004;68(3):299-307. DOI 10.1002/mrd.20075
- Sturk-Andreaggi K., Bodner M., Ring J.D., Ameer A., Gyllensten U., Parson W., Marshall C., Allen M. Complete mitochondrial DNA genome variation in the Swedish population. *Genes (Basel)*. 2023;14(11):1989. DOI 10.3390/genes14111989
- Tao Y., He C., Lin D., Gu Z., Pu W. Comprehensive identification of mitochondrial pseudogenes (NUMTs) in the human telomere-to-telomere reference genome. *Genes (Basel)*. 2023;14(11):2092. DOI 10.3390/genes14112092
- Tsuzuki T., Nomiya H., Setoyama C., Maeda S., Shimada K. Presence of mitochondrial-DNA-like sequences in the human nuclear DNA. *Gene*. 1983;25(2-3):223-229. DOI 10.1016/0378-1119(83)90226-3
- Turner C., Killoran C., Thomas N.S., Rosenberg M., Chuzhanova N.A., Johnston J., Kemel Y., Cooper D.N., Biesecker L.G. Human genetic disease caused by de novo mitochondrial-nuclear DNA transfer. *Hum. Genet.* 2003;112(3):303-309. DOI 10.1007/s00439-002-0892-2
- Uvizl M., Puechmaile S.J., Power S., Pippel M., Carthy S., Haerty W., Myers E.W., Teeling E.C., Huang Z. Comparative genome micro-synteny illuminates the fast evolution of nuclear mitochondrial segments (NUMTs) in mammals. *Mol. Biol. Evol.* 2024;41(1):msad278. DOI 10.1093/molbev/msad278
- Wang D., Timmis J.N. Cytoplasmic organelle DNA preferentially inserts into open chromatin. *Genome Biol. Evol.* 2013;5(6):1060-1064. DOI 10.1093/gbe/evt070
- Wei W., Pagnamenta A.T., Gleadall N., Sanchis-Juan A., Stephens J., Broxholme J., Tuna S., Odhams C.A.; Genomics England Research Consortium; NIHR BioResource; Fratter C., Turro E., Caulfield M.J., Taylor J.C., Rahman S., Chinnery P.F. Nuclear-mitochondrial DNA segments resemble paternally inherited mitochondrial DNA in humans. *Nat. Commun.* 2020;11(1):1740. DOI 10.1038/s41467-020-15336-3
- Wei W., Schon K.R., Elgar G., Orioli A., Tanguy M., Giess A., Tischkowitz M., Caulfield M.J., Chinnery P.F. Nuclear-embedded mitochondrial DNA sequences in 66,083 human genomes. *Nature*. 2022;611(7934):105-114. DOI 10.1038/s41586-022-05288-7
- Wolf Y.I., Koonin E.V. Genome reduction as the dominant mode of evolution. *Bioessays*. 2013;35(9):829-837. DOI 10.1002/bies.201300037
- Xue L., Moreira J.D., Smith K.K., Fetterman J.L. The mighty NUMT: mitochondrial DNA flexing its code in the nuclear genome. *Bio-molecules*. 2023;13(5):753. DOI 10.3390/biom13050753
- Yao Y.G., Kong Q.P., Salas A., Bandelt H.J. Pseudomitochondrial genome haunts disease studies. *J. Med. Genet.* 2008;45(12):769-772. DOI 10.1136/jmg.2008.059782
- Yoon Y.G., Haug C.L., Koob M.D. Interspecies mitochondrial fusion between mouse and human mitochondria is rapid and efficient. *Mitochondrion*. 2007;7(3):223-229. DOI 10.1016/j.mito.2006.11.022
- Zhang Z., Zhao J., Li J., Yao J., Wang B., Ma Y., Li N., Wang H., Wang T., Liu B., Gong L. Evolutionary trajectory of organelle-derived nuclear DNAs in the *Triticum/Aegilops* complex species. *Plant Physiol.* 2024;194(2):918-935. DOI 10.1093/plphys/kiad552

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


Поступила в редакцию 28.02.2024. После доработки 28.03.2024. Принята к публикации 28.03.2024.

DOI 10.18699/vjgb-24-54

## Гипотеза взаимосвязи эпигенетических факторов с транспозонами в формировании памяти

Р.Н. Мустафин 

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

 ruji79@mail.ru

**Аннотация.** В обзорной статье описана гипотеза, согласно которой драйверами эпигенетической регуляции в формировании памяти являются мобильные генетические элементы, влияющие на экспрессию специфических генов в головном мозге. В подтверждение приведены результаты научных исследований о закономерной активации транспозонов в нейрональных стволовых клетках при дифференцировке нейронов. Данные процессы происходят в зоне нейрогенеза – зубчатой извилине гиппокампа, где определяются наибольшая активность мобильных генетических элементов и их инсерции в локусы вблизи генов, экспрессируемых нейронами с их активацией. В экспериментах по изменению активности ацетилтрансферазы гистонов, ингибированию ДНК-метилтрансферазы и обратной транскриптазы было показано вовлечение эпигенетических факторов и ретроэлементов в механизмы формирования памяти. В то же время в ряде работ на разных животных продемонстрировано сохранение долговременной памяти без участия синаптической пластичности. Полученные данные позволяют предположить, что транспозоны, являющиеся высокочувствительными сенсорами генома к различным средовым и внутренним воздействиям, формируют память на уровне ядерного кодирования. Это отражается в изменении синаптической пластичности, чем можно объяснить сохранение долговременной памяти после устранения синаптических связей у животных. Подтверждением служат факты происхождения от мобильных генетических элементов белков, непосредственно участвующих в формировании памяти, в том числе в передаче генетической информации через синапсы между нейронами (белок Arc). Транспозоны – источники длинных некодирующих РНК и микроРНК, роль которых в консолидации памяти описана. Патологическая активация мобильных генетических элементов является вероятной причиной нейродегенеративных болезней с нарушением памяти. Анализ научной литературы позволил нам обнаружить данные об изменениях экспрессии 40 микроРНК, произошедших от транспозонов, при болезни Альцгеймера. Для 24 из этих микроРНК описаны механизмы регуляции генов, участвующих в функционировании головного мозга. Сделано предположение, что установленные нами микроРНК могли бы стать потенциальными инструментами для регуляции активности транспозонов в головном мозге с целью улучшения памяти.


**Ключевые слова:** длинные некодирующие РНК; долговременная память; микроРНК; ретроэлементы; транспозоны; эпигенетические факторы.

**Для цитирования:** Мустафин Р.Н. Гипотеза взаимосвязи эпигенетических факторов с транспозонами в формировании памяти. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(5):476-486. DOI 10.18699/vjgb-24-54

## A hypothesis about interrelations of epigenetic factors and transposable elements in memory formation

R.N. Mustafin 

Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

 ruji79@mail.ru

**Abstract.** The review describes the hypothesis that the drivers of epigenetic regulation in memory formation are transposable elements that influence the expression of specific genes in the brain. The hypothesis is confirmed by research into transposon activation in neuronal stem cells during neuronal differentiation. These changes occur in the hippocampus dentate gyrus, where a pronounced activity of transposons and their insertion near neuron-specific genes have been detected. In experiments on changing the activity of histone acetyltransferase and inhibition of DNA methyltransferase and reverse transcriptase, the involvement of epigenetic factors and retroelements in the mechanisms of memory formation has been shown. Also, a number of studies on different animals have revealed the preservation of long-term memory without the participation of synaptic plasticity. The data obtained suggest that transposons, which are genome sensors highly sensitive to various environmental and internal influences, form memory at the nuclear coding level. Therefore, long-term memory is preserved after elimination of synaptic connections. This is confirmed by the fact that the proteins involved in memory formation, including the transfer of genetic information through synapses between neurons (Arc protein), originate from transposons.

Long non-coding RNAs and microRNAs also originate from transposons; their role in memory consolidation has been described. Pathological activation of transposable elements is a likely cause of neurodegenerative diseases with memory impairment. Analysis of the scientific literature allowed us to identify changes in the expression of 40 microRNAs derived from transposons in Alzheimer's disease. For 24 of these microRNAs, the mechanisms of regulation of genes involved in the functioning of the brain have been described. It has been suggested that the microRNAs we identified could become potential tools for regulating transposon activity in the brain in order to improve memory.

**Key words:** long noncoding RNAs; long-term memory; miRNAs; retroelements; transposons; epigenetic factors.

**For citation:** Mustafin R.N. A hypothesis about interrelations of epigenetic factors and transposable elements in memory formation. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(5):476-486. DOI 10.18699/vjgb-24-54

## Введение

Память определяется как хранение и использование полученной информации в головном мозге в ходе адаптации к окружающей среде при жизнедеятельности организма. Память включает в себя процессы кодирования, консолидации, хранения информации и воспоминания. Молекулярные и клеточные механизмы формирования памяти логично трактуются передачей нервного импульса между синапсами множества нейронов. Большинство современных исследователей объясняют процессы формирования памяти синаптической пластичностью (СП) – возможностью дифференциального изменения силы нейрональной передачи через определенные синапсы (с ослаблением одних и усилением других соединений между нейронами) (Ortega-de San Luis, Ryan, 2022). Известно четыре уровня изучения памяти: психологический, нейрофизиологический, биохимический и кибернетический. Согласно нейрофизиологической концепции, память подразделяется на кратковременную и долговременную (ДП). Большинство современных нейрофизиологических теорий сводится к роли в формировании ДП синаптической пластичности, которая тесно связана с биохимической теорией, поскольку электрохимическая реакция образования нервного импульса переходит в биохимический процесс образования новых белков (Мунин, Оленко, 2022).

Необходимость пересмотра классической гипотезы синаптической пластичности связана с получением доказательств сохранения памяти без участия синаптической пластичности. Результаты первых экспериментов в этой области были опубликованы в 1984 г. Сохранение памяти избегания запаха, сформированной на стадии гусениц, выявлено у зрелых мотыльков *Manduca sexta* после метаморфоза с реорганизацией синапсов (Levine, 1984). Долговременная память распознавания текстурированной поверхности для определения наличия пищи сохранялась у планарии после удаления головы и последующей регенерации головного мозга (Shomrat, Levin, 2013). На культуре двигательных и сенсорных нейронов морского зайца *Aplysia* ДП на тренировку интервальными импульсами серотонина сохранялась после ее очевидного устранения антиминомоническими препаратами, которые стирают связанный с обучением рост синапсов (Chen et al., 2014). В экспериментах на мышах было определено восстановление памяти о страхе при реактивации клеток энграммы в отсутствие синаптических изменений (после введения ингибитора синтеза белка анизомицина) (Ryan T.J. et al., 2015).

В формировании ДП вовлечены различные гены, наиболее известный из них *CREB* (сAMP-responsive element binding protein). Мутации в гене *CREB* вызывают дефицит памяти у мышей (Hegde, Smith, 2019). Продукт гена *CREB* вместе с глюкокортикоидными рецепторами вовлечен во внутриклеточные механизмы влияния глюкокортикоидов на формирование ДП в гиппокампе (Buurstede et al., 2022).

В экспериментах на дрозофиле показана роль гена бета-катенина (*CTNNB1*) в консолидации ДП за счет воздействия на Wnt-сигнальные пути (Tan Y. et al., 2013). Систематические обзоры накопленных в научной литературе данных показали стимулирующее влияние на развитие памяти кодирующих транскрипционные факторы генов *NF-κB* (Kaltschmidt B., Kaltschmidt C., 2015), *Zif268*, *XBP1*, *Srf*, *Npas4*, *Foxp1*, *Crtcl*, *c-Rel* (Hegde, Smith, 2019). Помимо необходимых для консолидации памяти генов, к которым относится также *NR2B* (кодирует субъединицу ионотропного глутаматного рецептора N-метил-D-аспартата), важное значение в регуляции ДП имеют гены-супрессоры памяти: *AIM2*, *ATF4*, *BChE*, *Bec1*, *CCR5*, *Cdk5*, *Crtll*, *Diap1*, *Dicer1*, *DDF45*, *GABAaB3*, *GABAARa4*, *Gabra 4*, *Galectin-3*, *GAT1*, *QR2*, *Np65*, *Hcn1*, *Hdac2*, *Mef2*, *Kvβ1.1*, *PDE1b*, *Paip2a*, *Pkr*, *GCN2*, *IRS2*, *RGS14*, *RARalpha*, *p75NTR*, *PDE4A*, *Ogg1*, *PERK*, *RPTPsigma*, *Piw1*, *Piw2*, *SI00b*, *TLCN*, *Pde4d/8b*, *11b-HSD1* (Noyes et al., 2021).

Полученные результаты свидетельствуют о наличии других механизмов сохранения ДП, которые реализуются в виде синаптической пластичности. Наиболее вероятно, что память консолидируется на уровне ядерной ДНК под драйверным влиянием транспозонов, которые перестраивают структуру хроматина при их активации, а также встраиваются в специфические локусы в ходе дифференцировки нейронов (Perrat et al., 2013; Upton et al., 2015). Ремоделирование хроматина под влиянием эпигенетических модификаций необходимо для сохранения и поддержания памяти, поскольку это отражается на изменении регуляции генов в головном мозге. К эпигенетическим факторам относятся метилирование цитозина в динуклеотидах CpG, модификации хроматина и некодирующие РНК (нкРНК), каждый из них вовлечен в формирование долговременной памяти (Lipsky, 2013). Роль эпигенетических факторов в образовании ДП доказана в экспериментах. Воздействие ингибитора ДНК-метилтрансферазы разрушало полностью консолидированную память о страхе через один месяц после ее возникновения (Miller et al., 2010).

Усиление ацетилирования гистонов за счет манипулирования активностью специфической изоформы ацетил-

трансферазы гистонов (НАТ – histone acetyltransferase) в нейронах достоверно снижало консолидацию памяти (Jarome, Lubin, 2014). На формирование ДП влияют специфические модификации гистонов H2BK120ub, H3K9me2, H3K36me3, H3K27me3, H3K9me3, H3K4me3, H3K14ac, H3K9ac (Hegde, Smith, 2019).

В то же время ферменты метилирования ДНК и реорганизации хроматина взаимодействуют с микроРНК (Мустафин, Хуснутдинова, 2017), которые могут служить также гидами, узнающими комплементарные последовательности генома в механизме РНК-зависимого метилирования ДНК (Chalcraft et al., 2019). Этот феномен позволяет охарактеризовать использование мобильных генетических элементов в качестве драйверов эпигенетической регуляции ДП, поскольку транспозоны – важные ключевые источники возникновения генов микроРНК (Wei et al., 2016). О роли мобильных генетических элементов в регуляции функционирования нейронов у человека сделано предположение в обзоре (Chesnokova et al., 2022). Конечно, мобильные генетические элементы не могут быть драйверами всех эпигенетических изменений, связанных с мнестическими процессами. Но поскольку они служат эволюционными источниками многих микроРНК (Wei et al., 2016), большинства длинных некодирующих РНК (днРНК) (Johnson, Guigo, 2014), сами они могут транскрибироваться непосредственно в днРНК (Lu X. et al., 2014; Honson, Macfarlan, 2018), следовательно, транспозоны в той или иной степени являются участниками большинства эпигенетических и генных сетей регуляции функционирования генома. Кроме того, транспозоны находятся под контролем эпигенетических изменений, в том числе за счет взаиморегуляторного воздействия произошедших от них микроРНК (Мустафин, Хуснутдинова, 2017).

В эпигенетической регуляции транспозонов участвуют КРАВ-белки с цинковыми пальцами с помощью гетерохроматин-иницирующих комплексов, которые модифицируют гистоны и изменяют метилирование ДНК (Wolf et al., 2015). Более половины областей связывания с белком PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger), членом семейства цинковых пальцев типа Круппеля, расположено внутри генов LINE1-элементов (Lapp, Hunter, 2016). Факторы SOX2 и HDAC1 управляют активностью LINE1, связываясь с репрессором транскрипции метил-СрG-связанным белком-2 (MeCP2). Существует множество других способов регуляции активности транспозонов, к которым относятся указанные выше белки АРОВЕС3 (Mager, Stoye, 2014), АРОВЕС1, ERCC, TREX1, RB1, HELLS, MEGP2 (Rodic, Burns, 2013), SIRT6 (Van Meter et al., 2014).

В базе данных MDTE DB опубликована 661 микроРНК человека, которые произошли от мобильных генетических элементов (Wei et al., 2016). В нейрональных стволовых клетках (НСК) активация транспозонов способствует геномному мозаицизму созревающих нейронов, что необходимо для их дифференцировки (Muotri et al., 2005). Данные изменения обнаруживаются в зоне нейрогенеза, зубчатой извилине гиппокампа не только экспериментальных животных, но и человека (Coufal et al., 2009; Baillie et al., 2011; Kurnosov et al., 2015). При этом ретроэлементы

(РЭ) инсертируют в гены или вблизи генов, участвующих в функционировании нейронов (Upton et al., 2015), а гиппокамп играет ключевую роль в обучении и формировании памяти (Zhang H. et al., 2021).

Причиной активации транспозонов могут быть средовые факторы, сигналы которых поступают в головной мозг по нейронным сетям, поскольку транспозоны являются высокочувствительными сенсорами средовых и внутренних изменений (Мустафин, Хуснутдинова, 2019). Транспозоны представляют собой участки генома, перемещающиеся внутри генома с помощью механизма «вырезания и вставки» (ДНК-транспозоны) и «копирования и вставки» (РЭ). Ретроэлементы могут содержать длинные концевые повторы (LTR-РЭ) или не содержать их (non-LTR-РЭ). К последним у человека относятся автономные РЭ (LINEs – long interspersed nuclear elements) и неавтономные (SINEs – short interspersed nuclear elements, SVA – SINE-VNTR-Alu elements) (Мустафин, Хуснутдинова, 2017).

Большинство днРНК, подобно микроРНК, произошли от транспозонов. В среднем 41 % экзонов днРНК содержат последовательности РЭ, а 83 % из них имеют хотя бы один фрагмент транспозона (Johnson, Guigo, 2014; Wei et al., 2016). Более того, транскрипты LINE1 сами функционируют в качестве днРНК, взаимодействуя со специфическими участками хроматина и регулируя экспрессию генов (Honson, Macfarlan, 2018), а LTR-РЭ служат генами многих днРНК (Lu X. et al., 2014). Поэтому участие нкРНК в сохранении ДП свидетельствует о значении транспозонов в этих процессах.

### Роль некодирующих РНК в формировании памяти

Тканевая специфичность днРНК превышает таковую белков. В регуляции дифференцировки стволовых клеток они взаимодействуют с РЭ (Ramsay et al., 2017). ДнРНК образуются из межгенных областей геномов эукариот, характеризующихся тканеспецифической транскрипцией, а также из перекрывающихся и антисмысловых паттернов относительно примыкающих генов, которые они и регулируют (Arendt et al., 2017). Это позволяет им детерминировать разнообразие клеточных фенотипов, особенно в головном мозге (Lapp, Hunter, 2016), что может отражать роль транспозонов в данных процессах (Coufal et al., 2009; Baillie et al., 2011). Анализ секвенирования РНК с индукцией LTP (long-term potentiation) в зубчатой извилине крысы после высокочастотной стимуляции перфорантного пути показал положительную выраженную корреляцию динамической экспрессии днРНК с РЭ и белок-кодирующими генами (Maag et al., 2015).

В ряде научных работ продемонстрирована роль специфических днРНК в консолидации ДП. В экспериментах на грызунах обнаружено, что днРНК NEAT1 является эпигенетическим супрессором формирования ДП в гиппокампе (Butler et al., 2019). В нейронах гиппокампа определена повышенная экспрессия днРНК SLAMR под действием контекстуально-обусловленного страха. SLAMR транспортируется в дендриты посредством молекулярного мотора KIF5C и рекрутируется в синапс в ответ на стимуляцию. SLAMR модулирует активность белка CaMKII $\alpha$ ,



который играет важную роль в синаптической пластичности в синаптонейросомах (Espadas et al., 2023). С белком СаМКII взаимодействует также днРНК *Capic*, которая управляет в гиппокампе фосфорилированием АМРА- и NMDA-рецепторов, влияя на пространственную память. При отсутствии *Capic* происходит дисфункция синаптической пластичности в СА3-СА1 в гиппокампе, что свидетельствует о роли данной днРНК в регуляции ДП (Cui et al., 2022). Поскольку многие днРНК экспрессируются в головном мозге, они могут регулировать гены для ДП (Samaddar, Vnerjee, 2021).

Не менее 70 % микроРНК человека экспрессируются в головном мозге со специфическим паттерном активации микроРНК для каждой области (Chen, Qin, 2015). В нейронах гиппокампа индукция *Dicer* белком BDNF приводит к усиленному синтезу miR-7a, -7b, -7f, -9, -107, -124a, -125b, -132, -134, -143, -375, которые участвуют в регуляции памяти (Leal et al., 2014). Систематический обзор научной литературы показал повышение экспрессии miR-124, miR-134, miR-206, а также снижение экспрессии miR-9-3p, miR-92, miR-195 и кластера miR-183/96/182 при консолидации ДП (Гринкевич, 2020). MiR-124 и miR-12 способствуют формированию ранней фазы ДП (Michely et al., 2017). Поскольку микроРНК играют роль в нормальном формировании ДП, их патологическая экспрессия может влиять на развитие нейродегенеративных болезней с нарушением памяти, таких как болезнь Альцгеймера (БА). Проведенный в 2019 г. систематический обзор научной литературы показал посттранскрипционное регуляторное влияние специфических микроРНК на мРНК генов, участвующих в патогенезе БА. Выявлено, что с мРНК белка APP связываются miR-17, -655, -644, -323-3p, -153, -147, -20a. Ингибирующее влияние на  $\alpha$ -секретазу ADAM10 оказывают miR-1306, -451, -181, -144, -107, -103, -9; на  $\beta$ -секретазу BACE1 – miR-101, -107, -384, -339-5p, -200b, -195, -186, -135a, -29a, -29b-1, -29c (Patel et al., 2019).

### Роль ретроэлементов в консолидации долговременной памяти

О значении РЭ в формировании ДП свидетельствуют результаты экспериментальных работ независимых исследователей. Так, при ингибировании LINE1 в гиппокампе мышей определена роль РЭ в консолидации памяти за счет геномного мозаицизма. Для этого животных помещали на освещенную сторону, после чего разрешали перейти на темную сторону камеры, где на них воздействовали током. Память об обучении отражалась в увеличении латентности мыши при переходе на темную сторону камеры. Через 72 ч после введения в гиппокамп ингибитора обратной транскриптазы ламивудина ДП значительно ухудшалась (Vachiller et al., 2017). В другом исследовании контекстно-зависимой памяти о страхе, помимо доказательства значительного подавления ДП после введения ламивудина, была обнаружена экспрессия LINE1 в гиппокампе и префронтальной коре при воспоминании о страхе с помощью количественной ПЦР в реальном времени образцов гиппокампа и префронтальной коры (Zhang W.J. et al., 2021). Значительное количество транспозиций мобильных генетических элементов (более 200 на одну клетку) в связанных с памятью нейронах определено

также в головном мозге дрозофилы (Perrat et al., 2013). Результаты многих исследований, приведенных в обзоре, отражают корреляционные взаимосвязи и нуждаются в более прямом подтверждении влияния транспозонов на память, таких как одноклеточное секвенирование области гиппокампа и специфических зон коры головного мозга до и после тренировки долговременной памяти.

Согласно данным консорциумов ENCODE и FANTOM, активность транспозонов зависит от типа клеток и влияет на экспрессию соседних генов. Наибольшее значение мобильные генетические элементы имеют в регуляции работы головного мозга, обеспечивая адаптивные функции центральной нервной системы. В ответ на воздействие стероидов, эпигенетических и средовых факторов они изменяют работу нейромедиаторных систем для приспособления к меняющимся средовым условиям, в том числе при формировании ДП (Lapp, Hunter, 2016). Активированные РЭ играют регуляторную роль не только для НСК, но и в позднюю фазу дифференцировки нейронов (Muotri et al., 2010), управляя специфическим характером экспрессии генов в нейронах, расположенных в определенных областях головного мозга, благодаря чему формируется память (Singer et al., 2010). В гиппокампе мыши профили экспрессии SINE являются специфическими для типа клеток. При кратковременном воздействии нового стимула SINE активируются в зубчатых гранулярных нейронах с течением времени, сходным с таковым для белок-кодирующих генов (Linker et al., 2020).

Важную роль в развитии ДП играют LTR-РЭ. Белковый продукт гена *HERV* активирует BDNF (brain-derived neurotrophic factor) (Huang et al., 2011), участвующий в синаптической передаче и ЛТР в гиппокампе и других областях головного мозга для формирования различных форм памяти (Leal et al., 2014). В эволюции одомашнивание LTR-РЭ привело к образованию генов, имеющих ключевое значение в ДП. Согласно компьютерному анализу (Campillos et al., 2006), подтвержденному филогенетическими исследованиями (Ashley et al., 2018; Pastuzyn et al., 2018), ген *Arc* (Activity-regulated cytoskeleton-associated protein) у человека произошел от ERV Ty3/gypsy. Белок *Arc* регулирует синаптическую пластичность в контроле сигнальных сетей при консолидации памяти. Транскрипты гена *Arc* транспортируются к синапсам дендрита, где из них синтезируется белок на рибосомах. Белок *Arc* формирует капсид, инкапсулирующий собственные мРНК. Образующие вирусоподобные структуры загружаются во внеклеточные везикулы и транспортируются к нейронам, передавая генетическую информацию и регуляторные сигналы по нейронным сетям, что необходимо для формирования ДП (Ashley et al., 2018; Pastuzyn et al., 2018).

От обратной транскриптазы ERV произошел белок Ppr8 – компонент сплайсосомы эукариот (Dlacić, Mushegian, 2011). В экспериментах на дрозофиле была показана ключевая роль Ppr8 в контроле экспрессии нейропептида FMRFa в нейронах (Cobeta et al., 2018). Возникший от обратной транскриптазы ретроэлементов белок TERT (Korera et al., 2011) регулирует формирование пространственной памяти посредством модуляции развития нейронов в гиппокампе (Zhou et al., 2017). От белка Gag ERV произошел взаимодействующий с ATXN2 и ATXN10 в стресс-

совых гранулах и внеклеточных везикулах белок PEG10, который регулирует миграцию нейронов при формировании ДП (Pandya et al., 2021). Белок Gag в эволюции стал также источником ССНС-типа белка цинковых пальцев (кодируется геном *SIRH11/ZCCHC16*). Делеция *SIRH11/ZCCHC16* в экспериментах на мышах вызывает аномальное поведение, связанное с когнитивными способностями, включая рабочую память (Kaneko-Ishino, Ishino, 2016). От гена *Gag* произошел ген *RTL1/PEG11*, экспрессируемый в головном мозге. У мышей с нокаутом отцовского аллеля (*Rtl1m<sup>+/p-</sup>*) определено снижение памяти (Chou et al., 2022). Полученные данные о роли белков, произошедших от ERV, в формировании ДП свидетельствуют о потенциальном участии самих ERV в этих процессах.

Таким образом, сильная сторона гипотезы о роли транспозонов в формировании ДП – наличие прямых экспериментальных доказательств участия РЭ в данных процессах (Singer et al., 2010; Huang et al., 2011; Perrat et al., 2013; Leal et al., 2014; Lapp, Hunter, 2016; Bachiller et al., 2017; Zhang W.J. et al., 2021). Имеются и косвенные свидетельства значения мобильных генетических элементов в механизмах ДП, поскольку РЭ – эволюционные источники участвующих в формировании памяти белков Arc (Campillos et al., 2006; Ashley et al., 2018; Pastuzyn et al., 2018), Prp8 (Dlakić, Mushegian, 2011; Cobeta et al., 2018), TERT (Копера et al., 2011; Zhou et al., 2017), PEG10 (Pandya et al., 2021), ССНС-типа белка цинковых пальцев (Kaneko-Ishino, Ishino, 2016).

Транспозоны являются также источниками микроРНК (Wei et al., 2016) и длинных нкРНК (Johnson, Guigo, 2014), активно участвующих в эпигенетической регуляции ДП. Поэтому сильная сторона данной гипотезы – объяснение механизмов влияния средовых стимулов на эпигенетические факторы, так как в данных процессах РЭ служат эффективными посредниками, чувствительными не только к стрессовым, но и ко многим внешним и внутренним факторам, воспринимая информацию для адаптации организма (Мустафин, Хуснутдинова, 2019), что соответствует определению памяти (Ortega-de San Luis, Ryan, 2022). Более того, способность РЭ инсертировать в новые локусы генома, изменяя при этом экспрессию специфических генов, участвующих в формировании ДП, в отличие от гипотезы синаптической пластичности, объясняет долговременную консолидацию на уровне генома (Perrat et al., 2013; Bachiller et al., 2017; Zhang W.J. et al., 2021).

В пользу предложенной гипотезы говорит также большая скорость консолидации информации на уровне генома (по сравнению с возможным влиянием потенциала на синтез белков на рибосомах) за счет активации РЭ, так как транспозоны участвуют во множестве генных и эпигенетических сетей (в связи с наличием комплементарных последовательностей с произошедшими от них некодирующими РНК). Поэтому средовые стимулы, активирующие транспозоны, могут быстро отражаться на изменениях генных сетей, что достаточно для формирования долговременной памяти.

Возможным контраргументом роли транспозонов в формировании памяти может служить факт активации РЭ при старении, для которого характерно снижение когнитивных функций и памяти. Однако проведенный систематический

обзор научной литературы показал, что причина старения – патологическая активация РЭ (Mustafin, Khusnutdinova, 2018), тогда как для онтогенеза с деления зиготы и до достижения половозрелого состояния организма происходит видоспецифическая активация строго определенных транспозонов, в том числе в головном мозге (Мустафин, Хуснутдинова, 2018). В пользу этого утверждения свидетельствует патологическая активация РЭ при ассоциированных со старостью болезнях, характеризующихся нарушением долговременной памяти.

### Взаимосвязь транспозонов с микроРНК при нарушениях памяти

Перспективы исследования взаимосвязи мобильных генетических элементов с эпигенетическими факторами в формировании ДП в норме и при патологии связаны с возможностью коррекции нарушений, так как эпигенетические изменения носят обратимый характер. Хотя экспрессия транспозонов необходима для консолидации памяти в норме, их патологическая активация является фактором развития нейродегенеративных болезней. В экспериментах на мышах, моделированных по БА, было показано нарушение ДП вследствие дерепрессии РЭ (El Hajjar et al., 2019). G-квадруплекс, происходящий от эволюционно-консервативных LINE1, подавляет экспрессию генов в нейронах при болезни Альцгеймера (Hanna et al., 2021). В головном мозге мышей тау-белки активируют ERV, повышая количество их ДНК-копий (Ramirez et al., 2022), а у пациентов с болезнью Альцгеймера деконденсация гетерохроматина и снижение уровней piwi и piРНК активируют HERV (Sun W. et al., 2018), LINE1 и Alu (Grundman et al., 2021).

Поскольку микроРНК также характеризуются изменением экспрессии при нормальном формировании ДП (Leal et al., 2014; Chen, Qin, 2015; Michely et al., 2017; Grinkevich, 2020) и при болезни Альцгеймера (Patel et al., 2019), эти изменения могут быть связаны с патологической активацией мобильных генетических элементов. Для подтверждения данного предположения нами проведен анализ научной литературы о взаимосвязи микроРНК с транспозонами при болезни Альцгеймера. С этой целью были изучены результаты работ об изменениях экспрессии произошедших от мобильных генетических элементов (согласно базе данных MDTE DB (Wei et al., 2016)) микроРНК при болезни Альцгеймера. В результате обнаружено 40 микроРНК, которые свидетельствуют о роли взаимосвязанных (за счет комплементарности нуклеотидных последовательностей) с транспозонами микроРНК в механизмах формирования памяти у человека в норме и при патологии. Для 24 из этих микроРНК описана функциональная значимость в головном мозге (см. таблицу).

### Заключение

Исследование роли эпигенетических факторов в формировании ДП в норме и при патологии перспективно в связи с обратимостью происходящих под их влиянием изменений и возможностью воздействия на них с помощью микроРНК. Наиболее вероятные драйверы эпигенетической регуляции генов при формировании памяти – мобильные генетические элементы, высокочувствительные сенсоры



## Ассоциация с болезнью Альцгеймера произошедших от транспозонов микроРНК

микроРНК	Источник микроРНК	Изменение экспрессии микроРНК при болезни Альцгеймера (литературный источник) (↑ – повышение, ↓ – снижение)	Роль микроРНК в головном мозге (литературный источник)
miR-1202	LINE1	↑ (Henriques et al., 2020)	Ингибирует <i>Rab1a</i> и сигнальные пути TLR4/NFκB (Song et al., 2020)
miR-1246	ERVL	↑ (Guo et al., 2017)	Н.д.
miR-1271	LINE2	↓ (Majumder et al., 2021)	Взаимодействует с мРНК рецепторов тирозинкиназы ALK и RYK (Majumder et al., 2021)
miR-151	LINE2	↑ (Satoh et al., 2015)	Регулирует память в гиппокампе (Xu X.F. et al., 2019; Ryan B. et al., 2017)
miR-192	LINE2	↓ (Qin et al., 2022)	Воздействует на сигнальный путь TGF-β1 (Tang et al., 2019)
miR-211	LINE2	↑ (Sierksma et al., 2018; Li et al., 2021)	Регулирует миграцию и дифференцировку нейронов (Mainigi et al., 2016)
miR-224	MER135	↓ (Sun X. et al., 2023)	Ингибирует инфламмасому NLRP3 (Sun X. et al., 2023), регулирует NPAS4, участвующий в ДП (Bersten et al., 2014)
miR-28	LINE 2	↑ (Hong et al., 2017; Zhao et al., 2020)	Н.д.
miR-31	LINE2	↓ (Barros-Viegas et al., 2020)	Регулирует LTP (Parsons et al., 2012)
miR-3199	LINE2	↓ (Sun C. et al., 2021)	Участвует в регуляции экспрессии бета-амилоида (Sun C. et al., 2021)
miR-320c	LINE2	↑ (Raheja et al., 2018; Boese et al., 2016)	Н.д.
miR-3200	ERV-L	↓ (Satoh et al., 2015)	Н.д.
miR-325	LINE2	↓ (Barak et al., 2013)	Ингибирует экспрессию белка томозина (нарушает синаптическую пластичность в гиппокампе (Barak et al., 2013))
miR-326	hAT-Tip100	↑ (Cai et al., 2017)	Регулирует гены, участвующие в синаптической пластичности (Cohen et al., 2014), в ответ на BDNF снижает экспрессию Arc (Wibrand et al., 2012)
miR-335	SINE	↑ (Bottero, Potashkin, 2019)	Модулирует синаптическую пластичность и пространственную память в гиппокампе (Capitano et al., 2017)
miR-340	TcMar	↓ (Tan X. et al., 2020)	Н.д.
miR-342	SINE	↓ (Dakterzada et al., 2021)	Регулирует фермент, расщепляющий белок-предшественник амилоида (BACE1) (Dong et al., 2022)
miR-3646	SINE	↑ (Lu L. et al., 2021)	Н.д.
miR-378a	SINE	↑ (Dong et al., 2021)	Ингибирует ген <i>EZH2</i> , регулируя выработку провоспалительных цитокинов (Weng et al., 2023)
miR-384	LINE/Dong-R4	↑ (Samadian et al., 2021)	Участвует в поддержании LTP (Gu et al., 2015)
miR-4286	LTR/ERVL	↓ (Henriques et al., 2020)	Н.д.
miR-4422	LTR/Gypsy	↓ (Hajjri et al., 2020)	Н.д.
miR-4487	LINE1	↓ (Hu et al., 2018)	Подавляет индуцированный бета-амилоидом апоптоз (Hu et al., 2018)
miR-4504	LINE1	↑ (Eysert et al., 2021)	Ингибирует взаимодействующий с APP ген <i>FERMT2</i> (Eysert et al., 2021)
miR-4772	LINE1	↓ (Lugli et al., 2015)	Н.д.
miR-495	ERVL	↑ (Yuen et al., 2021)	Участвует в формировании ДП в гиппокампе (Puig-Parnau et al., 2020)
miR-502	LINE2	↓ (Satoh et al., 2015)	Н.д.
miR-511	LINE1	↓ (Wang et al., 2023)	Регулирует дифференцировку нейронов за счет ингибирования гена <i>FKBP5</i> (Zheng et al., 2016)
miR-517	SINE/Alu	↑ (Schipper et al., 2007)	Н.д.
miR-545	LINE2	↓ (Cosin-Tomás et al., 2017)	Н.д.
miR-566	SINE/Alu	↑ (Yaqub et al., 2023)	Н.д.
miR-576	LINE1	↓ (Liu et al., 2014; Xu X. et al., 2022)	Н.д.
miR-582	LINE/CR1	↓ (Eysert et al., 2021)	Подавляет экспрессию <i>FERMT2</i> (Eysert et al., 2021)

## Окончание таблицы

микроРНК	Источник микроРНК	Изменение экспрессии микроРНК при болезни Альцгеймера (литературный источник) (↑ – повышение, ↓ – снижение)	Роль микроРНК в головном мозге (литературный источник)
miR-603	TcMar	↑ (Zhang C. et al., 2016)	Н. д.
miR-6087	LINE1	↓ (Lau et al., 2013)	Н. д.
miR-619	LINE1	↓ (Baek et al., 2021)	Регулирует гены циркадных ритмов <i>PPP1CB</i> , <i>PPP1CC</i> , <i>CREBBP</i> , <i>HELZ2</i> , <i>NCOA1</i> , <i>TBL1X</i> (Baek et al., 2021)
miR-659	LINE2	↓ (Lugli et al., 2015)	Ингибирует ген програнулина ( <i>GRN</i> ) (Pisopo et al., 2016)
miR-664	LINE1	↓ (Schonrock et al., 2010)	Связывается с 3'UTR мРНК гена <i>NMDAR1</i> , стимулирующего гонадолиберин (Ju et al., 2019)
miR-708	LINE2	↓ (Rahman et al., 2020; Di Palo et al., 2022)	Регулирует синтез неронатина (Vatsa et al., 2019)
miR-885	SINE/MIR	↓ (Tan L. et al., 2014)	Ингибирует экспрессию гена <i>KREMEN1</i> (Pan et al., 2022)

Примечание. Н. д. – нет данных.

генома к средовым и внутренним воздействиям. Об этом свидетельствует сохранение ДП при полном устранении синаптических связей. Транспозоны консолидируют память на уровне ядерной ДНК за счет запрограммированного паттерна их активации и транспозиций. Анализ научной литературы позволил найти доказательства роли мобильных генетических элементов и взаимосвязанных с ними днРНК и микроРНК в формировании памяти в норме и патологии. При болезни Альцгеймера определены изменения экспрессии 40 произошедших от транспозонов микроРНК, источники большинства из которых – ретроэлементы (для 24 микроРНК – LINE, для 7 – SINE, для 5 – ERV).

Можно предположить, что выявленные нами микроРНК в перспективе могут стать объектами и инструментами для регуляции активности мобильных генетических элементов в головном мозге. Предложенная гипотеза роли ретроэлементов в формировании долговременной памяти объясняет недостающие звенья теории синаптической пластичности, поскольку активированные транспозоны формируют инсерции в специфические локусы генома, изменяющие экспрессию участвующих в развитии памяти генов, что объясняет консолидацию долговременной памяти на уровне ядерного кодирования.

## Список литературы / References

- Гринкевич Л.Н. Роль микроРНК в обучении и долговременной памяти. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(8): 885-896. DOI 10.18699/VJ20.687
- [Grinkevich L.N. The role of microRNAs in learning and long-term memory. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(8):885-896. DOI 10.18699/VJ20.687 (in Russian)]
- Мунин В.А., Оленко Е.С. Теории механизмов формирования памяти. *Психосоматические и интегративные исследования*. 2022;8(2):3
- [Munin V.A., Olenko E.S. Theories of memory formation mechanisms. *Psykhosomaticheskiye i Integrativnye Issledovaniya = Psychosomatic and Integrative Research*. 2022;8(2):3 (in Russian)]
- Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Некодирующие части генома как основа эпигенетической наследственности. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(6):742-749. DOI 10.18699/VJ17.30-0
- [Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. Non-coding parts of genomes as the basis of epigenetic heredity. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(6): 742-749. DOI 10.18699/VJ17.30-0 (in Russian)]
- Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Роль транспозонов в эпигенетической регуляции онтогенеза. *Онтогенез*. 2018;49(2):69-90. DOI 10.7868/S0475145018020015
- [Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. The role of transposons in epigenetic regulation of ontogenesis. *Russ. J. Dev. Biol.* 2018;49(2): 61-78. DOI 10.1134/S1062360418020066]
- Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Стресс-индуцированная активация транспозонов в экологическом морфогенезе. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(4):380-389. DOI 10.18699/VJ19.506
- [Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. The role of transposable elements in the ecological morphogenesis under influence of stress. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(4):380-389. DOI 10.18699/VJ19.506 (in Russian)]
- Arendt T., Ueberham U., Janitz M. Non-coding transcriptome in brain aging. *Aging*. 2017;9(9):1943-1944. DOI 10.18632/aging.101290
- Ashley J., Cody B., Lucia D., Fradkin L.G., Budnik V., Thomson T. Retrovirus-like Gag protein Arc1 binds RNA and traffics across synaptic boutons. *Cell*. 2018;172(1-2):262-274. DOI 10.1016/j.cell.2017.12.022
- Bachiller S., Del-Pozo-Martín Y., Carrion A.M. L1 retrotransposition alters the hippocampal genomic landscape enabling memory formation. *Brain Behav. Immun*. 2017;64:65-70. DOI 10.1016/j.bbi.2016.12.018
- Baek S.J., Ban H.J., Park S.M., Lee B., Choi Y., Baek Y., Lee S., Cha S. Circulating microRNAs as potential diagnostic biomarkers for poor sleep quality. *Nat. Sci. Sleep*. 2021;13:1001-1012. DOI 10.2147/NSS.S311541
- Baillie J.K., Barnett M.W., Upton K.R., Gerhardt D.J., Richmond T.A., De Sapio F., Brennan P.M., Rizzu P., Smith S., Fell M., Talbot R.T., Gustincich S., Freeman T.C., Mattick J.S., Hume D.A., Heutink P., Carninci P., Jeddelloh J.A., Faulkner G.J. Somatic retrotransposition alters the genetic landscape of the human brain. *Nature*. 2011; 479(7374):534-537. DOI 10.1038/nature10531
- Barak B., Shvarts-Serebro I., Modai S., Gilam A., Okun E., Michaelson D.M., Mattson M.P., Shomron N., Ashery U. Opposing actions of environmental enrichment and Alzheimer's disease on the expression of hippocampal microRNA in mouse models. *Transl. Psychiatry*. 2013;3(9):e304. DOI 10.1038/tp.2013.77
- Barros-Viegas A.T., Carmona V., Ferreira E., Guedes J., Cardoso A.M., Cunha P., de Almeida L.P., de Oliveira C.R., de Magalhães J.P.,

- Peca J., Cardoso A.L. miRNA-31 improves cognition and abolishes amyloid- $\beta$  pathology by targeting APP and BACE1 in an animal model of Alzheimer's disease. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 2020;19:1219-1236. DOI 10.1016/j.omtn.2020.01.010
- Bersten D.C., Wright J.A., McCarthy P.J., Whitelaw M.L. Regulation of the neuronal transcription factor NPAS4 by REST and microRNAs. *Biochim. Biophys. Acta*. 2014;1839(1):13-24. DOI 10.1016/j.bbagr. 2013.11.004
- Boese A.S., Saba R., Campbell K., Majer A., Medina S., Burton L., Booth T.F., Chong P., Westmacott G., Dutta S.M., Saba J.A., Booth S.A. MicroRNA abundance is altered in synaptoneurosomes during prion disease. *Mol. Cell. Neurosci*. 2016;71:13-24. DOI 10.1016/j.mcn.2015.12.001
- Bottero V., Potashkin J.A. Meta-analysis of gene expression changes in the blood of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease dementia. *Int. J. Mol. Sci*. 2019;20(21):5403. DOI 10.3390/ijms20215403
- Butler A.A., Johnston D.R., Kaur S., Lubin F.D. Long noncoding RNA NEAT1 mediates neuronal histone methylation and age-related memory impairment. *Sci. Signal*. 2019;12(588):eaaw9277. DOI 10.1126/scisignal.aaw9277
- Buurstede J.C., van Weert L.T.C.M., Coucci P., Gentenaar M., Viho E.M.G., Koorneef L.L., Schoonderwoerd R.A., Lanooij S.D., Moustakas I., Balog J., Mei H., Kielbasa S.M., Campolongo P., Roozendaal B., Meijer O.C. Hippocampal glucocorticoid target genes associated with enhancement of memory consolidation. *Eur. J. Neurosci*. 2022;55(9-10):2666-2683. DOI 10.1111/ejn.15226
- Cai Y., Sun Z., Jia H., Luo H., Ye X., Wu Q., Xiong Y., Zhang W., Wan J. *Rpph1* upregulates CDC42 expression and promotes hippocampal neuron dendritic spine formation by competing with miR-330-5p. *Front. Mol. Neurosci*. 2017;10:27. DOI 10.3389/fnmol.2017.00027
- Campillos M., Doerks T., Shah P.K., Bork P. Computational characterization of multiple Gag-like human proteins. *Trends Genet*. 2006; 22(11):585-589. DOI 10.1016/j.tig.2006.09.006
- Capitano F., Camon J., Licursi V., Ferretti V., Maggi L., Scianni M., Vecchio G.D., Rinaldi A., Mannironi C., Limatola C., Presutti C., Mele A. MicroRNA-335-5p modulates spatial memory and hippocampal synaptic plasticity. *Neurobiol. Learn. Mem*. 2017;139:63-68. DOI 10.1016/j.nlm.2016.12.019
- Chalartpet K., Pin-On P., Aporntewan C., Patchsung M., Ingrungruengler P., Israsena N., Mutirangura A. Argonaute 4 as an effector protein in RNA-directed DNA methylation in human cells. *Front. Genet*. 2019;10:645. DOI 10.3389/fgene.2019.00645
- Chen S., Cai D., Pearce K., Sun P.Y., Roberts A.C., Glanzman D.L. Reinstatement of long-term memory following erasure of its behavioral and synaptic expression in *Aplysia*. *eLife*. 2014;3:e03896. DOI 10.7554/eLife.03896
- Chen W., Qin C. General hallmarks of microRNAs in brain evolution and development. *RNA Biol*. 2015;12(7):701-708. DOI 10.1080/15476286.2015.1048954
- Chesnokova E., Beletskiy A., Kolosov P. The role of transposable elements of the human genome in neuronal function and pathology. *Int. J. Mol. Sci*. 2022;23(10):5847. DOI 10.3390/ijms23105847
- Chou M.Y., Hu M.C., Chen P.Y., Hsu C.L., Lin T.Y., Tan M.J., Lee C.Y., Kuo M.F., Huang P.H., Wu V.C., Yang S.H., Fan P.C., Huang H.Y., Akbarian S., Loo T.H., Stewart C.L., Huang H.P., Gau S.S., Huang H.S. RTL1/PEG11 imprinted in human and mouse brain mediates anxiety-like and social behaviors and regulates neuronal excitability in the locus coeruleus. *Hum. Mol. Genet*. 2022;31(18): 3161-3180. DOI 10.1093/hmg/ddac110
- Cobeta I.M., Stadler C.B., Li J., Yu P., Thor S., Benito-Sipos J. Specification of *Drosophila* neuropeptidergic neurons by the splicing component *brr2*. *PLoS Genet*. 2018;14(8):e1007496. DOI 10.1371/journal.pgen.1007496
- Cohen J.E., Lee P.R., Fields R.D. Systematic identification of 3'-UTR regulatory elements in activity-dependent mRNA stability in hippocampal neurons. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci*. 2014; 369(1652):20130509. DOI 10.1098/rstb.2013.0509
- Cosin-Tomás M., Antonell A., Lladó A., Alcolea D., Fortea J., Ezquerro M., Lleó A., Martí M.J., Pallàs M., Sanchez-Valle R., Mollinuevo J.L., Sanfeliu C., Kaliman P. Plasma miR-34a-5p and miR-545-3p as early biomarkers of Alzheimer's disease: potential and limitations. *Mol. Neurobiol*. 2017;54(7):5550-5562. DOI 10.1007/s12035-016-0088-8
- Coufal N.G., Garcia-Perez J.L., Peng G.E., Yeo G.W., Mu Y., Lovci M.T., Morell M., O'Shea K.S., Moran J.V., Gage F.H. L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. *Nature*. 2009; 460(7259):1127-1131. DOI 10.1038/nature08248
- Cui X., Zhang R., Yang Y., Wu E., Tang Y., Zhao Z., Li C., Yang L., Teng X., Ye Y., Cui Y., Xu F., Su Z., Wang D., Zhang D., Yang Y., Sun J., Luo J., Zhang S., Chen R., Xi J.J. Identification and characterization of long non-coding RNA *Carip* in modulating spatial learning and memory. *Cell. Rep*. 2022;38(8):110398. DOI 10.1016/j.celrep.2022.110398
- Dakterzada F., Benitez I.D., Targa A., Llado A., Torres G., Romero L., de Gonzalo-Calvo D., Moncusi-Moix A., Tort-Merino A., Huerto R., Sánchez-de-la-Torre M., Barbé F., Piñol-Ripoll G. Reduced levels of miR-342-5p in plasma are associated with worse cognitive evolution in patients with mild Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci*. 2021;13:705989. DOI 10.3389/fnagi.2021.705989
- Di Palo A., Siniscalchi C., Crescente G., De Leo I., Fiorentino A., Pacifico S., Russo A., Potenza N. Effect of cannabidiolic acid, *N*-trans-caffeoyltyramine and cannabidiol B from hemp seeds on microRNA expression in human neural cells. *Curr. Issues Mol. Biol*. 2022; 44(10):5106-5116. DOI 10.3390/cimb44100347
- Dlacić M., Mushegian A. Prp8, the pivotal protein of the spliceosomal catalytic center, evolved from a retroelement - encoded reverse transcriptase. *RNA*. 2011;17(5):799-808. DOI 10.1261/ma.2396011
- Dong Z., Gu H., Guo Q., Liang S., Xue J., Yao F., Liu X., Li F., Liu H., Sun L., Zhao K. Profiling of serum exosome miRNA reveals the potential of a miRNA panel as diagnostic biomarker for Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 2021;58(7):3084-3094. DOI 10.1007/s12035-021-02323-y
- Dong Z., Gu H., Guo Q., Liu X., Li F., Liu H., Sun L., Ma H., Zhao K. Circulating small extracellular vesicle-derived miR-342-5p ameliorates beta-amyloid formation via targeting beta-site APP cleaving enzyme 1 in Alzheimer's disease. *Cells*. 2022;11(23):3830. DOI 10.3390/cells11233830
- El Hajjar J., Chato W., Hanna R., Nkanza P., Tetrault N., Tse Y.C., Wong T.P., Abdouh M., Bernier G. Heterochromatic genome instability and neurodegeneration sharing similarities with Alzheimer's disease in old *Bmi1*<sup>+/-</sup> mice. *Sci. Rep*. 2019;9(1):594. DOI 10.1038/s41598-018-37444-3
- Espadas I., Wingfield J., Grinman E., Ghosh I., Chanda K., Nakahata Y., Bauer K., Raveendra B., Kiebler M., Yasuda R., Rangaraju V., Puthanveetil S. *SLAMR*, a synaptically targeted lncRNA, facilitates the consolidation of contextual fear memory. *Res. Sq. [Preprint]*. 2023;rs.3.rs-2489387. DOI 10.21203/rs.3.rs-2489387/v1
- Eysert F., Coulon A., Boscher E., Vreulx A.C., Flaig A., Mendes T., Hughes S., Grenier-Boley B., Hanouille X., Demiautte F., Bauer C., Martinen M., Takalo M., Amouyel P., Desai S., Pike I., Hiltunen M., Chécier F., Farinelli M., Delay C., Malmanche N., Hébert S.S., Dumont J., Kilinc D., Lambert J., Chapuis J. Alzheimer's genetic risk factor *FERMT2* (Kindlin-2) controls axonal growth and synaptic plasticity in an APP-dependent manner. *Mol. Psychiatry*. 2021; 26(10):5592-5607. DOI 10.1038/s41380-020-00926-w
- Grundman J., Spencer B., Sarsoza F., Rissman R.A. Transcriptome analyses reveal tau isoform-driven changes in transposable element and gene expression. *PLoS One*. 2021;16(9):e0251611. DOI 10.1371/journal.pone.0251611
- Gu Q.H., Yu D., Hu Z., Liu X., Yang Y., Luo Y., Zhu J., Li Z. miR-26a and miR-384-35p are required for LTP maintenance and spine enlargement. *Nat. Commun*. 2015;6:6789. DOI 10.1038/ncomms7789
- Guo R., Fan G., Zhang J., Wu C., Du Y., Ye H., Li Z., Wang L., Zhang Z., Zhang L., Zhao Y., Lu Z. A 9-microRNA signature in serum serves as a noninvasive biomarker in early diagnosis of Alz-



- heimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 2017;60(4):1365-1377. DOI 10.3233/JAD-170343
- Hajjri S.N., Sadigh-Eteghad S., Mehrpour M., Moradi F., Shanebandi D., Mehdizadeh M. Beta-amyloid-dependent mirnas as circulating biomarkers in Alzheimer's disease: a preliminary report. *J. Mol. Neurosci.* 2020;70(6):871-877. DOI 10.1007/s12031-020-01511-0
- Hanna R., Flamier A., Barabino A., Bernier G. G-quadruplexes originating from evolutionary conserved L1 elements interfere with neuronal gene expression in Alzheimer's disease. *Nat. Commun.* 2021; 12(1):1828. DOI 10.1038/s41467-021-22129-9
- Hegde A.N., Smith S.G. Recent developments in transcriptional and translational regulation underlying long-term synaptic plasticity and memory. *Learn. Mem.* 2019;26(9):307-317. DOI 10.1101/lm.048769.118
- Henriques A.D., Machado-Silva W., Leite R.E.P., Suemoto C.K., Leite K.R.M., Srougi M., Pereira A.C., Jacob-Filho W., Nóbrega O.T.; Brazilian Aging Brain Study Group. Genome-wide profiling and predicted significance of post-mortem brain microRNA in Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.* 2020;191:111352. DOI 10.1016/j.mad.2020.111352
- Hong H., Li Y., Su B. Identification of circulating miR-125b as a potential biomarker of Alzheimer's disease in APP/PS1 transgenic mouse. *J. Alzheimers Dis.* 2017;59(4):1449-1458. DOI 10.3233/JAD-170156
- Honson D.D., Macfarlan T.S. A lncRNA-like role for LINE1s in development. *Dev. Cell.* 2018;46(20):132-134. DOI 10.1016/j.devcel.2018.06.022
- Hu L., Zhang R., Yuan Q., Gao Y., Yang M.Q., Zhang C., Huang J., Sun Y., Yang W., Yang J.Y., Min Z.L., Cheng J., Deng Y., Hu X. The emerging role of microRNA-4487/6845-3p in Alzheimer's disease pathologies is induced by A $\beta$ 25-35 triggered in SH-SY5Y cell. *BMC Syst. Biol.* 2018;12(Suppl. 7):119. DOI 10.1186/s12918-018-0633-3
- Huang W., Li S., Hu Y.M., Yu H., Luo F., Zhang Q., Zhu F. Implication of the *env* gene of the human endogenous retrovirus W family in the expression of BDNF and DRD3 and development of recent-onset schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 2011;37(5):988-1000. DOI 10.1093/schbul/sbp166
- Jarome T.J., Lubin F.D. Epigenetic mechanisms of memory formation and reconsolidation. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2014;115:116-127. DOI 10.1016/j.nlm.2014.08.002
- Johnson R., Guigo R. The RIDL hypothesis: transposable elements as functional domains of long noncoding RNAs. *RNA.* 2014;20(7): 959-976. DOI 10.1261/rna.044560.114
- Ju M., Yang L., Zhu J., Chen Z., Zhang M., Yu J., Tian Z. MiR-664-2 impacts pubertal development in a precocious-puberty rat model through targeting the NMDA receptor-1 $\beta$ . *Biol. Reprod.* 2019; 100(6):1536-1548. DOI 10.1093/biolre/iox044
- Kaltschmidt B., Kaltschmidt C. NF-KappaB in long-term memory and structural plasticity in the adult mammalian brain. *Front. Mol. Neurosci.* 2015;8:69. DOI 10.3389/fnmol.2015.00069
- Kaneko-Ishino T., Ishino F. Evolution of brain functions in mammals and LTR retrotransposon-derived genes. *Virusu.* 2016;66(1):11-20. DOI 10.2222/jsv.66.11
- Kopera H.C., Moldovan J.B., Morrish T.A., Garcia-Perez J.L., Moran J.V. Similarities between long interspersed element-1 (LINE-1) reverse transcriptase and telomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011;108(51):20345-20350. DOI 10.1073/pnas.1100275108
- Kurnosov A.A., Ustyugova S.V., Nazarov V.I., Minervina A.A., Komkov A.Y., Shugay M., Pogorelyy M.V., Khodosevich K.V., Mamedov I.Z., Lebedev Y.B. The evidence for increased L1 activity in the site of human adult brain neurogenesis. *PLoS One.* 2015;10(2): e0117854. DOI 10.1371/journal.pone.0117854
- Lapp H.E., Hunter R.G. The dynamic genome: transposons and environmental adaptation in the nervous system. *Epigenomics.* 2016; 8(2):237-249. DOI 10.2217/epi.15.107
- Lau P., Bossers K., Janky R., Salta E., Frigerio C.S., Barbash S., Rothman R., Sierksma A.S., Thathiah A., Greenberg D., Papadopoulos A.S., Achsel T., Ayoubi T., Soreq H., Verhaagen J., Swaab D.F., Aerts S., Strooper B.D. Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer's disease. *EMBO Mol. Med.* 2013; 5(10):1613-1634. DOI 10.1002/emmm.201201974
- Leal G., Comprido D., Duarte C.B. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology.* 2014;76(Pt. C): 639-656. DOI 10.1016/j.neuropharm.2013.04.005
- Levine R.B. Changes in neuronal circuits during insect metamorphosis. *J. Exp. Biol.* 1984;112:27-44. DOI 10.1242/jeb.112.1.27
- Li L., Miao M., Chen J., Liu Z., Li W., Qiu Y., Xu S., Wang Q. Role of Ten eleven translocation-2 (Tet2) in modulating neuronal morphology and cognition in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 2021;157(4):993-1012. DOI 10.1111/jnc.15234
- Linker S.B., Randolph-Moore L., Kottlilil K., Qiu F., Jaeger B.N., Barron J., Gage F.H. Identification of bona fide B2 SINE retrotransposon transcription through single-nucleus RNA-seq of the mouse hippocampus. *Genome Res.* 2020;30(11):1643-1654. DOI 10.1101/gr.262196.120
- Lipsky R.H. Epigenetic mechanisms regulating learning and long-term memory. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2013;31(6):353-358. DOI 10.1016/j.ijdevneu.2012.10.110
- Liu Q.Y., Chang M.N.V., Lei J.X., Koukiekolo R., Smith B., Zhang D., Ghribi O. Identification of microRNAs involved in Alzheimer's progression using a rabbit model of the disease. *Am. J. Neurodegener. Dis.* 2014;3(1):33-44
- Lu L., Dai W., Zhu X., Ma T. Analysis of serum miRNAs in Alzheimer's disease. *Am. J. Alzheimers Dis. Other Dement.* 2021;36: 15333175211021712. DOI 10.1177/15333175211021712
- Lu X., Sachs F., Ramsay L., Jacques P.E., Göke J., Bourque G., Ng H.H. The retrovirus HERVH is a long noncoding RNA required for human embryonic stem cell identity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2014; 21(4):423-425. DOI 10.1038/nsmb.2799
- Lugli G., Cohen A.M., Bennett D.A., Shah R.C., Fields C.J., Hernandez A.G., Smalheiser N.R. Plasma exosomal miRNAs in persons with and without Alzheimer disease: altered expression and prospects for biomarkers. *PLoS One.* 2015;10(10):e0139233. DOI 10.1371/journal.pone.0139233
- Maag J.L.V., Panja D., Sporild I., Patil S., Koczorowski D.C., Bramham C.R., Dinger M.E., Wibrand K. Dynamic expression of long noncoding RNAs and repeat elements in synaptic plasticity. *Front. Neurosci.* 2015;9:351. DOI 10.3389/fnins.2015.00351
- Mager D.L., Stoye J.P. Mammalian endogenous retroviruses. *Microbiol. Spectr.* 2014;3(1):MDNA3-0009-2014. DOI 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0009-2014
- Mainigi M., Rosenzweig J.M., Lei J., Mensah V., Thomaier L., Talbot Jr. C.C., Olalere D., Ord T., Rozzah R., Johnston M., Burd I. Peri-implantation hormonal milieu: elucidating mechanisms of adverse neurodevelopmental outcomes. *Reprod. Sci.* 2016;23(6):785-794. DOI 10.1177/1933719115618280
- Majumder P., Chanda K., Das D., Singh B.K., Charkrabarti P., Jana N.R., Mukhopadhyay D. A nexus of miR-1271, PAX4 and ALK/Ryk influences the cytoskeletal architectures in Alzheimer's disease and type 2 diabetes. *Biochem. J.* 2021;478(17):3297-3317. DOI 10.1042/BCJ20210175
- Michely J., Kraft S., Muller U. miR-12 and miR-124 contribute to defined early phases of long-lasting and transient memory. *Sci. Rep.* 2017;7(1):7910. DOI 10.1038/s41598-017-08486-w
- Miller C.A., Gavin C.F., White J.A., Parrish R.R., Honasoge A., Yancey C.R., Rivera I.M., Rubio M.D., Rumbaugh G., Sweatt J.D. Cortical DNA methylation maintains remote memory. *Nat. Neurosci.* 2010;13(6):664-666. DOI 10.1038/nn.2560
- Muotri A.R., Chu V.T., Marchetto M.C., Deng W., Moran J.V., Gage F.H. Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature.* 2005;435(7044):903-910. DOI 10.1038/nature03663
- Muotri A.R., Marchetto M.C., Coufal N.G., Oefner R., Yeo G., Nankashima K., Gage F.H. L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2. *Nature.* 2010;468(7322):443-446. DOI 10.1038/nature09544

- Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. Epigenetic hypothesis of the role of peptides in aging. *Adv. Gerontol.* 2018;8(3):200-209. DOI 10.1134/S2079057018030128
- Noyes N.C., Phan A., Davis R.L. Memory suppressor genes: Modulating acquisition, consolidation, and forgetting. *Neuron.* 2021;109(20):3211-3227. DOI 10.1016/j.neuron.2021.08.001
- Ortega-de San Luis C., Ryan T.J. Understanding the physical basis of memory: Molecular mechanisms of the engram. *J. Biol. Chem.* 2022;298(5):101866. DOI 10.1016/j.jbc.2022.101866
- Pan W., Hu Y., Wang L., Jing L. Circ\_0003611 acts as a miR-885-5p sponge to aggravate the amyloid- $\beta$ -induced neuronal injury in Alzheimer's disease. *Metab. Brain Dis.* 2022;37(4):961-971. DOI 10.1007/s11011-022-00912-x
- Pandya N.J., Wang C., Costa V., Lopatta P., Meier S., Zampeta F.I., Punt A.M., Mientjes E., Grossen P., Distler T., Tzouros M., Martí Y., Banfai B., Patsch C., Rasmussen S., Hoener M., Berrera M., Krenner T., Dunkley T., Ebeling M., Distel B., Elgersma Y., Jagasia R. Secreted retrovirus-like GAG-domain-containing protein PEG10 is regulated by UBE3A and is involved in Angelman syndrome pathophysiology. *Cell Rep. Med.* 2021;2(8):100360. DOI 10.1016/j.xcrm.2021.100360
- Parsons M.J., Grimm C., Paya-Cano J.L., Fernandes C., Liu L., Phillip V.M., Chesler E.J., Niefeld W., Lehrach H., Schalkwyk L.C. Genetic variation in hippocampal microRNA expression differences in C57BL/6 J X DBA/2 J (BXD) recombinant inbred mouse strains. *BMC Genomics.* 2012;13:476. DOI 10.1186/1471-2164-13-476
- Pastuzyn E.D., Day C.E., Kearns R.B., Kyrke-Smith M., Taibi A.V., McCormick J., Yoder N., Belnap D.M., Erlendsson S., Morado D.R., Briggs J.A.G., Feschotte C., Shepherd J.D. The neuronal gene *Arc* encodes a repurposed retrotransposon Gag protein that mediates intercellular RNA transfer. *Cell.* 2018;172(1-2):275-288.e18. DOI 10.1016/j.cell.2017.12.024
- Patel A.A., Ganepola G.A.P., Rutledge J.R., Chang D.H. The potential role of dysregulated miRNAs in Alzheimer's disease pathogenesis and progression. *J. Alzheimers Dis.* 2019;67(4):1123-1145. DOI 10.3233/JAD-181078
- Perrat P.N., DasGupta S., Wang J., Theurkauf W., Weng Z., Rosbash M., Waddell S. Transposon-driven genomic heterogeneity in the *Drosophila* brain. *Science.* 2013;340(6128):91-95. DOI 10.1126/science.1231965
- Pisopo P., Albani D., Castellano A.E., Forloni G., Confaloni A. Frontotemporal lobar degeneration and microRNAs. *Front. Aging Neurosci.* 2016;8:17
- Puig-Parnau I., Garcia-Brito S., Faghihi N., Gubern C., Aldavert-Vera L., Segura-Torres P., Huguet G., Kadar E. Intracranial self-stimulation modulates levels of SIRT1 protein and neural plasticity-related microRNAs. *Mol. Neurobiol.* 2020;57(6):2551-2562. DOI 10.1007/s12035-020-01901-w
- Qin Z., Han X., Ran J., Guo S., Lv L. Exercise-mediated alteration of miR-192-5p is associated with cognitive improvement in Alzheimer's disease. *Neuroimmunomodulation.* 2022;29(1):36-43. DOI 10.1159/000516928
- Raheja R., Regev K., Healy B.C., Mazzola M.A., Beynon V., Von Glehn F., Paul A., Diaz-Cruz C., Gholipour T., Glanz B.I., Kivisakk P., Chitnis T., Weiner H.L., Berry J.D., Gandhi R. Correlating serum microRNAs and clinical parameters in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 2018;58(2):261-269. DOI 10.1002/mus.26106
- Rahman M.R., Islam T., Zaman T., Shahjaman M., Karim M.R., Huq F., Quinn J.M.W., Holsinger R.M.D., Gov E., Moni M.A. Identification of molecular signatures and pathways to identify novel therapeutic targets in Alzheimer's disease: Insights from a systems biomedicine perspective. *Genomics.* 2020;112(2):1290-1299. DOI 10.1016/j.ygeno.2019.07.018
- Ramirez P., Zuniga G., Sun W., Beckmann A., Ochoa E., DeVos S.L., Hyman B., Chiu G., Roy E.R., Cao W., Orr M., Buggia-Prevot V., Ray W.J., Frost B. Pathogenic tau accelerates aging-associated activation of transposable elements in the mouse central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 2022;208:102181. DOI 10.1016/j.pneurobio.2021.102181
- Ramsay L., Marchetto M.C., Caron M., Chen S.H., Busche S., Kwan T., Pastinen T., Gage F.H., Bourque G. Conserved expression of transposon-derived non-coding transcripts in primate stem cells. *BMC Genomics.* 2017;18(1):214-226. DOI 10.1186/s12864-017-3568-y
- Rodic N., Burns K.H. Long interspersed element-1 (LINE-1): passenger or driver in human neoplasms. *PLoS Genetics.* 2013;9(3):e1003402. DOI 10.1371/journal.pgen.1003402
- Ryan B., Logan B.J., Abraham W.C., Williams J.M. MicroRNAs, miR-23a-3p and miR-151-3p, are regulated in dentate gyrus neuropil following induction of long-term potentiation *in vivo*. *PLoS One.* 2017;12(1):e0170407. DOI 10.1371/journal.pone.0170407
- Ryan T.J., Roy D.S., Pignatelli M., Arons A., Tonegawa S. Memory. Engram cells retain memory under retrograde amnesia. *Science.* 2015;348(6238):1007-1013. DOI 10.1126/science.aaa5542
- Samaddar S., Banejee S. Far from the nuclear crowd: Cytoplasmic lncRNA and their implications in synaptic plasticity and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2021;185:107522. DOI 10.1016/j.nlm.2021.107522
- Samadian M., Gholipour M., Hajiesmaeili M., Taheri M., Ghafouri-Fard S. The eminent role of microRNAs in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* 2021;13:641080. DOI 10.3389/fnagi.2021.641080
- Satoh J., Kino Y., Niida S. MicroRNA-Seq data analysis pipeline to identify blood biomarkers for Alzheimer's disease from public data. *Biomark. Insight.* 2015;10:21-31. DOI 10.4137/BMI.S25132
- Schipper H.M., Maes O.C., Chertkow H.M., Wang E. MicroRNA expression in Alzheimer blood mononuclear cells. *Gene Regul. Syst. Bio.* 2007;1:263-274. DOI 10.4137/grsb.s361
- Schonrock N., Ke Y.D., Humphreys D., Staufenbiel M., Ittner L.M., Preiss T., Götz J. Neuronal microRNA deregulation in response to Alzheimer's disease amyloid- $\beta$ . *PLoS One.* 2010;5(6):e11070. DOI 10.1371/journal.pone.0011070
- Shomrat T., Levin M. An automated training paradigm reveals long-term memory in planarians and its persistence through head regeneration. *J. Exp. Biol.* 2013;216(Pt. 20):3799-3810. DOI 10.1242/jeb.087809
- Sierksma A., Lu A., Salta E., Vanden Eynden E., Callaerts-Vegh Z., D'Hooge R., Blum D., Buée L., Fiers M., De Strooper B. Deregulation of neuronal miRNAs induced by amyloid- $\beta$  or TAU pathology. *Mol. Neurodegener.* 2018;13(1):54. DOI 10.1186/s13024-018-0285-1
- Singer T., McConnell M.J., Marchetto M.C.N., Coufal N.G., Gage F.H. LINE-1 retrotransposons: mediators of somatic variation in neuronal genomes. *Trends Neurosci.* 2010;33(8):345-354. DOI 10.1016/j.tins.2010.04.001
- Song S., Pan Y., Li H., Zhen H. MiR-1202 exerts neuroprotective effects on OGD/R induced inflammation in HM cell by negatively regulating Rab1a involved in TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Neurochem. Res.* 2020;45(5):1120-1129. DOI 10.1007/s11064-020-02991-7
- Sun C., Liu J., Duan F., Cong L., Qi X. The role of the microRNA regulatory network in Alzheimer's disease: a bioinformatics analysis. *Arch. Med. Sci.* 2021;18(1):206-222. DOI 10.5114/aoms/80619
- Sun W., Samimi H., Gamez M., Zare H., Frost B. Pathogenic tau-induced piRNA depletion promotes neuronal death through transposable element dysregulation in neurodegenerative tauopathies. *Nat. Neurosci.* 2018;21(8):1038-1048. DOI 10.1038/s41593-018-0194-1
- Sun X., Deng Y., Ge P., Peng Q., Soufiany I., Zhu L., Duan R. Diminazene ameliorates neuroinflammation by suppression of astrocytic miRNA-224-5p/NLRP3 axis in Alzheimer's disease model. *J. Inflamm. Res.* 2023;16:1639-1652. DOI 10.2147/JIR.S401385
- Tan L., Yu J.T., Tan M.S., Liu Q.Y., Wang H.F., Zhang W., Jiang T., Tan L. Genome-wide serum microRNA expression profiling identifies serum biomarkers for Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 2014;40(4):1017-1027. DOI 10.3233/JAD-132144

- Tan X., Luo Y., Pi D., Xia L., Li Z., Tu Q. MiR-340 reduces the accumulation of amyloid- $\beta$  through targeting BACE1 ( $\beta$ -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1) in Alzheimer's disease. *Curr. Neurovasc. Res.* 2020;17(1):86-92. DOI 10.2174/1567202617666200117103931
- Tan Y., Yu D., Busto G.U., Wilson C., Davis R.L. *Wnt* signaling is required for long-term memory formation. *Cell Rep.* 2013;4(6):1082-1089. DOI 10.1016/j.celrep.2013.08.007
- Tang C.Z., Yang J.T., Liu Q.H., Wang Y.R., Wang W.S. Up-regulated miR-192-5p expression rescues cognitive impairment and restores neural function in mice with depression via the *Fbln2*-mediated TGF- $\beta$ 1 signaling pathway. *FASEB J.* 2019;33(1):606-618. DOI 10.1096/fj.201800210RR
- Upton K., Gerhardt D.J., Jesuadian J.S., Richardson S.R., Sanchez-Luque F.J., Bodea G.O., Ewing A.D., Salvador-Palomeque C., van der Knaap M.S., Brennan P.M., Vanderver A., Faulkner G.J. Ubiquitous L1 mosaicism in hippocampal neurons. *Cell.* 2015;161(2):228-239. DOI 10.1016/j.cell.2015.03.026
- Van Meter M., Kashyap M., Rezazadeh S., Geneva A.J., Morello T.D., Seluanov A., Gorbunova V. SIRT6 represses LINE1 retrotransposons by ribosylating KAP1 but this repression fails with stress and age. *Nat. Commun.* 2014;5:5011. DOI 10.1038/ncomms6011
- Vatsa N., Kumar V., Singh B.K., Kumar S.S., Sharma A., Jana N.R. Down-regulation of miRNA-708 promotes aberrant calcium signaling by targeting neuronatin in a mouse model of angelman syndrome. *Front. Mol. Neurosci.* 2019;12:35. DOI 10.3389/fnmol.2019.00035
- Wang T., Zhao W., Liu Y., Yang D., He G., Wang Z. MicroRNA-511-3p regulates A $\beta$ <sub>1-40</sub> induced decreased cell viability and serves as a candidate biomarker in Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.* 2023;178:112195. DOI 10.1016/j.exger.2023.112195
- Wei G., Qin S., Li W., Chen L., Ma F. MDTE DB: a database for microRNAs derived from Transposable element. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform.* 2016;13(6):1155-1160. DOI 10.1109/TCBB.2015.2511767
- Weng H.R., Taing K., Chen L., Penney A. EZH2 methyltransferase regulates neuroinflammation and neuropathic pain. *Cells.* 2023;12(7):1058. DOI 10.3390/cells12071058
- Wibrand K., Pai B., Siripornmongkolchai T., Bittins M., Berentsen B., Ofte M.L., Weigel A., Skaftnesmo K.O., Bramham C.R. MicroRNA regulation of the synaptic plasticity-related gene *Arc*. *PLoS One.* 2012;7(7):e41688. DOI 10.1371/journal.pone.0041688
- Wolf G., Yang P., Füchtbauer A.C., Füchtbauer E.M., Silva A.M., Park C., Wu W., Nielsen A.L., Pedersen F.S., Macfarlan T.S. The KRAB zinc finger protein ZFP809 is required to initiate epigenetic silencing of endogenous retroviruses. *Genes Dev.* 2015;29(5):538-554. DOI 10.1101/gad.252767.114
- Xu X.F., Wang Y.C., Zong L., Wang X.L. miR-151-5p modulates APH1a expression to participate in contextual fear memory formation. *RNA Biol.* 2019;16(3):282-294. DOI 10.1080/15476286.2019.1572435
- Xu X., Gu D., Xu B., Yang C., Wang L. Circular RNA circ\_0005835 promotes neural stem cells proliferation and differentiate to neuron and inhibits inflammatory cytokines levels through miR-576-ep in Alzheimer's disease. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2022;29(24):35934-35943. DOI 10.1007/s11356-021-17478-3
- Yaqub A., Mens M.M.J., Klap J.M., Weverling G.J., Klaser P., Brakenhoff J.P.J., Roshchupkin G.V., Ikram M.K., Ghanbari M., Ikram M.A. Genome-wide profiling of circulatory microRNAs associated with cognition and dementia. *Alzheimers Dement.* 2023;19(4):1194-1203. DOI 10.1002/alz.12752
- Yuen S.C., Liang X., Zhu H., Jia Y., Leung S. Prediction of differentially expressed microRNAs in blood as potential biomarkers for Alzheimer's disease by meta-analysis and adaptive boosting ensemble learning. *Alzheimers Res. Ther.* 2021;13(1):126. DOI 10.1186/s13195-021-00862-z
- Zhang C., Lu J., Liu B., Cui Q., Wang Y. Primate-specific miR-603 is implicated in the risk and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Aging.* 2016;8(2):272-290. DOI 10.18632/aging.100887
- Zhang H., Li J., Ren J., Sun S., Ma S., Zhang W., Yu Y., Cai Y., Yan K., Li W., Hu B., Chan P., Zhao G.G., Belmonte J.C.I., Zhou Q., Qu J., Wang S., Liu G.H. Single-nucleus transcriptomic landscape of primate hippocampal aging. *Protein Cell.* 2021;12(9):695-716. DOI 10.1007/s13238-021-00852-9
- Zhang W.J., Huang Y.Q., Fu A., Chen K.Z., Li S.J., Zhang Q., Zou G.J., Liu Y., Su J.Z., Zhou S.F., Liu J.W., Li F., Bi F.F., Li C.Q. The retrotransposition of L1 is involved in the reconsolidation of contextual fear memory in mice. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2021;20(3):273-284. DOI 10.2174/1871527319666200812225509
- Zhao X., Wang S., Sun W. Expression of miR-28-3p in patients with Alzheimer's disease before and after treatment and its clinical value. *Exp. Ther. Med.* 2020;20(3):2218-2226. DOI 10.3892/etm.2020.8920
- Zheng D., Sabbagh J.J., Blair L.J., Darling A.L., Wen X., Dickey C.A. MicroRNA-511 binds to FKBP5 mRNA, which encodes a chaperone protein, and regulates neuronal differentiation. *J. Biol. Chem.* 2016;291(34):1797-1806. DOI 10.1074/jbc.M116.727941
- Zhou Q.G., Liu M.Y., Lee H.W., Ishikawa F., Devkota S., Shen X.R., Jin X., Wu H.Y., Liu Z., Liu X., Jin X., Zhou H.H., Ro E.J., Zhang J., Zhang Y., Lin Y.H., Suh H., Zhu D.Y. Hippocampal TERT regulates spatial memory formation through modulation of neural development. *Stem Cell Reports.* 2017;9(2):543-556. DOI 10.1016/j.stemcr.2017.06.014


**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 02.11.2023. После доработки 07.02.2024. Принята к публикации 20.02.2024.



DOI 10.18699/vjgb-24-55

# Generation and analysis of mouse embryonic stem cells with knockout of the *Mcp1* (microcephalin) gene

A.M. Yunusova , A.V. Smirnov , T.A. Shnaider , I.E. Pristyazhnuk , S.Y. Korableva<sup>2</sup>, N.R. Battulin <sup>1, 2</sup><sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia anastasiajunusova@gmail.com

**Abstract.** Chromatin is not randomly distributed within the nucleus, but organized in a three-dimensional structure that plays a critical role in genome functions. Cohesin and condensins are conserved multi-subunit protein complexes that participate in mammalian genome organization by extruding chromatin loops. The fine temporal regulation of these complexes is facilitated by a number of other proteins, one of which is microcephalin (*Mcp1*). *Mcp1* prevents condensin II from associating with chromatin through interphase. Loss of *Mcp1* induces chromosome hypercondensation; it is not clear to what extent this reorganization affects gene expression. In this study, we generated several mouse embryonic stem cell (mESC) lines with knockout of the *Mcp1* gene and analyzed their gene expression profile. Gene Ontology analyses of differentially expressed genes (DEGs) after *Mcp1* knockout revealed gene categories related to general metabolism and olfactory receptor function but not to cell cycle control previously described for *Mcp1*. We did not find a correlation between the DEGs and their frequency of lamina association. Thus, this evidence questions the hypothesis that *Mcp1* knockout-mediated chromatin reorganization governs gene expression in mESCs. Among the negative effects of *Mcp1* knockout, we observed numerous chromosomal aberrations, including micronucleus formation and chromosome fusion. This confirms the role of *Mcp1* in maintaining genome integrity described previously. In our opinion, dysfunction of *Mcp1* may be a kind of “Rosetta stone” for deciphering the function of condensin II in the interphase nucleus. Thus, the cell lines with knocked-out *Mcp1* can be used to further study the influence of chromatin structural proteins on gene expression.








**Key words:** *Mcp1*/microcephalin; chromosome condensation; mESCs; gene expression analysis.

**For citation:** Yunusova A.M., Smirnov A.V., Shnaider T.A., Pristyazhnuk I.E., Korableva S.Y., Battulin N.R. Generation and analysis of mouse embryonic stem cells with knockout of the *Mcp1* (microcephalin) gene. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(5):487-494. DOI 10.18699/vjgb-24-55

**Funding.** This work was supported by grant No. 22-74-00112 from the Russian Science Foundation.

**Acknowledgements.** Cell culture was performed at the Collective Center of ICG SB RAS “Collection of Pluripotent Human and Mammalian Cell Cultures for Biological and Biomedical Research”, project number FWNr-2022-0019 (<https://ckp.icgen.ru/cells>; [http://www.biores.cytogen.ru/brc\\_cells/collections/ICG\\_SB\\_RAS\\_CELL](http://www.biores.cytogen.ru/brc_cells/collections/ICG_SB_RAS_CELL)).

## Получение и характеристика линий эмбриональных стволовых клеток мыши с нокаутом гена *Mcp1* (микроцефалин)

A.M. Юнусова , A.B. Смирнов , Т.А. Шнайдер , И.Е. Пристяжнюк , С.Ю. Кораблёва<sup>2</sup>, Н.Р. Баттулин <sup>1, 2</sup><sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия anastasiajunusova@gmail.com

**Аннотация.** Хроматин в ядре клетки распределен не хаотично, а имеет организованную структуру, которая оказывает прямое влияние на функционирование генома. Одними из основных архитектурных белков хроматина в клетках млекопитающих являются консервативные мультисубъединичные белковые комплексы: когезин и конденсины. Эти комплексы способны протягивать петли хроматина, опосредуя контакты между удаленными участками ДНК. Тонкая временная регуляция их активности осуществляется рядом других белков, один из которых – микроцефалин (*Mcp1*). *Mcp1* препятствует взаимодействию конденсина II с хроматином в интерфазе. При нарушении его функции наблюдается масштабная реорганизация хроматина, вызванная аномальной нагрузкой конденсина II. Как это сказывается на экспрессии генов, до сих пор неизвестно. В данном исследовании мы создали несколько линий эмбриональных стволовых клеток мыши с нокаутом гена *Mcp1*, охарактеризовали их и проанализировали профиль экспрессии генов. Аннотация дифференциально экспрессирующихся генов в терминах генной онтологии выявила категории генов, относящиеся к общему метаболиз-

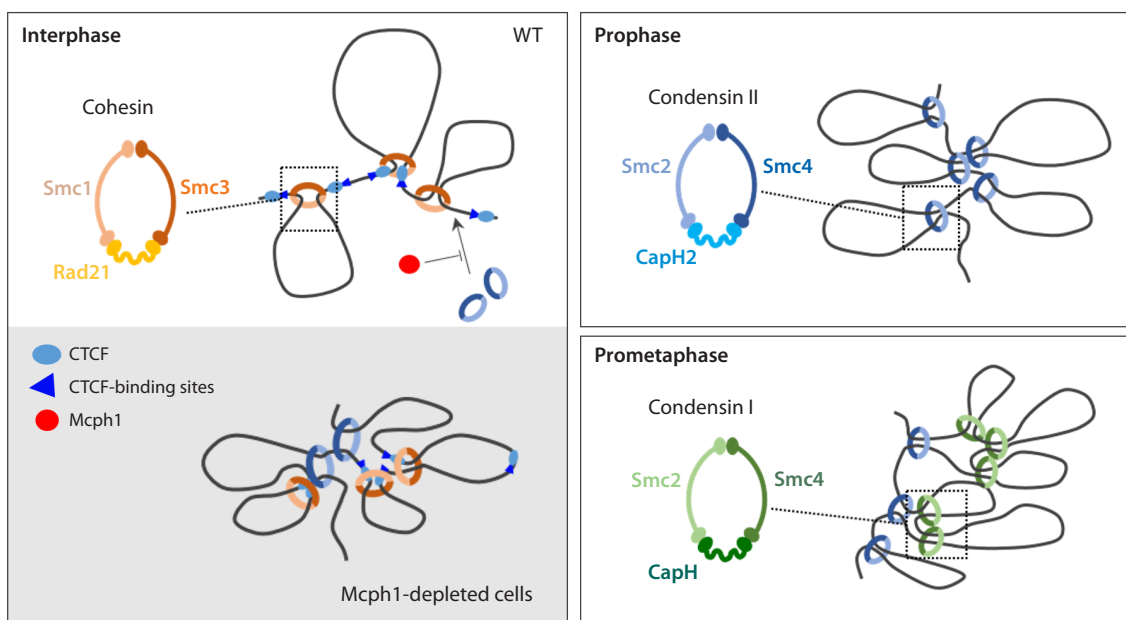
му и функционированию обонятельных рецепторов, но не к регуляции клеточного цикла, описанной ранее для *Mscr1*. Мы также не обнаружили корреляции между генами, изменившими свою транскрипционную активность после нокаута *Mscr1*, и вероятностью их локализации на ядерной ламине. Этот результат ставит под сомнение гипотезу о влиянии опосредованной нокаутом *Mscr1* архитектуры хроматина на экспрессию генов. Среди негативных эффектов нокаута *Mscr1* мы наблюдали множественные хромосомные aberrации, включая нарушения сегрегации хромосом с образованием микроядер, а также слияние хромосом. Это подтверждает описанную в предыдущих исследованиях роль белка *Mscr1* в поддержании целостности структуры генома. Мы полагаем, что нокаут *Mscr1* может оказаться своеобразным «розеттским камнем», способным расшифровать функции конденсина II в интерфазном ядре. Полученные нами линии эмбриональных стволовых клеток с нокаутом гена *Mscr1* могут быть использованы для дальнейшего изучения влияния структурных белков хроматина на экспрессию генов.

**Ключевые слова:** *Mscr1* (микрoцефалин); конденсация хромосом; ЭС клетки мыши; транскриптомный анализ.

## Introduction

The three-dimensional organization of chromatin plays a crucial role in maintaining genome stability and regulating key cellular processes such as DNA replication, DNA repair, and gene expression (Marchal et al., 2019; Stadhouders et al., 2019; Sanders et al., 2020). Interphase chromosomes are decondensed and distributed all over the nucleus. Contacts between distant genomic regions are important in the regulation of gene expression and mediated by CTCF and cohesin complexes (SMC family of ATPases) (Dixon et al., 2012; Rao et al., 2014) (Fig. 1). The transition from interphase to mitosis leads to significant chromatin structure changes: chromosomes become highly compacted due to the loading of condensin complexes – other members of the SMC protein family (Earnshaw, Laemmli, 1983; Naumova et al., 2013). Condensin II builds large regular chromatin loops early in mitosis forming helically arranged axial scaffold, whereas condensin I generates smaller nested loops inside the large loop and promotes the widening of the chromosomes. As mitosis progresses, outer loops grow and the number of loops per turn increases, promoting axial shortening of the chromosomes (Gibcus et al., 2018) (Fig. 1).

In recent years, interest in condensin complexes as motor proteins involved in establishing chromatin loops has greatly increased driven by advances in 3D genomics and super-resolution microscopy methods. However, many of their functions remain unclear. One of the most intriguing questions is the role of condensin II in the interphase nucleus (Wallace, Bosco, 2013). Unlike cytoplasmic condensin I, which interacts with chromatin only after nuclear envelope breakdown, condensin II is present in the nucleus throughout interphase (Hirota et al., 2004; Ono et al., 2004). Some studies suggest that condensin II loads coordinately with cohesin and transcription factor TFIIC onto chromatin at the promoters of actively transcribed genes (Dowen et al., 2013; Yuen et al., 2017). Other studies indicated that condensin II does not play any significant role during interphase since the depletion of condensin II in non-dividing cells does not lead to changes in the spatial organization of the genome or gene transcriptional activity (Abdennur et al., 2018; Hoencamp et al., 2021). It is well established that condensin II's activity during interphase is blocked by microcephalin (*Mcp1*) (Trimborn et al., 2006; Yamashita et al., 2011; Houlard et al., 2021). *Mcp1* is a multifunctional protein that also participates in DNA repair, cell



**Fig. 1.** DNA loop extrusion by SMC (Structural maintenance of chromosomes) complexes during cell-cycle progression in WT and *Mcp1*-depleted cells.

cycle control, apoptosis, and chromatin remodeling (reviewed by (Kristofova et al., 2022)). *Mcp1* binds to condensin II through its short linear motif in the central domain thereby blocking the condensin II interaction with chromatin (Houlard et al., 2021). Disruption of *Mcp1* function leads to chromosome condensation of interphase nuclei (Fig. 1). As a result, mutant cells acquire a unique phenotype characterized by prophase-like compacted chromosomes during interphase (Neitzel et al., 2002; Gruber et al., 2011).

It has been shown that in mouse embryonic stem cells (mESCs) *Mcp1* knockout leads to altered chromatin architecture by enhancing the mixing of A and B chromatin compartments. This is consistent with microscopic observations – highly condensed chromosomes become “individualized” in the interphase nuclei, while the chromocenters have disappeared (Houlard et al., 2021). Whether these chromatin state changes can affect gene expression is not clearly understood. To address this issue, we generated mESCs with stable *Mcp1* knockout and analyzed the changes in gene expression profiles.

## Materials and methods

**Mouse embryonic stem cells culture.** All  $\Delta$ *Mcp1* cell lines were generated from mouse ES cells (Rad21-miniIAA7-eGFP) previously established in our laboratory (Menzorov et al., 2019; Yunusova et al., 2021). Cells were cultured on the plates coated with a 1 % gelatin solution under 2i conditions, which ensures the pluripotency by specifically blocking the MAPK–ERK pathway (PD0325901, 1  $\mu$ M) and glycogen synthase kinase 3 (CHIR99021, 3  $\mu$ M) in DMEM (Thermo Fisher), supplemented with 7.5 % ES FBS (Gibco), 7.5 % KSR (Gibco), 1 mM L-glutamine (Sigma), NEAA (Gibco), 0.1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, LIF (1,000 U/ml, Polygen), and 1 $\times$  penicillin/streptomycin (Capricorn Scientific). The growth medium was changed to a fresh one every day. Upon reaching appropriate confluence (70–80 %), the cells were passaged every 2–3 days.

**Gene targeting of the *Mcp1* gene in mESCs.** The sequences of guide RNAs were taken from the article (Houlard et al., 2021). gRNAs were cloned into the gRNA\_cloning vector (Addgene, 41824). For exogenous Cas9 expression, the vector pCSDest2-2XNLS-SpCas9-WT-NLS-3XHA-NLS-TALentry (Addgene, 69232) was used. The plasmids were introduced into cells via electroporation (Neon Transfection System, Thermo Fisher Scientific, USA) as follows: for each 10  $\mu$ l electroporation, 250,000 cells and 1  $\mu$ g of total DNA (with an equimolar ratio of the two vectors) were used. Electroporation was performed following the manufacturer’s protocol under conditions 6 and 10, previously determined as the most optimal for efficiency/survival ratio for mouse ESCs in our laboratory. After electroporation, cells were seeded into a 24-well plate in pre-warmed media without antibiotics. The next day cells were split into 10 cm dishes at low density. The medium was changed every 2–3 days. After single-cell clones were visible, a subset of clones was handpicked with pipette tips under the light microscope and transferred into a drop of trypsin/EDTA in each well of a 96-well plate, and then resuspended in growth medium. Upon reaching a confluent density, subclones were plated into two new 96-well plates (one for stock storage and one for PCR-genotyping).

For PCR-genotyping, cells were lysed in PBNB buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.45 % NP-40, and 0.45 % Tween 20, pH 8.3) containing 1  $\mu$ g/ $\mu$ l proteinase K (NEB, USA) for an hour at 55 °C. After inactivation of proteinase K (95 °C, 10 minutes), 1  $\mu$ l of lysate was used as a template for PCR amplification of the Cas9-target site. The target region included exon 2 of the *Mcp1* gene and was amplified using HS-Taq DNA Polymerase kit (Biolabmix, Russia) under the following conditions: 95 °C for 30 s, followed by 34 cycles of 95 °C – 10 s, 60 °C – 20 s, 72 °C – 1 min, and a final elongation at 72 °C for 5 minutes. The primers used were: *Mcp1*-del-F – ACCACATGCTTTGGCGTAGA and *Mcp1*-del-R – GCCAGACTCAAGTCTCCAC. Amplified DNA fragments were separated on 2 % agarose gel. For selected subclones, amplicons were purified and their nucleotide sequence was determined by Sanger sequencing.

**Protein detection by Western Blotting.** Growth medium was discarded and cells were washed with PBS and scraped from the surface in the presence of RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0.5 % sodium deoxycholate, and 0.1 % SDS) containing the protease inhibitor cocktail [1x Complete ULTRA, 1x PhosSTOP (both from Roche, Switzerland), 5 mM NaF (Sigma-Aldrich, USA)]. After that, the cell lysates were sonicated by three 10 s pulses at 33–35 % power settings with UW 2070 (Bandelin electronics, Germany). The sonicated samples were centrifuged at 14,000 g for 20 min at 2 °C, frozen, and stored at –80 °C. The protein concentrations were quantified according to instruction’s protocol by using Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Equal amounts of the denatured total protein (20  $\mu$ g) were separated on 10 % SDS-PAGE gel and then transferred onto the Immun-Blot PVDF membrane (Bio-Rad). After blocking in 5 % milk in TBST (50 mM Tris base, 150 mM NaCl, 0.05 % (v/v) Tween 20) for 2 h, the membranes were incubated with primary antibodies against *Mcp1* protein (D38G5) Rabbit mAb #4120 (Cell Signaling Technology, USA) at a 1:1,000 dilution overnight at 4 °C. On the following day, after three washes with TBST buffer (10 min) membranes were incubated with horseradish peroxidase – conjugated secondary antibodies (Anti-rabbit IgG #7074, Cell Signaling Technology) for 2 h at room temperature. Detection was performed with Clarity™ (BioRAD, USA) and iBright™ FL1500 (Thermo Fisher Scientific, USA).

**RNA extraction and transcriptome sequencing.** The isolation of total RNA was performed using Trizol reagent (Sigma-Aldrich, MA, USA) following the manufacturer’s instructions. The isolated RNA samples were resuspended in DEPC-treated water, then RNA concentration and quality were assessed by spectrophotometry and gel electrophoresis. Total RNA was sequenced on the BGISEQ-500 High-throughput Sequencing Platform (BGI, Beijing, China). The expression of RNA transcripts was quantified using Salmon (Patro et al., 2017). All analyses were performed using R Statistical Software (v4.3.2; R Core Team 2023). Raw counts were processed and normalized by Log<sub>2</sub> fold change using tximport (<https://github.com/thevelab/tximport>), genefilter (<https://github.com/Bioconductor/genefilter>), GenomicFeatures (<https://github.com/Bioconductor/GenomicFeatures>) and DESeq2 (<https://github.com/thevelab/DESeq2>). Volcano plots were constructed using the EnhancedVolcano R package (<https://github.com/thevelab/EnhancedVolcano>).



github.com/kevinblighe/EnhancedVolcano). The heat map was generated using the ComplexHeatmap (<https://github.com/jokergoo/ComplexHeatmap>). The gene ontology term enrichment analysis was carried out using the PANTHER server (<https://www.pantherdb.org>). The set of genes specifically expressed in mESCs with a base mean level  $\geq 100$  was used as a reference set.

To examine whether the differences in gene expression in  $\Delta Mcp1$  cell lines were associated with the differences in lamina association, we used the LaminB1-DamID libraries from (Borsos et al., 2019). Next, we determined the DamID score in a 100 kb bin containing the coordinates of the transcription start sites of DEGs (Supplementary Material 1)<sup>1</sup>. To determine the correlation between the DamID score and the magnitude of the change in activity ( $\log_2\text{FoldChange}$ ), the Pearson correlation coefficient was calculated for each gene.

**Cell cycle analysis by flow cytometry.** After trypsinization, cell pellets were washed with PBS and resuspended in cold 70 % ethanol for fixation overnight at 4 °C. The next day, the fixed cells were centrifuged and the fixative was thoroughly removed. The cell pellet was suspended in PI solution (1 % Triton X-100, 500  $\mu\text{g/ml}$  propidium iodide, and 10  $\mu\text{g/ml}$  RNase A in PBS) and incubated for 30 min at room temperature. After that, cell cycle distribution was analyzed using a BD FACS Aria flow cytometer (BD Biosciences, USA).

**Chromosome spread analysis.** Chromosome preparations were obtained following standard protocols (Matveeva et al., 2017). Briefly, cells were exposed to a 0.1  $\mu\text{g/ml}$  colcemid (Merck, Germany) in growth medium for 3 h. After, cells were treated with 0.05 % Trypsin-EDTA solution (Capricorn Scientific GmbH, Germany), hypotonic solution (0.25 % KCl and 0.2 % sodium citrate) was added directly to the culture plates for 20 min at 37 °C. Then, cells were harvested, fixed with Carnoy fixative (3:1 methanol:glacial acetic acid) and dropped onto cold wet glass slides. Nuclear DNA was counterstained with 1  $\mu\text{g/ml}$  4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich, USA). Representative images were captured under a Carl Zeiss Axioscop 2 fluorescence microscope equipped with a CoolCube1 CCD-camera (Meta Systems, Altlußheim, Germany) at the Public Center for Microscopy SB RAS, Novosibirsk. The fraction of PLCs was determined after counting 130 to 230 nuclei in two replicas for each sample. The total length of all chromosomes in 15 metaphases for each sample was measured in arbitrary units (au) using ImageJ software.

**Statistical analysis.** Data analysis was performed using GraphPad Prism software package, employing two-sided Student's t test or Analysis of variance (ANOVA). Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

## Results

### Generation and chromosome analysis of $\Delta Mcp1$ cells

Following the protocol described by (Houlard et al., 2021), we generated mESCs with a deletion of exon 2 of the *Mcp1* gene, consequently producing a gene knockout. Based on PCR genotyping, we selected 3 clones (#23\_1, #70, #85) and confirmed the presence of the targeted deletion of exon 2 in

clones #70 and #85 (Fig. 2a, b) by Sanger sequencing. We were unable to obtain satisfactory Sanger sequence data for clone #23\_1 because of difficulties in resolving overlapping sequencing signal peaks of heterozygous deletions. However, this clone was included in further analysis. The absence of *Mcp1* was confirmed by Western blotting for all subjected clones (Fig. 2c). For CRISPR/Cas9 off-targets analysis, we utilized NGS data from three *Mcp1*-knockout cell lines obtained previously by our group (unpublished data). We found no detectable off-target editing at the predicted sites (Supplementary Material 2).

It is known that dysfunction of *Mcp1* is associated with an increased fraction of cells with prophase-like condensed (PLCs) chromosomes in interphase (Arroyo et al., 2017; Houlard et al., 2021) (Fig. 2d). For the mutant clones we calculated the proportion of PLCs, which amounted to over 20–30 %, significantly differing from that in the parental *Mcp1*<sup>+/+</sup> cell line (4 %) (Fig. 2e). Interestingly, this significant disruption of proper temporal activation of chromosome condensation does not affect the cell cycle progression. The proportion of cells in different stages of the cell cycle was similar in both parental *Mcp1*<sup>+/+</sup> and  $\Delta Mcp1$  cell lines, which is consistent with previous findings (Arroyo et al., 2017; Houlard et al., 2021) (Fig. 2f).

Additionally we measured the metaphase chromosome length from  $\Delta Mcp1$  cell lines and compared it to the parental line. Our analyses demonstrate that metaphase chromosomes in *Mcp1*-depleted cells are significantly shorter than the chromosomes of the parental line (Fig. 2g, h).

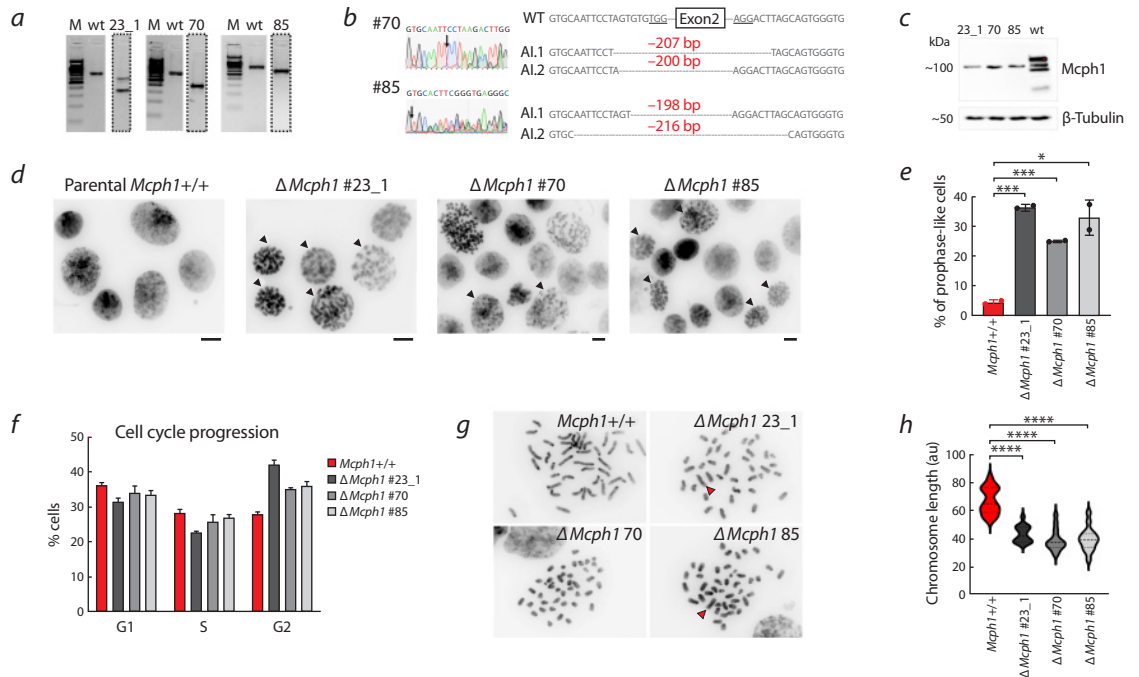
Moreover, we observed a significant increase in micronuclei in *Mcp1*-lacking cells (Supplementary Material 3). In two out of three  $\Delta Mcp1$  cell lines we detected the formation of a Robertsonian metacentric chromosome by the fusion of two acrocentric chromosomes (marked by the red arrowhead at Fig. 2g).

### Effects of *Mcp1* knockout on gene expression in mESCs

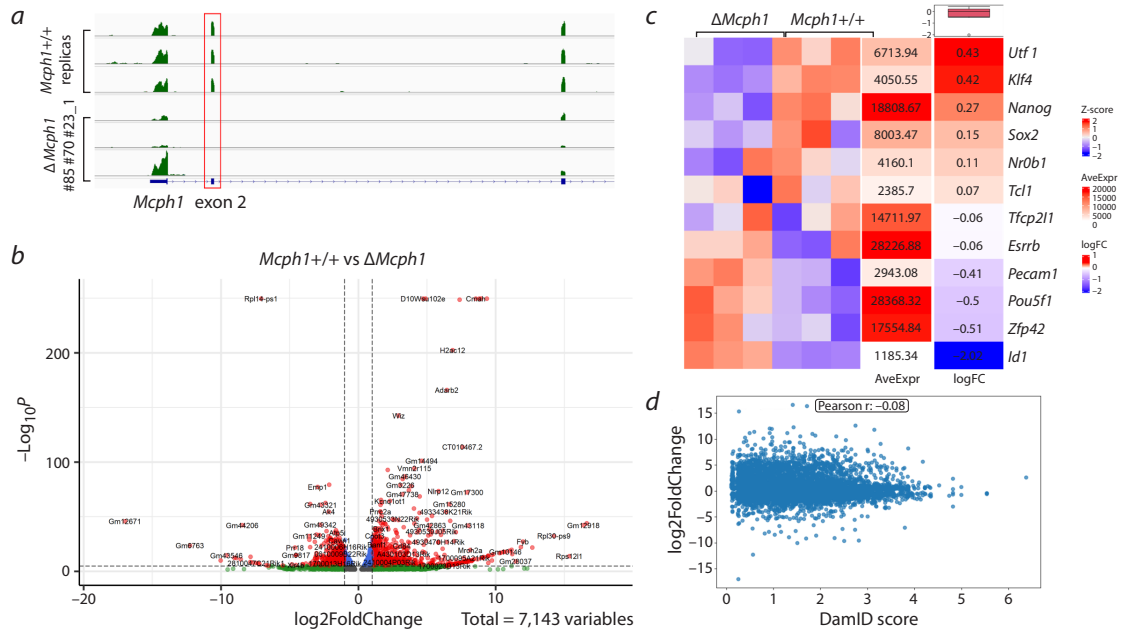
To determine if specific interphase chromatin features affect gene expression, we conducted a transcriptome analysis in the  $\Delta Mcp1$  cell lines and the control parental *Mcp1*<sup>+/+</sup> cell line. RNA-seq also confirmed the deletion of exon 2 of the *Mcp1* gene in all targeted cell lines (Fig. 3a). The absence of transcripts aligning to the second exon in  $\Delta Mcp1$  cell lines unequivocally indicates successful CRISPR/Cas9-mediated targeting. According to RNA-seq data, the expression level of *Mcp1* in knockout cell lines decreases threefold ( $p\text{-value} = 1.05\text{e-}15$ ) compared to the parental cell line, likely due to the activation of the nonsense-mediated RNA decay mechanism (Brognia, Wen, 2009).

To determine the changes in gene expression following *Mcp1* knockout, we analyzed RNA-seq data from three independently derived knockout cell lines and compared them with three replicates of the parental cell line. Genes with a base mean expression  $< 100$  were excluded from analysis. We found that 876 genes significantly changed their expression level (twofold or more) after *Mcp1* knockout (see Supplementary Material 1 for the whole list of differentially expressed genes (DEGs)). These DEGs are equally distributed between up- and downregulated genes' groups. Classification by Gene Onto-

<sup>1</sup> Supplementary Materials 1–3 are available at:  
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx18.xlsx>



**Fig. 2.** The deletion of *Mcp1* in mESCs induces chromosome condensation and metaphase chromosome shortening. *a*, Representative PCR genotyping of genome-edited mESCs clones (three potential clones are shown as an example). *b*, Genotyping of the potential clones by Sanger sequencing. *c*, Western blot analysis of parental *Mcp1*<sup>+/+</sup> and  $\Delta$ *Mcp1* cell lines. *d*, Representative images of prophase-like nuclei (arrowheads) observed in the  $\Delta$ *Mcp1* cell lines. The nuclei were visualized through DAPI staining. Scale bar: 10  $\mu$ m. *e*, Quantification of the percentage of prophase-like nuclei cells. Data represent the mean of two independent experiments  $\pm$ SD. A minimum of 134 cells was examined in each experiment. Two-sided Student's *t* test. *f*, Cell-cycle analysis through propidium iodide flow cytometry in parental *Mcp1*<sup>+/+</sup> and  $\Delta$ *Mcp1* cell lines. *g*, Representative images from a normal-sized metaphase and a metaphase with hypercondensed chromosomes in  $\Delta$ *Mcp1* cell lines. *h*, Mean length of all chromosomes in parental *Mcp1*<sup>+/+</sup> and  $\Delta$ *Mcp1* cell lines. The lengths were measured in arbitrary units (au); 15 metaphases were examined for each sample. One-way ANOVA followed by Dunnett's test.



**Fig. 3.** Effects of *Mcp1* depletion on gene expression in mESCs. *a*, RNA sequencing coverage across the first three exons of *Mcp1* in  $\Delta$ *Mcp1* cell lines. *b*, Volcano plot of the significant DEGs between parental cell lines and  $\Delta$ *Mcp1* cell lines. The x-axis represents the log<sub>2</sub> fold change and the y-axis represents  $-\log_{10}$  of each significant DEG. Red spots beyond the dashed lines are considered to be significantly expressed at  $p \leq 0.05$ . *c*, Heat map of pluripotency gene expression values for all the cell lines used. Each horizontal line represents a gene and each column represents a single sample. The color intensity reflects the level of gene expression (red for upregulation and blue for downregulation). *d*, The correlation between DEGs and LADs. For the gene sets with significantly altered gene expression after *Mcp1* knockout (log<sub>2</sub> fold change y-axis) DamID contact frequency scores are shown (x-axis).

Gene Ontology categories with FDR < 0.05 enriched after *Mcp1* knockout in mESCs

GO biological process complete	Over/under	Fold enrichment	Raw p-value	FDR
Sensory perception of smell (GO:0007608)	+	7.48	3.68E-08	4.95E-04
Sensory perception of chemical stimulus (GO:0007606)	+	6.75	4.04E-08	2.72E-04
Oxidative phosphorylation (GO:0006119)	+	3.39	5.83E-06	1.57E-02
Organic substance metabolic process (GO:0071704)	-	0.81	5.66E-06	1.90E-02
Primary metabolic process (GO:0044238)	-	0.80	6.55E-06	1.47E-02
Nitrogen compound metabolic process (GO:0006807)	-	0.79	8.59E-06	1.65E-02
Macromolecule metabolic process (GO:0043170)	-	0.76	2.14E-06	9.60E-03

logy (GO) terms revealed 5 significantly-affected categories (FDR  $p$ -value < 0.05) related to general metabolism and olfactory receptor activity (see the Table). Interestingly, terms of sensory perception were not attributed to *Mcp1* knockout before. While oxidative phosphorylation was highlighted as one of the most affected pathways in primary cultures of neural progenitors from *Mcp1* full-knockout mice (Journiac et al., 2020).

We did not observe an enrichment of regulated genes associated with cell cycle control – pathways in which *Mcp1* is known to be involved (Yang et al., 2008). In detail, there were no significant differences in the expression levels of *Chk1*, *Brcal*, *Topbp1*, *Ddb2*, *p73* and *Tert*, which were all reported to show reduced expression following *Mcp1* knockout (Yang et al., 2008). Contrary to previous reports, we observed a slight but significant upregulation of *Rad51* and *Apafl* expression level in  $\Delta$ *Mcp1* cell lines (log2FoldChange = -0.81, adjusted  $p$ -value =  $3.27 \times 10^{-9}$  for *Rad51*; log2FoldChange = -0.6, adjusted  $p$ -value =  $6.38 \times 10^{-5}$  for *Apafl*).

One of the hallmarks of embryonic stem cells is their ability to differentiate into almost any cell type. Thus, the high number of differentially expressed genes between parental *Mcp1*<sup>+/+</sup> and  $\Delta$ *Mcp1* cell lines might be a consequence of cell differentiation after *Mcp1* depletion. To test this hypothesis, we have further analyzed the expression levels of key pluripotency markers such as *Sox2*, *Pou5f1*, *Nanog*, *Klf4*, etc. We have not observed any significant or consistent decrease in expression of these genes thereby indicating that differentiation had not taken place (Fig. 3c). Thus, *Mcp1* is involved in the regulation of pluripotency in mESCs neither directly nor indirectly through influencing global chromatin organization.

The *Mcp1* depletion induces significant remodeling of nuclear chromatin due to chromosome condensation. It can be hypothesized that the formation of rod-shaped chromosomes during interphase may cause disruptions in chromatin association with the nuclear lamina. Thus, we decided to find a correlation between alterations in gene expression level and frequency of contact with the lamina. Lamina-associated domains (LADs) regions in mESCs were identified by DamID-seq of Lamin B1 (Borsos et al., 2019). We found no correlation between the DamID contact frequency scores and changes in gene expression in mutant *Mcp1* cells (Fig. 3d). These data suggest that *Mcp1*-mediated premature chromosome condensation during interphase is not the one that leads to changes in gene expression patterns of mESCs.

## Discussion

Microcephalin (*Mcp1*) is found in all metazoa. This multifaceted protein plays an important role in multiple fundamental cellular processes including DNA damage repair, cell-cycle progression and apoptosis, regulation of chromosome condensation and centrosome biogenesis. Loss-of-function mutations of *Mcp1* cause primary microcephaly, associated with severe reduction in brain volume and clinical decline in neurocognitive function (Jackson et al., 2002). Previous studies have shown that the expression level of *Mcp1* is decreased in many types of cancers including breast cancer, lung cancer, cervical cancer, etc. compared to normal tissue (Alsolami et al., 2023). Thus, *Mcp1* has attracted intense research interest due to its crucial role in neurogenesis and cancer suppression (Pulvers et al., 2015; Liu et al., 2016).

Numerous studies have implied that *Mcp1* plays an important role in chromosome maintenance (Arroyo et al., 2017; Cicconi et al., 2020). Tracking the dynamics of mitosis progression in *Mcp1*-depleted cells in real time revealed a range of anaphase defects and missegregated chromosomes that become encapsulated in micronuclei (Arroyo et al., 2017). *Mcp1* specifically interacts with TRF2 in the shelterin complex of telomeric DNA and promotes homology-directed repair of dysfunctional telomeres. Moreover, *Mcp1* supports telomere replication during the S-phase of the cell cycle by counteracting replication stress (Cicconi et al., 2020). In our study we also observed an elevated frequency of chromosomal abnormalities including micronuclei and Robertsonian translocations in the knockout  $\Delta$ *Mcp1* lines (Supplementary Material 3). According to the previously published data we also detected a significant reduction in chromosome length for all  $\Delta$ *Mcp1* cell lines (Gruber et al., 2011; Arroyo et al., 2017) (Fig. 2h). A similar phenomenon of hypercondensed metaphase chromosomes was also observed in cells continuously treated with nocodazole resulting in spindle destruction and significant prolonged mitosis (Naumova et al., 2013). Thus, increasing the duration of condensin loading to chromatin either by prolonged metaphase arrest after nocodazole treatment or chromosome condensation in interphase nuclei mediated by *Mcp1* knockout leads to the shortening of mitotic chromosomes.

Several studies reported the transcriptional activity of MCPH1 (Lin, Elledge, 2003; Yang et al., 2008; Shi et al., 2012). It was shown that in HEK293 cells MCPH1 acts as a coactivator by forming a complex with the transcription factor E2F1 and regulates a number of genes (such as *CHK1*



and *BRCA1*) involved in DNA repair, the cell cycle and apoptosis (Yang et al., 2008). Furthermore, *MCPH1* was first identified as an inhibitor of hTERT expression – that is why *MCPH1* is also called *BRIT1* (BRCT-repeat inhibitor of TERT expression) (Lin, Elledge, 2003). Later it was demonstrated that *MCPH1* directly binds to the hTERT proximal promoter leading to reduced hTERT expression and telomerase activity (Shi et al., 2012). Comparative gene expression profiling of neural progenitors in *McpH1* knockout and wild-type mice has revealed altered expression of genes controlling the cell cycle and genes related to metabolic pathways (Journiac et al., 2020). In our study we investigated the changes in the transcriptional profiles of mESCs after *McpH1* knockout. Among significantly upregulated and downregulated (876) DEGs, GO analysis revealed enrichment for general metabolism and sensory perception of smell. Although it is hard to draw direct connections to the known *McpH1* functions, these data show that mESCs may try to adapt their metabolism to chronic chromatin hypercondensation. Furthermore, contrary to the aforementioned studies, we found no significant differences in the expression levels for *Tert* or for genes implicated in the cell cycle pathway after *McpH1* knockout in mESCs. Thus, contribution of *McpH1* to the regulation of gene expression appears to be species- and tissue-specific. This is also supported by the fact that most of the human-specific amino acid substitutions in *MCPH1* resulted in changes in the regulatory effects on the downstream genes (Shi et al., 2013).

It is now established that spatial organization of chromatin in the nucleus is important for proper regulation of gene expression. *McpH1* knockout results in the loading of condensin II onto chromatin followed by chromosome condensation during interphase. It is possible to assume that at least a part of the expression changes after *McpH1* knockout could be explained by alterations in chromatin spatial organization. It was previously shown that condensin II depletion contributes to the folding of the human genome by shifting from chromosome territories to Rab1-like polarized organization with chromocenter formation (Hoencamp et al., 2021). Such drastic reorganization affects the expression of a small fraction of genes within LADs and near LAD borders (Hoencamp et al., 2021). Knockout of *McpH1* also leads to large-scale reorganization but in the opposite manner: interphase chromosomes are individualized into prophase-like rod-shaped chromatids, while chromocenters have disappeared. In our transcriptome analysis of mESCs with *McpH1* knockout, we found no correlation between changes in the expression level of genes and their proximity to lamina. Thus, loading of condensin II onto chromatin does not affect smaller-scale chromatin structures such as LADs and TADs (topology associated domains) contributing to the regulation of gene expression.

## Conclusion

In this work we have generated mESCs with a knockout of the *McpH1* gene. Our conclusion is that *McpH1* is likely not involved in the regulation of gene expression in mESCs by direct binding to target promoters or by modulation of spatial chromatin organization, while the DEGs observed may be the result of secondary effects due to persistent chromatin hypercondensation. These cell lines will be a valuable resource for

investigating *McpH1*-condensin II pathway in chromosome maintenance, and could also be used to study *McpH1* roles in DNA repair.

## References

- Abdennur N., Schwarzer W., Pekowska A., Shaltiel I.A., Huber W., Haering C.H., Mirny L., Spitz F. Condensin II inactivation in interphase does not affect chromatin folding or gene expression. *BioRxiv*. 2018;437459. DOI 10.1101/437459
- Alsolami M., Aboalola D., Malibari D., Alghamdi T., Alshekhi W., Jad H., Rumbold-Hall R., Altowairqi A.S., Bell S.M., Alsiary R.A. The emerging role of *MCPH1*/*BRIT1* in carcinogenesis. *Front. Oncol.* 2023;13:1047588. DOI 10.3389/fonc.2023.1047588
- Arroyo M., Kuriyama R., Trimborn M., Keifenheim D., Cañuelo A., Sánchez A., Clarke D.J., Marchal J.A. *MCPH1*, mutated in primary microcephaly, is required for efficient chromosome alignment during mitosis. *Sci. Rep.* 2017;7(1):13019. DOI 10.1038/s41598-017-12793-7
- Borsos M., Perricone S.M., Schauer T., Pontabry J., de Luca K.L., de Vries S.S., Ruiz-Morales E.R., Torres-Padilla M.-E., Kind J. Genome-lamina interactions are established de novo in the early mouse embryo. *Nature*. 2019;569(7758):729-733. DOI 10.1038/s41586-019-1233-0
- Brogna S., Wen J. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009;16(2):107-113. DOI 10.1038/nsm.1550
- Cicconi A., Rai R., Xiong X., Broton C., Al-Hiyasat A., Hu C., Dong S., Sun W., Garbarino J., Bindra R.S., Schildkraut C., Chen Y., Chang S. Microcephalin 1/*BRIT1*-TRF2 interaction promotes telomere replication and repair, linking telomere dysfunction to primary microcephaly. *Nat. Commun.* 2020;11(1):5861. DOI 10.1038/s41467-020-19674-0
- Dixon J.R., Selvaraj S., Yue F., Kim A., Li Y., Shen Y., Hu M., Liu J.S., Ren B. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*. 2012;485(7398):376-380. DOI 10.1038/nature11082
- Down J.M., Bilodeau S., Orlando D.A., Hübner M.R., Abraham B.J., Spector D.L., Young R.A. Multiple structural maintenance of chromosome complexes at transcriptional regulatory elements. *Stem Cell Reports*. 2013;1(5):371-378. DOI 10.1016/j.stemcr.2013.09.002
- Earnshaw W.C., Laemmli U.K. Architecture of metaphase chromosomes and chromosome scaffolds. *J. Cell Biol.* 1983;96(1):84-93. DOI 10.1083/jcb.96.1.84
- Gibcus J.H., Samejima K., Goloborodko A., Samejima I., Naumova N., Nuebler J., Kanemaki M.T., Xie L., Paulson J.R., Earnshaw W.C., Mirny L.A., Dekker J. A pathway for mitotic chromosome formation. *Science*. 2018;359(6376):eaao6135. DOI 10.1126/science.aao6135
- Gruber R., Zhou Z., Sukchev M., Joerss T., Frappart P.-O., Wang Z.-Q. *MCPH1* regulates the neuroprogenitor division mode by coupling the centrosomal cycle with mitotic entry through the Chk1–Cdc25 pathway. *Nat. Cell Biol.* 2011;13(11):1325-1334. DOI 10.1038/ncb2342
- Hirota T., Gerlich D., Koch B., Ellenberg J., Peters J.-M. Distinct functions of condensin I and II in mitotic chromosome assembly. *J. Cell Sci.* 2004;117(26):6435-6445. DOI 10.1242/jcs.01604
- Hoencamp C., Dudchenko O., Elbatsh A.M.O., Brahmachari S., Raaijmakers J.A., van Schaik T., Sedeño Cacciatore Á., Contessoto V.G., van Heesbeen R.G.H.P., van den Broek B., ... Medema R.H., van Steensel B., de Wit E., Onuchic J.N., Di Pierro M., Lieberman Aiden E., Rowland B.D. 3D genomics across the tree of life reveals condensin II as a determinant of architecture type. *Science*. 2021;372(6545):984-989. DOI 10.1126/science.abe2218
- Houlard M., Cutts E.E., Shamim M.S., Godwin J., Weisz D., Presser Aiden A., Lieberman Aiden E., Schermelleh L., Vannini A., Nasmyth K. *MCPH1* inhibits condensin II during interphase by regulating its SMC2-kleisin interface. *eLife*. 2021;10:e73348. DOI 10.7554/eLife.73348

- Jackson A.P., Eastwood H., Bell S.M., Adu J., Toomes C., Carr I.M., Roberts E., Hampshire D.J., Crow Y.J., Mighell A.J., Karbani G., Jafri H., Rashid Y., Mueller R.F., Markham A.F., Woods C.G. Identification of microcephalin, a protein implicated in determining the size of the human brain. *Am. J. Hum. Genet.* 2002;71(1):136-142. DOI 10.1086/341283
- Journiac N., Gilabert-Juan J., Cipriani S., Benit P., Liu X., Jacquier S., Faivre V., Delahaye-Duriez A., Csaba Z., Hourcade T., Melinte E., Lebon S., Violle-Poirsier C., Oury J.-F., Adle-Biassette H., Wang Z.-Q., Mani S., Rustin P., Gressens P., Nardelli J. Cell metabolic alterations due to *McpH1* mutation in microcephaly. *Cell Rep.* 2020;31(2):107506. DOI 10.1016/j.celrep.2020.03.070
- Kristofova M., Ori A., Wang Z.-Q. Multifaceted microcephaly-related gene MCPH1. *Cells.* 2022;11(2):275. DOI 10.3390/cells11020275
- Lin S.-Y., Elledge S.J. Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase. *Cell.* 2003;113(7):881-889. DOI 10.1016/S0092-8674(03)00430-6
- Liu X., Zhou Z.-W., Wang Z.-Q. The DNA damage response molecule MCPH1 in brain development and beyond. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2016;48(7):678-685. DOI 10.1093/abbs/gmw048
- Marchal C., Sima J., Gilbert D.M. Control of DNA replication timing in the 3D genome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019;20(12):721-737. DOI 10.1038/s41580-019-0162-y
- Matveeva N.M., Fishman V.S., Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Pristyazhnyuk I.E., Menzorov A.G., Serov O.L. Alternative dominance of the parental genomes in hybrid cells generated through the fusion of mouse embryonic stem cells with fibroblasts. *Sci. Rep.* 2017;7(1):18094. DOI 10.1038/s41598-017-18352-4
- Menzorov A.G., Orishchenko K.E., Fishman V.S., Shevtsova A.A., Mungalov R.V., Pristyazhnyuk I.E., Kizilova E.A., Matveeva N.M., Alenina N., Bader M., Rubtsov N.B., Serov O.L. Targeted genomic integration of EGFP under tubulin beta 3 class III promoter and mEos2 under tryptophan hydroxylase 2 promoter does not produce sufficient levels of reporter gene expression. *J. Cell. Biochem.* 2019;120(10):17208-17218. DOI 10.1002/jcb.28981
- Naumova N., Imakaev M., Fudenberg G., Zhan Y., Lajoie B.R., Mirny L.A., Dekker J. Organization of the mitotic chromosome. *Science.* 2013;342(6161):948-953. DOI 10.1126/science.1236083
- Neitzel H., Neumann L.M., Schindler D., Wirges A., Tönnies H., Trimborn M., Krebsova A., Richter R., Sperling K. Premature chromosome condensation in humans associated with microcephaly and mental retardation: a novel autosomal recessive condition. *Am. J. Hum. Genet.* 2002;70(4):1015-1022. DOI 10.1086/339518
- Ono T., Fang Y., Spector D.L., Hirano T. Spatial and temporal regulation of condensins I and II in mitotic chromosome assembly in human cells. *Mol. Biol. Cell.* 2004;15(7):3296-3308. DOI 10.1091/mbc.e04-03-0242
- Patro R., Duggal G., Love M.I., Irizarry R.A., Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat. Methods.* 2017;14(4):417-419. DOI 10.1038/nmeth.4197
- Pulvers J.N., Journiac N., Arai Y., Nardelli J. MCPH1: a window into brain development and evolution. *Front. Cell. Neurosci.* 2015;9:92. DOI 10.3389/fncel.2015.00092
- Rao S.S.P., Huntley M.H., Durand N.C., Stamenova E.K., Bochkov I.D., Robinson J.T., Sanborn A.L., Machol I., Omer A.D., Lander E.S., Aiden E.L. A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell.* 2014;159(7):1665-1680. DOI 10.1016/j.cell.2014.11.021
- Sanders J.T., Freeman T.F., Xu Y., Gollosi R., Stallard M.A., Hill A.M., San Martin R., Balajee A.S., McCord R.P. Radiation-induced DNA damage and repair effects on 3D genome organization. *Nat. Commun.* 2020;11(1):6178. DOI 10.1038/s41467-020-20047-w
- Shi L., Li M., Su B. MCPH1/BRIT1 represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Gene.* 2012;495(1):1-9. DOI 10.1016/j.gene.2011.12.053
- Shi L., Li M., Lin Q., Qi X., Su B. Functional divergence of the brain-size regulating gene *MCPH1* during primate evolution and the origin of humans. *BMC Biol.* 2013;11(1):62. DOI 10.1186/1741-7007-11-62
- Stadhouders R., Filion G.J., Graf T. Transcription factors and 3D genome conformation in cell-fate decisions. *Nature.* 2019;569(7756):345-354. DOI 10.1038/s41586-019-1182-7
- Trimborn M., Schindler D., Neitzel H.H.T. Misregulated chromosome condensation in MCPH1 primary microcephaly is mediated by condensin II. *Cell Cycle.* 2006;5(3):322-326. DOI 10.4161/cc.5.3.2412
- Wallace H.A., Bosco G. Condensins and 3D organization of the interphase nucleus. *Curr. Genet. Med. Rep.* 2013;1(4):219-229. DOI 10.1007/s40142-013-0024-4
- Yamashita D., Shintomi K., Ono T., Gavvovidis I., Schindler D., Neitzel H., Trimborn M., Hirano T. MCPH1 regulates chromosome condensation and shaping as a composite modulator of condensin II. *J. Cell Biol.* 2011;194(6):841-854. DOI 10.1083/jcb.201106141
- Yang S., Lin F., Lin W. MCPH1/BRIT1 cooperates with E2F1 in the activation of checkpoint, DNA repair and apoptosis. *EMBO Rep.* 2008;9(9):907-915. DOI 10.1038/embor.2008.128
- Yuen K.C., Slaughter B.D., Gerton J.L. Condensin II is anchored by TFIIIC and H3K4me3 in the mammalian genome and supports the expression of active dense gene clusters. *Sci. Adv.* 2017;3(6):e1700191. DOI 10.1126/sciadv.1700191
- Yunusova A., Smirnov A., Shnaider T., Lukyanchikova V., Afonnikova S., Battulin N. Evaluation of the OsTIR1 and AtAFB2 AID systems for genome architectural protein degradation in mammalian cells. *Front. Mol. Biosci.* 2021;8:757394. DOI 10.3389/fmolb.2021.757394

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received February 29, 2024. Revised April 23, 2024. Accepted April 24, 2024.


DOI 10.18699/vjgb-24-56

## Сравнительное изучение прорастания семян пшеницы, различающихся антоциановой окраской перикарпа, в условиях естественного и индуцированного старения

Е.И. Гордеева  , О.Ю. Шоева <sup>1</sup>, Е.К. Хлесткина <sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Федеральное исследовательское учреждение Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

 elgordeeva@bionet.nsc.ru

**Аннотация.** Одним из перспективных направлений селекции пшеницы является получение сортов с повышенным содержанием антоцианов в зерновке для производства функциональных продуктов питания. Однако вопрос о том, как эти соединения влияют на жизнеспособность семян после длительного хранения, оставался неизученным. Сравнительное исследование жизнеспособности семян было проведено с использованием набора почти изогенных линий пшеницы сорта Саратовская 29. Эти сестринские линии имеют различные сочетания рекомбинантных участков ДНК в хромосомах 2A и 7D с доминантными и рецессивными аллелями генов *Pp3* и *Pp-D1* (*Pp*, *Purple pericarp*), контролирующими антоциановую окраску coleoptiles и околоплодника. Семена проращивали в чашках Петри на увлажненной фильтровальной бумаге в климатической камере при постоянной температуре 20 °C с 12-часовым циклом дневного освещения. При длительном естественном хранении семян до 9 лет в сухом проветриваемом помещении в крафт-пакетах при температуре 20 ± 2 °C у испытанных образцов пшеницы происходила потеря всхожести до 50 %. При этом положительного влияния наличия антоцианов в зерне на сохранение всхожести не выявлено. Однако антоцианы способствовали сохранению жизнеспособности зерен в неблагоприятных кратковременных условиях повышения температуры до 48 °C и 100 % влажности. Тест на индуцированное старение не позволил предсказать ухудшение прорастания после длительного хранения семян. Результаты исследования показали нейтральную роль антоцианов в сохранении прорастания семян в течение 6–9 лет в естественных условиях хранения при 20 ± 2 °C. Небольшое статистически достоверное повышение всхожести зерен при естественном старении было связано с наличием рекомбинантного участка в хромосоме 7D пшеницы, содержащего ген *Pp-D1*.

**Ключевые слова:** пшеница; антоцианы; естественное старение; жизнеспособность семян.

**Для цитирования:** Гордеева Е.И., Шоева О.Ю., Хлесткина Е.К. Сравнительное изучение прорастания семян пшеницы, различающихся антоциановой окраской перикарпа, в условиях естественного и индуцированного старения. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(5):495-505. DOI 10.18699/vjgb-24-56

**Финансирование.** Работа поддержана грантом РНФ 21-76-10024.


**Благодарности.** Авторы выражают благодарность Елене Валерьевне Антоновой (ИЭРиЖ УрО РАН, Екатеринбург) за помощь в регрессионном анализе, Галине Владимировне Генераловой (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск) и Ольге Викторовне Захаровой (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск) за техническую поддержку.

## A comparative study on germination of wheat grains with different anthocyanin pigmentation of the pericarp in natural or induced aging

E.I. Gordeeva  , O.Y. Shoeva <sup>1</sup>, E.K. Khlestkina <sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

 elgordeeva@bionet.nsc.ru

**Abstract.** One of promising areas of wheat breeding is the creation of varieties with a high concentration of anthocyanins in the grain for the production of functional food products. Nonetheless, the question of how these compounds affect seed viability after long-term storage has remained unexplored. A comparative study on seed viability was conducted using a set of near-isogenic lines on the background of spring wheat variety *Saratovskaya 29*. These sister lines carry different combinations of recombinant DNA regions (on chromosomes 2A and 7D) containing dominant and recessive alleles at loci *Pp3* and *Pp-D1* (*Pp*: *Purple pericarp*), which determine the anthocyanin color of coleoptiles and of the pericarp. Seeds were germinated on two layers of water-moistened filter paper in a climatic chamber at a constant temperature of 20 °C on a 12-hour daylight cycle. During long-term natural storage of the seeds for up to



9 years in a dry ventilated room in Kraft bags at  $20 \pm 2$  °C, the tested wheat samples experienced a loss of seed germination capacity of ~50 %; anthocyanins were found to not participate in the preservation of germination capacity. Nonetheless, anthocyanins contributed to the preservation of seed viability under unfavorable short-term conditions of a temperature rise to 48 °C at 100 % humidity. The accelerated aging test did not predict poor germination capacity after long-term seed storage. The results showed a neutral role of anthocyanins in the maintenance of seed germination capacity for 6–9 years under natural storage conditions at  $20 \pm 2$  °C. A small statistically significant increase in grain germination capacity during natural aging was associated with the presence of a recombinant region containing the *Pp-D1* gene on wheat chromosome 7D.

**Key words:** wheat; anthocyanin; natural aging; seed germination.

**For citation:** Gordeeva E.I., Shoeva O.Y., Khlestkina E.K. A comparative study on germination of wheat grains with different anthocyanin pigmentation of the pericarp in natural or induced aging. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(5):495-505. DOI 10.18699/vjgb-24-56

## Введение

Мягкая пшеница – одна из важнейших зерновых культур, обеспечивающих продовольственную безопасность страны. В настоящее время растет интерес к выращиванию пшеницы с высоким содержанием антоцианов в оболочках зерна не только как ресурса стрессоустойчивости и адаптивности растений (Kaur et al., 2023), но и как источника полезного для здоровья человека функционального питания и возможного терапевтического средства (Юдина и др., 2021; Liu et al., 2021; Loskutov, Khlestkina, 2021; Garg et al., 2022).

Антоцианы – растительные пигменты, относящиеся к классу флавоноидных соединений (Patra et al., 2022). Они принимают участие в защите растений от избыточного ультрафиолетового излучения, от патогенов, играют роль аттрактантов в привлечении насекомых и животных для опыления цветков и распространения семян (Corso et al., 2020). Являясь биологически активными вторичными метаболитами, антоцианы обладают антиоксидантными свойствами и способны нейтрализовать повреждающие клетки активные формы кислорода (АФК), которые накапливаются во время нормального метаболизма или стресса (Shen et al., 2022). Несмотря на выведение селекционерами сортов пшеницы, накапливающих антоциановые пигменты в зерновках, остается неизученной связь между биосинтезом этих соединений и их защитно-приспособительными экологическими функциями, механизмами поддержания жизнеспособности семян, т.е. способностью давать нормальные проростки при благоприятных условиях после длительного хранения.

Пшеница, как и большинство покрытосеменных растений, распространенных в регионах с умеренным климатом со значительными сезонными колебаниями температуры, имеет ортодоксальные, толерантные к высушиванию, созревшие семена. Содержание влаги в них опускается ниже 10 %, что снижает клеточную активность (подвижность молекул) внутри семян до минимального уровня и позволяет поддерживать жизнеспособные покоящиеся зародыши в состоянии анабиоза в течение длительного периода времени (Гурьева и др., 2021). Такое состояние минимальной клеточной активности представляет собой весьма успешную стратегию выживания растений в неблагоприятных условиях окружающей среды, тем самым продлевая их долголетие.

Долговечность семян – полигенный признак, регулируемый сложным взаимодействием изменяющихся фак-

торов окружающей среды (таких как температура, относительная влажность, парциальное давление кислорода) с эндогенными, генетически контролируемыми факторами растений. К последним относятся структура семенной оболочки, концентрация АФК, целостность фосфолипидных оболочек, белков, нуклеиновых кислот и связанных с ними систем репарации, энергетических запасов сахаров в эндосперме, баланс фитогормонов покоя и прорастания семян (Zhou W. et al., 2020).

Молекулярные механизмы, лежащие в основе процессов жизнеспособности и долговечности семян, интенсивно изучаются в настоящее время (Li et al., 2022; Stegner et al., 2022). Известно, что стадию покоя семян контролирует фитогормон абсцизовая кислота и, напротив, в прорастании семян участвуют фитогормоны гиббереллины, антагонисты абсцизовой кислоты (Longo et al., 2020). Растительные гормоны вместе с АФК, такими как супероксид-анион, перекись водорода, гидроксильные и пероксильные радикалы, являются частью регуляторной сигнальной системы восприятия и адаптации к стрессу метаболизма растений, участвуют в контроле процессов роста и развития, а также в защите от патогенов (Kurek et al., 2019; Considine, Foyer, 2021). Например, перекись водорода вызывает катаболизм абсцизовой кислоты и стимулирует биосинтез гиббереллинов, тем самым способствуя выходу из состояния покоя и запуская процесс прорастания семян (Chen et al., 2018). Регуляция накопления АФК должна находиться под строгим контролем антиоксидантов. При нарушении баланса между про- и антиоксидантными процессами запускается окислительный стресс, вызывающий модификации белков, перекисное окисление липидов, повреждение мембран с повышенной утечкой электролитов и деградацией митохондрий, повреждение ДНК и РНК, что ведет к гибели клеток и в конечном итоге к потере жизнеспособности семян (Kurek et al., 2019; Li et al., 2022).

Для поддержания гомеостаза и подавления избыточного уровня АФК растения активируют внутренние системы защиты, включающие ферментативные и неферментативные антиоксиданты (Kumar et al., 2020). К ферментативным антиоксидантам относятся супероксиддисмутаза, каталаза, ферменты глутатион-аскорбатного цикла, активность которых резко снижается в сухих семенах из-за вязкости цитоплазмы. Неферментативная антиоксидантная система представлена молекулами аскорбиновой кислоты, глутатионом, липофильными токоферолами (витамин Е),



каротиноидами и большой группой фенольных соединений (Dogra, Kim, 2020; Kumar et al., 2020; Dumanović et al., 2021).

Жизнеспособность семян тесно связана с морфологическим строением семенной оболочки и концентрацией в ней фенольных соединений (Sano et al., 2016). Семенная оболочка играет роль физического барьера от внешних неблагоприятных воздействий, ограничивая поглощение воды, поражение грибами и микробами (Rathod et al., 2017; Zhou W. et al., 2020). У мутантных растений *Arabidopsis thaliana* дефекты флавоноидной пигментации снижали проницаемость семенной оболочки и, как следствие, влияли на сохранность семян (Sano et al., 2016). Так, при изучении мутантов *tt2*, *tt10* и *tt12* была выявлена связь между снижением концентрации пигментированных полимерных флавоноидов проантоцианидинов, находящихся в эндотелии семенной оболочки и в клетках халазы, и укорочением продолжительности жизни семян (Debeaujon et al., 2001). Мутанты *tt10* демонстрировали фенотип замедленного побурения семенной оболочки, связанного с образованием конденсированных танинов под действием продукта гена *TRANSPARENT TESTA 10 (TT10)*, кодирующего лакказоподобную 15-флавоноидоксидазу (*AtLAC15*), и сопутствующее снижение покоя и продолжительности жизни семян (Pourcel et al., 2007).

Синтез флавонолов и проантоцианидинов, являющихся предшественниками высокополимеризованных нерастворимых пигментов, в семенной оболочке зерновок краснозерной пшеницы влияет на усиление покоя и устойчивости к прорастанию перед сбором урожая в сравнении с белозерными формами (Kohyama et al., 2017; Mares, Nimi, 2021). Полифенолы имеют положительную связь с контролем покоя семян благодаря их влиянию на транскрипцию генов, связанных с выработкой фитогормонов абсцизовой, салициловой и жасмоновой кислот, гиббереллинов и полиэтилена, а также удалением АФК (Shah et al., 2018; Zhou G. et al., 2023). Было показано, что водорастворимые фенольные соединения в оболочке зерновок пшеницы действуют как эндогенные ингибиторы

на процессы прорастания, частично подавляя активацию пероксидазы (Kong et al., 2008).

При повышении температуры хранения и высокой влажности процессы окисления жиров, белков и нарушения целостности нуклеиновых кислот ускоряются, а долговечность семян заметно снижается (Zhou W. et al., 2020). Таким образом, можно имитировать естественное старение семян. Это явление было использовано для разработки метода «ускоренного индуцированного старения» (accelerated ageing test, АА-тест) (Rehman Arif et al., 2012; Hay et al., 2019). Тесты на энергию прорастания и жизнеспособность семян были проверены и включены в Правила тестирования семян Международной ассоциации тестирования семян (ISTA) (International Rules..., 2004).

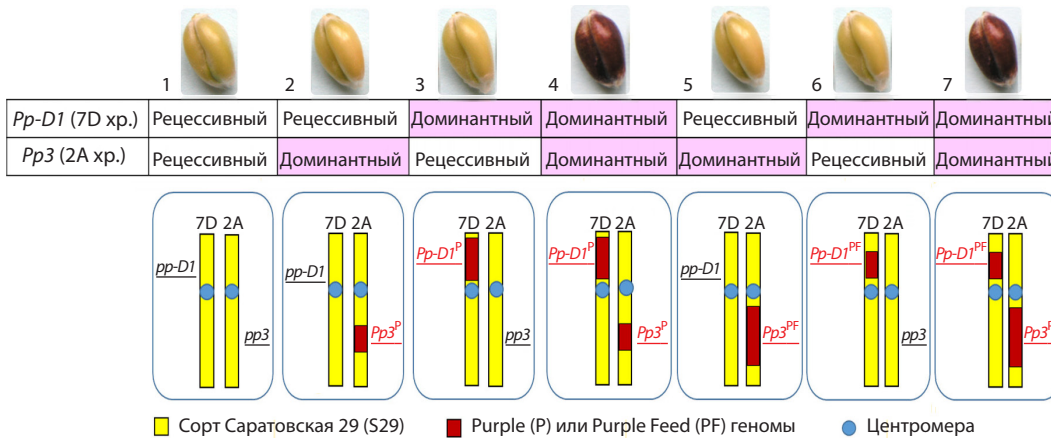
Цель представленной работы – сравнительное исследование жизнеспособности семян почти изогенных линий пшеницы, отличающихся наличием рекомбинантных участков в хромосомах 2А и 7D, которые несут гены *Pp* (*Purple pericarp*), регулирующие биосинтез антоцианов в перикарпе зерновки, после естественного длительного хранения и искусственно индуцированного старения семян. Это позволит ответить на вопрос, влияет ли накопление в перикарпе зерновок пшеницы антоцианов, обладающих антиоксидантными свойствами, на долговечность семян.

## Материалы и методы

**Растительный материал.** Всхожесть семян оценивали у семи сестринских почти изогенных линий пшеницы (near isogenic lines, NIL), созданных на основе ярового сорта мягкой пшеницы Саратовская 29 (C29/S29) путем скрещиваний с донорами доминантных аллелей генов *Pp*, сортами Purple (P) и Purple Feed (PF), и отбором фиолетовозерных гибридных растений в поколении BC<sub>8-9</sub>F<sub>2</sub> (Arbuzova et al., 1998; Gordeeva et al., 2015). Данные линии характеризуются наличием в хромосомах 2А и 7D рекомбинантных участков ДНК, унаследованных от линий доноров, содержащих гены *Pp3* и *Pp-D1* (Tereshchenko et al., 2012; Gordeeva et al., 2015). Краткое описание линий приведено в табл. 1 и на рис. 1.

**Таблица 1.** Образцы пшеницы, используемые в данной работе

Номер сорта/линии	Сорт/линия (полное название)	Сокращенное название	Краткое описание
1	Саратовская 29/ cv. Saratovskaya 29 <i>S29pp3pp-D1</i>	C29/S29	Краснозерный яровой сорт
2	<i>i:S29Pp3<sup>P</sup>pp-D1</i>	C29Pp3 <sup>P</sup>	Краснозерная изогенная линия C29 с рекомбинантным участком в хромосоме 2А, несущим доминантный аллель гена <i>Pp3</i> от сорта Purple
3	<i>i:S29pp3Pp-D1<sup>P</sup></i>	C29Pp-D1 <sup>P</sup>	Краснозерная изогенная линия C29 с рекомбинантным участком в хромосоме 7D, несущим доминантный аллель гена <i>Pp-D1</i> от сорта Purple
4	<i>i:S29Pp3<sup>P</sup>Pp-D1<sup>P</sup></i>	C29Pp3Pp-D1 <sup>P</sup>	Фиолетовозерная изогенная линия C29 с двумя рекомбинантными участками в хромосомах 2А и 7D, несущими доминантные аллели генов <i>Pp3</i> и <i>Pp-D1</i> от сорта Purple
5	<i>i:S29Pp3<sup>PF</sup>pp-D1</i>	C29Pp3 <sup>PF</sup>	Краснозерная изогенная линия C29 с рекомбинантным участком в хромосоме 2А, несущим доминантный аллель гена <i>Pp3</i> от сорта Purple Feed
6	<i>i:S29pp3Pp-D1<sup>PF</sup></i>	C29Pp-D1 <sup>PF</sup>	Краснозерная изогенная линия C29 с рекомбинантным участком в хромосоме 7D, несущим доминантный аллель гена <i>Pp-D1</i> от сорта Purple Feed
7	<i>i:S29Pp3<sup>PF</sup>Pp-D1<sup>PF</sup></i>	C29Pp3Pp-D1 <sup>PF</sup>	Фиолетовозерная изогенная линия C29 с двумя рекомбинантными участками в хромосомах 2А и 7D, несущими доминантные аллели генов <i>Pp</i> от сорта Purple Feed



**Рис. 1.** Зерна и схематическое изображение хромосом 2А и 7D, несущих рекомбинантные участки, содержащие регуляторные гены биосинтеза антоцианов, у сестринских линий пшеницы, используемых в тестах естественного старения.

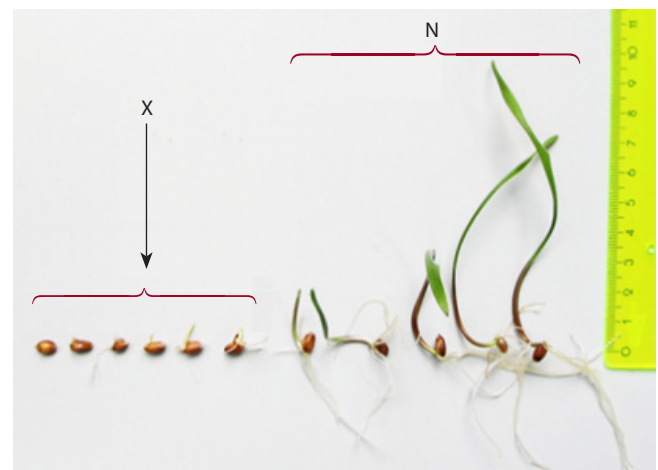
При подборе условий ускоренного индуцированного старения (АА-тест) использовались семена краснозерного озимого сорта Мироновская 808, белозерного ярового сорта Новосибирская 67 и краснозерных яровых сортов Саратовская 29 и Chinese Spring из коллекции ГенАгро (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск).

**Метод ускоренного старения семян.** Для индуцированного старения семян был применен АА-тест, разработанный международной организацией по тестированию семян ISTA, с модификациями. Семена сортов Мироновская 808, Новосибирская 67, Саратовская 29, Chinese Spring, выращенные при одинаковых условиях одной вегетации в гидропонной теплице, использовались для подбора температурных условий АА-теста.

Пятьдесят семян каждого генотипа в трех повторностях было помещено на нержавеющие металлические сетки, расположенные над дистиллированной водой в закрытых водонепроницаемой пленкой пластиковых стаканах. Стаканы выдержали при температуре 42, 44, 46 и 48 °С либо при 20 °С (контроль) и влажности 100 % в течение 72 ч в климатической камере Rubarth Apparate (RUMED GmbH, Германия). Затем семена переносили в квадратные чашки Петри размером 24×24 см на двухслойную влажную фильтровальную бумагу и помещали в климатическую камеру при 20 °С с 12-часовым режимом освещения для прорастания. Энергию прорастания семян (в процентах) определяли как отношение количества семян, проросших за 72 ч (на третий день), к общему количеству анализируемых семян в трех повторях. Жизнеспособность семян (в процентах) определяли как количество проросших семян через семь дней к общему числу анализируемых семян в трех повторях. Учитывались только здоровые и зеленые саженцы с нормальной корневой системой, без аномалий (ГОСТ 12038-84) (рис. 2).

Индекс прорастания (жизнеспособности) после искусственного старения рассчитывали по формуле:

$$\text{Индекс прорастания, \%} = \frac{\text{Кол-во жизнеспособных зерен после обработки } 48\text{ }^{\circ}\text{C}}{\text{Кол-во жизнеспособных зерен в контроле при } 20\text{ }^{\circ}\text{C}} \times 100\text{ \%}$$



**Рис. 2.** Характеристики проростков после стандартного теста на всхожесть.

X – аномальное прорастание, N – нормальная всхожесть.

По результатам оценки была выбрана температура для проведения АА-теста на изучаемых почти изогенных линиях сорта Саратовская 29. Семена этих линий были собраны в 2012 г. после весенней вегетации в теплице либо на экспериментальном участке селекционно-генетического комплекса ИЦиГ СО РАН. До начала эксперимента семена хранились два месяца в крафт-пакетах при температуре 20±2 °С. АА-тест проводили аналогично эксперименту по подбору условий, за исключением того, что вместо пятидесяти брали сто семян каждого генотипа. Достоверность различий между родительским сортом С29 и сестринскими почти изогенными линиями проверяли, используя три биологических повтора и критерий Манна–Уитни (U-тест). При  $p < 0.05$  различия считали достоверными.

**Естественное старение зерен.** Для тестирования всхожести в условиях естественного старения семена изучаемых линий собирали с растений, выращиваемых в теплице ИЦиГ СО РАН с 2014 по 2017 г. и в 2021 г. (для контроля).

Семена хранили в пакетах из крафт-бумаги при температуре  $20 \pm 2$  °С. Всхожесть тестировали в 2023 г., после 6–9 лет хранения. В качестве контроля использовали семена после двухлетнего хранения.

Сто семян каждой почти изогенной линии в трех повторностях проращивали в квадратных чашках Петри размером  $24 \times 24$  см на двух слоях увлажненной фильтровальной бумаги. Чашки Петри помещали в климатическую камеру Rubarth Apparate, выдерживали 24 ч при температуре 4 °С в темноте для синхронизации прорастания, а затем проращивали при постоянной температуре 20 °С с 12-часовым циклом дневного и ночного освещения. Энергию прорастания и жизнеспособность семян оценивали соответственно через три и семь дней после начала прорастания. Энергию прорастания семян (в процентах) вычисляли как отношение количества семян, проросших за 72 ч (на третий день), к общему количеству анализируемых семян в трех повторях. Жизнеспособность семян (в процентах) определяли как количество проросших семян через семь дней к общему числу анализируемых семян в трех повторях. Достоверность различий между родительским сортом Саратовская 29 и сестринскими почти изогенными линиями проверяли, используя три биологических повтора и критерий Манна–Уитни (U-тест). При  $p < 0.05$  различия считали достоверными.

## Результаты

### Прорастание семян после индуцированного старения

Для подбора условий АА-теста была протестирована всхожесть у четырех сортов мягкой пшеницы после температурной обработки семян при 42, 44, 46 и 48 °С и

повышенной влажности воздуха в течение 72 ч (табл. 2). Сорта Саратовская 29 и Chinese Spring сохраняли всхожесть 100 % при повышении температуры вплоть до 46 °С, тогда как всхожесть сортов Мироновская 808 и Новосибирская 69 при этой же температуре снижалась до 78 и 96 % соответственно. При дальнейшем повышении температуры на два градуса у всех сортов отмечено снижение всхожести. Так, всхожесть зерновок краснозерного озимого сорта Мироновская 808 составила 52 %, белозерного ярового сорта Новосибирская 67 – 64 %. У яровых краснозерных сортов Саратовская 29 и Chinese Spring после такой температурной обработки всхожесть составила 87 и 86 % соответственно. Поскольку именно после температурной обработки при 48 °С все сорта продемонстрировали снижение всхожести и различия по этому параметру, дальнейшее сравнительное исследование всхожести в АА-тесте у почти изогенных линий, различающихся наличием антоциановой пигментации зерна, проводили при данной температуре.

Результаты АА-теста сорта Саратовская 29 и двух почти изогенных линий с антоциановыми пигментами в перикарпе *C29Pp3Pp-D1<sup>P</sup>* и *C29Pp3Pp-D1<sup>PF</sup>* представлены в табл. 3. После искусственного старения всхожесть зерновок сорта Саратовская 29 упала на 19 %, тогда как у фиолетовозерных линий данный показатель снизился на 4 %. Индексы прорастания зерна почти изогенных линий пшеницы были в 1.2 раза выше, чем индекс прорастания неокрашенных антоцианами семян сорта Саратовская 29.

Одновременно была протестирована всхожесть зерен, собранных с растений изучаемых линий пшеницы, выращенных в поле. После АА-теста жизнеспособность полевых зерновок была ниже в два раза по сравнению с се-

**Таблица 2.** Число жизнеспособных зерен пшеницы, хранившихся 2 года при  $20 \pm 2$  °С, после искусственного старения

Сорт	Тип вегетации	Всхожесть 3×50 семян через 7 дней, %				
		Контроль 20 °С	После температурной обработки и 100 % влажности в течение 72 ч			
			42 °С	44 °С	46 °С	48 °С
Саратовская 29 (C29)	Яровая краснозерная	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0 <sup>b</sup>	87 ± 1 <sup>b</sup>
Новосибирская 67	Яровая белозерная	100 ± 0	99 ± 1	99 ± 1	96 ± 4 <sup>b</sup>	64 ± 2 <sup>a</sup>
Chinese Spring	Яровая краснозерная	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0 <sup>b</sup>	86 ± 2 <sup>b</sup>
Мироновская 808	Озимая краснозерная	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	78 ± 7 <sup>a</sup>	52 ± 13 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup> Разными буквами отмечены статистически значимые различия между линиями при  $p < 0.05$  (U-тест).

**Таблица 3.** Энергия прорастания через 3 дня (72 ч) и всхожесть зерновок пшеницы через 7 дней после искусственного старения

Номер	Сорта и линии	Температура обработки, °С	Энергия прорастания (%) через 3 дня	Всхожесть (%) через 7 дней	Индекс прорастания, %*
1	C29/S29	20	94 ± 6	100 ± 0	
		48	41 ± 9 <sup>a</sup>	81 ± 8 <sup>a</sup>	80.7
4	<i>C29Pp3Pp-D1<sup>P</sup></i>	20	100 ± 0	99 ± 1	
		48	69 ± 5 <sup>b</sup>	96 ± 3 <sup>b</sup>	97.6
7	<i>C29Pp3Pp-D1<sup>PF</sup></i>	20	96 ± 1	98 ± 1	
		48	70 ± 13 <sup>b</sup>	96 ± 2 <sup>b</sup>	98.3

\* Процентное содержание жизнеспособных семян после 48 °С в сравнении с контрольными при 20 °С.

<sup>a, b</sup> Разными буквами отмечены статистически значимые различия между линиями при  $p < 0.05$  (U-тест).

менами тепличной вегетации. Так, энергия прорастания семян сорта Саратовская 29 составила всего около 20 %, а количество жизнеспособных семян – 35 %, тогда как у зерен линии *C29Pp3Pp-D1<sup>P</sup>* с антоциановым перикарпом – 36 и 42 % соответственно. Таким образом, несмотря на порчу семян почвенными микроорганизмами, полученные результаты свидетельствуют об устойчивости пигментированных антоцианами зерновок мягкой пшеницы к повышенной температуре и высокой влажности воздуха.

#### Прорастание семян после длительного естественного хранения

Все испытанные образцы пшеницы дружно проросли после двух лет хранения при  $20 \pm 2$  °C в благоприятных условиях в сухом проветриваемом помещении. Всхожесть семян составила 100 % (табл. 4 и 5).

Энергия прорастания семян снизилась до 30–39 % через 6 лет и до 21–28 % после 9 лет длительного естественного хранения (см. табл. 4). При сравнении энергии прорастания почти изогенных линий с родительским сортом Саратовская 29 семена линии *C29Pp3Pp<sup>PF</sup>* (№ 5) с рекомбинантным участком ДНК в хромосоме 2A от сорта Purple Feed показали достоверное снижение по данному показателю через 6 лет, 7 лет и 8 лет и 10 мес. хранения (см. табл. 4). У семян линии *C29Pp-D1<sup>P</sup>* (№ 3), несущих рекомбинантный фрагмент ДНК от сорта Purple в хромосоме 7D, энергия прорастания была достоверно самой высокой через 7 лет хранения. Через 8 лет и 10 мес. энергия прораста-

ния семян линии *C29Pp-D1<sup>PF</sup>* (№ 6) с рекомбинантным фрагментом в хромосоме 7D достоверно превышала энергию прорастания семян сорта Саратовская 29. Через 9 лет и 2 мес. достоверных отличий между линиями по энергии прорастания зерен обнаружено не было.

Самое низкое значение всхожести через 7 дней после посева зерновок пшеницы, хранившихся 8 лет и 10 мес., обнаружено у линии *C29Pp3Pp<sup>PF</sup>* (№ 5), а у хранившихся 9 лет и 2 мес. – у линии *C29Pp3P<sup>P</sup>* (№ 2) с рекомбинантными участками ДНК в хромосомах 2A от сортов Purple Feed и Purple соответственно (см. табл. 5).

Всхожесть фиолетовых зерновок линий *C29Pp3Pp-D1<sup>P</sup>* (№ 4) и *C29Pp3Pp-D1<sup>PF</sup>* (№ 7), несущих рекомбинантные фрагменты от сортов Purple и Purple Feed одновременно в хромосомах 2A и 7D, была достоверно снижена через 8 лет и 10 мес. хранения (45 и 44 % против 52 % у сорта Саратовская 29). И далее, спустя четыре месяца, после 9 лет и 2 мес. хранения, жизнеспособность семян уменьшилась и достоверно не отличалась от сорта Саратовская 29 (см. табл. 5).

Линия *C29Pp-D1<sup>P</sup>* (№ 3) с рекомбинантным фрагментом только в хромосоме 7D от сорта Purple имела самую высокую всхожесть через 7 дней после посева зерновок, хранившихся 6 и 7 лет при температуре  $20 \pm 2$  °C, сравнимую с контрольными зёрнами, хранившимися 2 года (всхожесть 95–100 %). Через 8 лет и 10 мес. хранения жизнеспособность зерновок линии *C29Pp-D1<sup>P</sup>* (№ 3) и линии *C29Pp-D1<sup>PF</sup>* (№ 6) с рекомбинантными фрагментами ДНК

**Таблица 4.** Энергия прорастания (%) зерновок пшеницы, хранившихся в течение 2 и 6–9 лет при  $20 \pm 2$  °C, через 3 дня после посева

Номер	Линия	2 года	6 лет	7 лет	8 лет	8 лет 10 мес.	9 лет 2 мес.
1	<i>C29/S29</i>	100 ± 1	39 ± 3	40 ± 2	25 ± 4	28 ± 5	28 ± 7
2	<i>C29Pp3<sup>P</sup></i>	100 ± 0	37 ± 1	35 ± 5	30 ± 1	32 ± 4	26 ± 6
3	<i>C29Pp-D1<sup>P</sup></i>	100 ± 0	35 ± 6	62 ± 4*	28 ± 5	29 ± 3	22 ± 4
4	<i>C29Pp3Pp-D1<sup>P</sup></i>	100 ± 1	39 ± 2	40 ± 4	34 ± 2	25 ± 6	23 ± 2
5	<i>C29Pp3Pp<sup>PF</sup></i>	100 ± 0	30 ± 5*	32 ± 3*	31 ± 2	21 ± 1*	28 ± 2
6	<i>C29Pp-D1<sup>PF</sup></i>	100 ± 0	36 ± 3	34 ± 6	33 ± 2	37 ± 4*	27 ± 5
7	<i>C29Pp3Pp-D1<sup>PF</sup></i>	100 ± 0	32 ± 8	39 ± 3	30 ± 3	29 ± 2	21 ± 7

\* Различия достоверны по сравнению с контролем,  $p < 0.05$  (U-тест).

**Таблица 5.** Жизнеспособность (%) зерновок пшеницы, хранившихся в течение 2 и 6–9 лет при  $20 \pm 2$  °C, через 7 дней после посева

Номер	Линия	2 года	6 лет	7 лет	8 лет	8 лет 10 мес.	9 лет 2 мес.
1	<i>C29/S29</i>	100 ± 1	93 ± 2	79 ± 5	52 ± 1	52 ± 2	46 ± 7
2	<i>C29Pp3<sup>P</sup></i>	100 ± 0	89 ± 3	77 ± 4	66 ± 3*	55 ± 4	40 ± 6
3	<i>C29Pp-D1<sup>P</sup></i>	100 ± 0	95 ± 3	95 ± 5*	57 ± 7	58 ± 3*	43 ± 3
4	<i>C29Pp3Pp-D1<sup>P</sup></i>	100 ± 1	83 ± 4*	76 ± 4	55 ± 3	45 ± 2*	42 ± 2
5	<i>C29Pp3Pp<sup>PF</sup></i>	100 ± 0	85 ± 3*	66 ± 6*	57 ± 5	38 ± 1*	46 ± 6
6	<i>C29Pp-D1<sup>PF</sup></i>	100 ± 0	89 ± 4	74 ± 8	54 ± 6	58 ± 4*	48 ± 9
7	<i>C29Pp3Pp-D1<sup>PF</sup></i>	100 ± 0	86 ± 6*	83 ± 3	46 ± 2*	44 ± 1*	41 ± 1

\* Различия достоверны по сравнению с контролем,  $p < 0.05$  (U-тест).



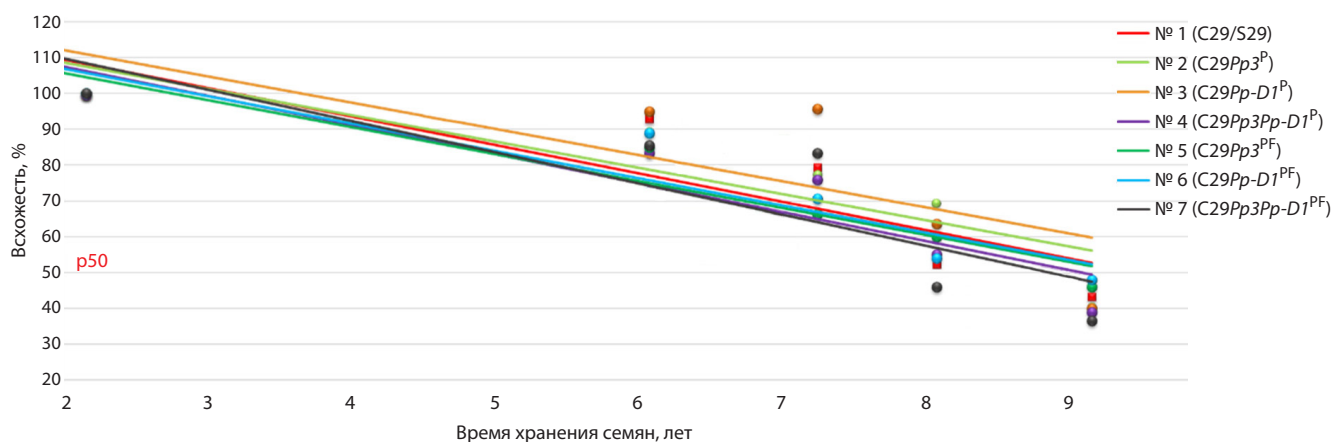


Рис. 3. Изменчивость всхожести зерновок после многолетнего хранения семян при  $20 \pm 2$  °С.

Таблица 6. Результаты регрессионного анализа изменчивости всхожести зерновок изогенных линий пшеницы во времени

Номер	Линия	Уравнение линейной регрессии ( $y = b_0 + b_1 \cdot x$ )	R	p
1	C29/S29	$y = 125.415 - 7.944x$	-0.876	0.0000
2	C29Pp3P	$y = 124.454 - 7.677x$	-0.888	0.0000
3	C29Pp-D1P	$y = 127.712 - 7.594x$	-0.769	0.0002
4	C29Pp3Pp-D1P	$y = 125.342 - 8.527x$	-0.919	0.0000
5	C29Pp3PF	$y = 125.718 - 8.806x$	-0.932	0.0000
6	C29Pp-D1PF	$y = 121.357 - 7.302x$	-0.903	0.0000
7	C29Pp3Pp-D1PF	$y = 126.469 - 8.674x$	-0.878	0.0000

в хромосомах 7D была достоверно выше родительского сорта Саратовская 29 (58 против 52 %).

После длительного хранения при  $20 \pm 2$  °С, через 9 лет и 2 мес., средние значения всхожести зерновок у всех линий были ниже 50 %, достоверно не отличаясь от сорта Саратовская 29 (рис. 3, значение  $p < 0.05$ ). Зависимость всхожести семян от времени их хранения хорошо описывается линейной регрессионной моделью (коэффициенты детерминации  $R^2$  значимы и варьируют у разных линий от 0.592 до 0.844). Для всех линий наблюдались отрицательные зависимости от времени хранения зерновок (табл. 6, см. рис. 3).

Самые высокие коэффициенты детерминации  $R^2$  зависимости всхожести изучаемых образцов семян по отношению ко времени хранения были у линий № 4–6 (см. табл. 6). Самый низкий коэффициент детерминации  $R^2 = 0.592$  и слабую зависимость всхожести семян от времени хранения показала линия № 3, имеющая единичный рекомбинационный участок в коротком плече у пары хромосом 7D. Низкие значения детерминации указывают на невысокое качество построенной модели, что подразумевает влияние на всхожесть семян, помимо срока хранения, дополнительных факторов, которые не были учтены при построении регрессионной модели.

При анализе уравнений линейной регрессии установлено, что стартовая всхожесть зерновок (коэффициент  $b_0$ ) была схожа. Коэффициент  $b_1$  характеризует угол наклона линии регрессии: чем выше значение  $b_1$ , тем чувстви-

тельнее линии к хранению зерновок. Наибольшие значения  $b_1$  были выявлены для линий № 7 C29Pp3Pp-D1PF ( $b_1 = -8.674$ ), № 4 C29Pp3Pp-D1P ( $b_1 = -8.527$ ) и № 5 C29Pp3PF ( $b_1 = -8.806$ ), несущих рекомбинантные участки в хромосоме 2A от доноров. Тогда как наименьшие значения  $b_1$  получены для линий № 6 C29Pp-D1PF ( $b_1 = -7.302$ ) и № 3 C29Pp-D1P ( $b_1 = -7.594$ ), характеризующихся наличием рекомбинантного участка от донора в хромосоме 7D.

В отличие от положительного влияния антоцианов на всхожесть семян после ускоренного индуцированного старения, их роль в поддержании жизнеспособности семян мягкой пшеницы в условиях длительного хранения не выявлена, однако установлено влияние рекомбинантного фрагмента на хромосоме 7D.

## Обсуждение

### Индукционное старение семян и жизнеспособность

Общепризнано, что на фоне высокой влажности при повышении температуры хранения происходит ускоренная потеря жизнеспособности семян. Метод «ускоренного индуцированного старения» (АА-тест) как процедура контролируемой порчи имитирует естественное старение семян и позволяет оценить их жизнеспособность.

Нами протестированы хранившиеся менее года после сбора урожая зерновки нескольких яровых и озимых сортов мягкой пшеницы, выращенных в однотипных контролируемых условиях в теплице, и подобраны условия для

АА-теста: предпосевная температура обработки семян 48 °С с повышенной влажностью воздуха в течение 72 ч. Только после повышения температуры предобработки до 48 °С всхожесть семян краснозерных сортов яровой пшеницы Саратовская 29 и Chinese Spring снизилась до 87 и 86 % соответственно. Всхожесть сибирского безозерного сорта Новосибирская 67 снизилась до 64 %. Интересно, что самые низкие показатели всхожести были у зерновок озимого сорта Мироновская 808 – всего 52 %.

По литературным данным, в Институте генетики растений и исследований сельскохозяйственных культур (IPK Gatersleben, Германия) коллекцию зерновок пшеницы озимых сортов и синтетиков подвергали искусственному старению, выдерживая в течение 72 ч при 43 °С и высокой (около 100 %) влажности (Landjeva et al., 2010; Rehman Arif et al., 2012; Agacka-Mołdoch et al., 2016; Arif et al., 2017). При изучении засухоустойчивой краснозерной диплоидной популяции пшеницы в Сельскохозяйственном университете Шаньси (Китай) зерновки выдерживали в течение 0, 24, 36, 48, 60 и 72 ч при более высокой температуре, 48 °С (Shi et al., 2020). Данный факт свидетельствует о том, что семена яровых краснозерных сортов пшеницы более устойчивы к непродолжительному повышению температуры и влажности.

Ранее было показано, что на длинном плече хромосомы 3А мутация функционального аллеля гена *R1* (*Tamyb10-A1*), представляющего собой транскрипционный фактор типа R2R3-MYB и регулирующего путь биосинтеза флавоноидов, привела к появлению белой оболочки зерна пшеницы, а также к уменьшению периода покоя (Mares, Hími, 2021). Авторы предположили, что красный цвет семенной оболочки сам по себе не является абсолютно необходимым для покоя. Он имел кумулятивный эффект в сочетании с другими локусами, контролирующими покой, не связанными с цветом зерна, поскольку выход из состояния покоя происходил раньше у изолированных эмбрионов по сравнению с интактными, покрытыми оболочками зерновками. Таким образом, функциональный аллель *R1* усиливал экспрессию генов, контролирующих состояние покоя в зерновках пшеницы, и удлинял время выхода из спячки (Mares, Hími, 2021).

Даже несмотря на то, что краснозерный сорт пшеницы Саратовская 29 более жизнеспособен в сравнении с белозерными и озимыми сортами, у почти изогенных линий с антоциановой окраской зерна, выведенных на его основе, индекс прорастания был достоверно выше на ~20 % после искусственного старения относительно исходного сорта (см. табл. 3). Повышенная жизнеспособность зерновок изогенных линий с антоциановым перикарпом в сравнении с краснозерным родительским сортом наблюдалась и у семян полевого урожая, зараженных патогенами и грибами. Такое действие антоцианов можно объяснить их антиоксидантными свойствами и участием в процессе нейтрализации АФК, образующихся в условиях повышения температуры и влажности. Таким образом, установлена положительная связь между содержанием антоциановых пигментов в околоплоднике яровой мягкой пшеницы Саратовская 29 и сохранением жизнеспособности семян, находящихся в состоянии покоя, при непродолжительном повышении температуры окружающей среды до 48 °С и

100 % влажности воздуха. Это можно объяснить действием генов *Pp*, которые запускают биосинтез антоцианов, обладающих антиоксидантным потенциалом, в перикарпе зерновки пшеницы после непродолжительного повышения температуры и влажности.

На хромосомах 2AL и 7DS, где были картированы гены транскрипционных факторов, регулирующих биосинтез антоцианов в перикарпе зерновок, также были картированы локусы количественных признаков (QTL), контролирующие долговечность семян пшеницы после индуцированного старения. Среди них, например, QTL, локализованные в районах 2AS5-0.78–1.00 и 2AL1-0.85–1.00, содержащих гены, влияющие на выработку и уровень ферментов, таких как НАДН-дегидрогеназа, пируват-декарбоксилаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза. Гены *Per2* (пероксидаза 2), *Sod* (супероксиддисмутаза), *Wip* (гены ингибиторов протеаз) и другие гены защитной реакции растений были описаны на всех трех гомеологичных хромосомах группы 2 (Li et al., 1999). Ген *Cbp2* (белок, связывающий хитиназу) картирован на длинном плече хромосомы 2A (Arif et al., 2017). QTL, контролирующей долговечность семян, также картирован на хромосоме 2Н ячменя, где был локализован маркер bPb6688\_2Н, гомологичный гену, кодирующему рибонуклеазу Н (RNaseH), которая участвует в репликации, репарации, рекомбинации и транскрипции ДНК при восстановлении поврежденных во время созревания и хранения семян (Nagel et al., 2015). Пять DArT-маркеров, сцепленных с QTL, контролирующими долговечность семян пшеницы, были картированы в хромосомах группы 7 в районах 7AS1-0.89–1.00, 7BS1-27-1.00, 7BL10-0.78–1.00 и 7DS4-0.61–1.00 (Arif et al., 2017). На ортологичной хромосоме ячменя 7Н картирован маркер bPb5747\_7Н, соответствующий гену, кодирующему белок из суперсемейства ERF/APETALA2, которое участвует в реакции растений на многочисленные стрессы, приводящие к повышению антиоксидантной активности (Nagel et al., 2015).

### Естественное хранение семян и жизнеспособность

Среди сельскохозяйственных культур мягкую пшеницу относят к группе мезобиотиков, семена которых при благоприятных условиях хранения не теряют всхожесть в течение 5–10 лет (Гурьева и др., 2021). Считается, что долговечность зерновок пшеницы составляет до 14 лет в условиях окружающей среды (20 °С, относительная влажность до 50 %) со значением  $r_{50}$  (период жизнеспособности 50 %) около семи лет (Nagel, Börner, 2010).

В нашей работе после естественного старения при хранении семян в сухом проветриваемом помещении при 20±2 °С после двух, шести, семи, восьми и девяти лет хранения потеря 50 % жизнеспособности зерновок почти изогенных линий, созданных на основе сорта Саратовская 29, наблюдалась после девяти лет хранения (см. табл. 5), что соответствует биологической долговечности семян до 18 лет хранения.

В настоящем эксперименте после двух лет хранения при 20 °С все испытанные образцы пшеницы были здоровыми, имели всхожесть и энергию прорастания 100 % (см. табл. 4 и 5). И только после шести лет хранения всхожесть трех линий, *C29Pp3Pp-D1<sup>P</sup>*, *C29Pp3<sup>PF</sup>*, *C29Pp3Pp-D1<sup>PF</sup>*

(№ 4, 5, 7), была достоверно снижена в сравнении с сортом Саратовская 29 (№ 1 = 93 %), составляя 83, 85 и 86 % соответственно. По ГОСТ Р 52325-2005, всхожесть семенного материала в качестве репродукции для производства товарной продукции должна быть не менее 87 % (Гурьева и др., 2021). Надо отметить, что сам сорт Саратовская 29 принадлежит к краснозерной разновидности пшеницы и содержит полимерные проантоцианидины, которые синтезируются в семенной оболочке, усиливая покой и долговечность семян (Mares, Himi, 2021). Можно предположить, что в линиях с рекомбинантными участками в хромосомы 2AL от сортов-доноров Purple и Purple Feed был привнесен аллель локуса *Q.Lng.ipk.2A.1(SW)* (Arif et al., 2022), негативно влияющий на продолжительность жизни семян.

По правилам тестирования семян Международной ассоциации тестирования семян (ISTA), снижение скорости прорастания после старения, измеряемое по среднему времени прорастания (средняя задержка до появления корешков), интерпретируется как время, необходимое для метаболического восстановления вредных последствий старения, прежде чем прорастание сможет начаться (Powell, Matthews, 2012). После семи лет хранения самыми дружными по скорости прорастания и всхожести оказались семена линии *C29Pp-D1<sup>P</sup>* (№ 3) с рекомбинантным участком в хромосоме 7D от сорта-донора Purple (см. табл. 5). Значимо повышенную скорость прорастания после девяти лет хранения показали проростки из зерен изогенных линий *C29Pp-D1<sup>P</sup>* и *C29Pp-D1<sup>PF</sup>* (№ 3 и 6) с рекомбинантными участками в хромосоме 7D от сортов Purple и Purple Feed соответственно. По результатам регрессионного анализа наименьшие значения коэффициента угла наклона  $b_1$ , а следовательно, и влияние времени хранения на всхожесть зерновок были выявлены для изогенных линий *C29Pp-D1<sup>P</sup>* и *C29Pp-D1<sup>PF</sup>* (№ 3 и 6), несущих рекомбинантный участок от сорта-донора в хромосоме 7D (см. табл. 6, рис. 3). По-видимому, это связано с генами положительной регуляции долговечности семян, находящимися в данных участках хромосомы 7DS.

Как показано ранее при изучении признаков долговечности семян у рекомбинантных линий пшеницы *Aegilops tauschii*, область хромосомы 7DS, где локализуется микросателлитный маркер *Xgwm1002*, сцепленный с геном *Pp-D1*, содержит локусы, контролирующие развитие нормальных проростков (Landjeva et al., 2010). В то же время самая низкая всхожесть и высокая чувствительность к хранению зерновок наблюдались у линий с одиночными рекомбинантными участками в хромосоме 2AL, что, как мы предполагаем, связано с отрицательной регуляцией аллеля локуса *Q.Lng.ipk.2A.1(SW)*, находящегося в данном участке хромосомы 2AL (Arif et al., 2022).

Всхожесть семян линий *C29Pp3Pp-D1<sup>P</sup>* и *C29Pp3Pp-D1<sup>PF</sup>* (№ 4 и 7) с антоциановыми пигментами в околоплоднике, несущими рекомбинантные фрагменты от сортов Purple Feed и Purple в хромосомах 2A и 7D, была тоже снижена. Полученные результаты показали нейтральную, а в некоторых случаях даже отрицательную роль антоцианов в перикарпе зерновок при длительном хранении, что отличается от результатов тестирования зерновок после искусственного индуцированного старения с повышенной

температурой (48 °C) и 100 % влажностью в течение 72 ч, где при общем падении всхожести семян индекс прорастания окрашенных антоцианами зерен был на 20 % выше, чем у линий без антоцианового пигмента (см. табл. 3).

Результаты лабораторных методов искусственного ускоренного старения, используемых для оценки долговечности в условиях хранения семян, подвергаются сомнению из-за неэффективной имитации фактического старения семян и, как следствие, значительных отличий в результатах (Schwember, Bradford, 2010; Roach et al., 2018; Giannela et al., 2022). Например, была показана низкая корреляция между жизнеспособностью зерна после естественного хранения при 0 °C и относительной влажности 10 % в течение 12–14 лет и жизнеспособностью зерна, подвергнутого искусственному старению (Agacka-Moldoch et al., 2016). При этом были выявлены локусы *Q.Lng.ipk-4A* и *-7B*, контролирующие жизнеспособность семян в условиях длительного хранения и искусственного старения (Agacka-Moldoch et al., 2016). У ячменя в хромосомах 2H, 5H и 7H были картированы QTL, отвечающие за долговечность зерна (Nagel et al., 2015). Предполагается, что один из выявленных локусов контролирует биосинтез глутатиона, наиболее древнего окислительно-восстановительного буфера (Швачко, Хлесткина, 2020).

Считается, что снижение активности антиоксидантных систем способствует накоплению АФК, что является основной причиной повреждения ДНК и ухудшения состояния клеток в состарившихся семенах и, как следствие, их пониженной всхожести (Швачко, Хлесткина, 2020). В созревших сухих зерновках с пониженным содержанием влаги при длительном хранении идет постепенное накопление мутаций нуклеотидов и деградация макромолекул в результате внутренних деструктивных эндогенных процессов, связанных с замедлением механизмов репарации и развитием интоксикации побочными продуктами метаболизма. Об этом свидетельствует накопление в семенах большого количества АФК, окисленных липидов и альдегидов (Wiebach et al., 2020; Zhang et al., 2022). Потеря жизнеспособности семян проявляется в снижении скорости и равномерности прорастания семян из-за длительного периода предростовой репарации ДНК, начинающейся на самых ранних стадиях пропитки семян водой, до начала роста и выхода корешка через семенную оболочку. Процесс активации клеточного цикла регулируется протеинкиназами контрольных точек (check points), которые замедляют прорастание при наличии повреждений ДНК, что в итоге влияет на достоверность передачи генетической информации и качество семян (Waterworth et al., 2016; Considine, Foyer, 2021). Необходимость длительного восстановления накопленных повреждений лежит в основе задержки прорастания и в конечном счете приводит к истощению и гибели семян (Waterworth et al., 2019).

Удаление избыточного количества АФК играет ключевую роль в регуляции долговечности семян (Zhou W. et al., 2020). Однако водорастворимые антоцианы в перикарпе зерновок присутствуют в высушенном состоянии и начинают работать только во время увлажнения и набухания семян. По-видимому, защита сухих семян с высокой вязкостью цитоплазмы и низкой клеточной подвижностью во время длительного хранения осуществляется другими



антиоксидантными системами, вероятно глутатионом, который был выявлен в высокой концентрации в сухих семенах, либо жирорастворимыми антиоксидантами. В том числе такую функцию можно предположить для антоцианов, находящихся в алейроновом слое зерновки, содержащем большое количество жирных кислот. Возможно, выявленное положительное влияние локуса на хромосоме 7DS на жизнеспособность семян пшеницы после длительного хранения связано именно с действием этого мощного антиоксиданта, а не антоцианов, синтез которых контролируется двумя локусами, один из которых (на хромосоме 2A) оказывает отрицательное влияние на жизнеспособность после длительного старения.

### Заключение

В результате проведенного исследования впервые показано, что антоцианы, накапливающиеся в зерновках пшеницы, оказывают положительное влияние на всхожесть семян после искусственного старения, индуцированного повышенной до 48 °C температурой в течение 72 ч. В условиях длительного естественного хранения положительного влияния антоцианов на поддержание жизнеспособности семян выявлено не было. Однако наличие рекомбинантного участка на хромосоме 7D повышало жизнеспособность семян после длительного хранения, что может быть связано с наличием в этой хромосоме сцепленных с геном *Pp-D1* локусов, контролирующих долговечность семян пшеницы.

### Список литературы / References

Гурьева К.Б., Белецкий С.Л., Хаба Н.А. Исследования посевных качеств зерна пшеницы при длительном хранении. В: Инновационные технологии производства и хранения материальных ценностей для государственных нужд. М.: Галлея-Принт, 2021; 28-36  
[Guryeva K.B., Beletskiy S.L., Khaba N.A. Studies of wheat grain sowing qualities during long-term storage. In: Innovative Technologies for the Production and Storage of Material Assets for National Needs. Moscow: Galleya-Print Publ., 2021;28-36 (in Russian)]

Швачко Н.А., Хлесткина Е.К. Молекулярно-генетические основы устойчивости семян к окислительному стрессу при хранении. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(5):451-458. DOI 10.18699/VJ20.47-0  
[Shvachko N.A., Khlestkina E.K. Molecular genetic bases of seed resistance to oxidative stress during storage. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(5):451-458. DOI 10.18699/VJ20.47-0]

Юдина Р.С., Гордеева Е.И., Шоева О.Ю., Тихонова М.А., Хлесткина Е.К. Антоцианы как компоненты функционального питания. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(2):178-189. DOI 10.18699/VJ21.022  
[Yudina R.S., Gordeeva E.I., Shoeva O.Yu., Tikhonova M.A., Khlestkina E.K. Anthocyanins as functional food components. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):178-189. DOI 10.18699/VJ21.022 (in Russian)]

Agacka-Moldoch M., Arif M.A.R., Lohwasser U., Doroszewska T., Qualset C.O., Börner A. The inheritance of wheat grain longevity: a comparison between induced and natural ageing. *J. Appl. Genet.* 2016;57(4):477-481. DOI 10.1007/s13353-016-0348-3

Arbuzova V.S., Maystrenko O.I., Popova O.M. Development of near-isogenic lines of the common wheat cultivar 'Saratovskaya 29'. *Cereal Res. Commun.* 1998;26(1):39-46. DOI 10.1007/bf03543466

Arif M.A.R., Nagel M., Lohwasser U., Börner A. Genetic architecture of seed longevity in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Biosci.* 2017;42(1):81-89. DOI 10.1007/s12038-016-9661-6

Arif M.A.R., Afzal I., Börner A. Genetic aspects and molecular causes of seed longevity in plants – a review. *Plants*. 2022;11(5):598. DOI 10.3390/plants11050598

Chen X., Yin G., Börner A., Xin X., He J., Nagel M., Liu X., Lu X. Comparative physiology and proteomics of two wheat genotypes differing in seed storage tolerance. *Plant Physiol. Biochem.* 2018; 130:455-463. DOI 10.1016/j.plaphy.2018.07.022

Considine M.J., Foyer C.H. Stress effects on the reactive oxygen species-dependent regulation of plant growth and development. *J. Exp. Bot.* 2021;72(16):5795-5806. DOI 10.1093/jxb/erab265

Corso M., Perreau F., Mouille G., Lepiniec L. Specialized phenolic compounds in seeds: structures, functions, and regulations. *Plant Sci.* 2020;296:110471. DOI 10.1016/j.plantsci.2020.110471

Debeaujon I., Peeters A.J., Léon-Kloosterziel K.M., Koornneef M. The *TRANSPARENT TESTA12* gene of Arabidopsis encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. *Plant Cell*. 2001;13(4):853-871. DOI 10.1105/tpc.13.4.853

Dogra V., Kim C. Singlet oxygen metabolism: from genesis to signaling. *Front. Plant Sci.* 2020;10:1640. DOI 10.3389/fpls.2019.01640

Dumanović J., Nepovimova E., Natić M., Kuča K., Jačević V. The significance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: a concise overview. *Front. Plant Sci.* 2021;11:552969. DOI 10.3389/fpls.2020.552969

Garg M., Kaur S., Sharma A., Kumari A., Tiwari V., Sharma S., Kapoor P., Sheoran B., Goyal A., Krishania M. Rising demand for healthy foods-anthocyanin biofortified colored wheat is a new research trend. *Front. Nutr.* 2022;9:878221. DOI 10.3389/fnut.2022.878221

Gianella M., Balestrazzi A., Ravasio A., Mondoni A., Börner A., Guzzon F. Comparative seed longevity under genebank storage and artificial ageing: a case study in heteromorphic wheat wild relatives. *Plant Biol.* 2022;24(5):836-845. DOI 10.1111/plb.13421

Gordeeva E.I., Shoeva O.Y., Khlestkina E.K. Marker-assisted development of bread wheat near-isogenic lines carrying various combinations of purple pericarp (*Pp*) alleles. *Euphytica*. 2015;203(2):469-476. DOI 10.1007/s10681-014-1317-8

Hay F.R., Valdez R., Lee J.S., Sta. Cruz P.C. Seed longevity phenotyping: recommendations on research methodology. *J. Exp. Bot.* 2019; 70(2):425-434. DOI 10.1093/jxb/ery358

International Rules for Seed Testing. Switzerland: The International Seed Testing Association (ISTA), 2004

Kaur S., Tiwari V., Kumari A., Chaudhary E., Sharma A., Ali U., Garg M. Protective and defensive role of anthocyanins under plant abiotic and biotic stresses: an emerging application in sustainable agriculture. *J. Biotechnol.* 2023;361:12-29. DOI 10.1016/j.jbiotec.2022.11.009

Kohyama N., Chono M., Nakagawa H., Matsuo Y., Ono H., Matsunaka H. Flavonoid compounds related to seed coat color of wheat. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2017;81(11):2112-2118. DOI 10.1080/09168451.2017.1373589

Kong L., Wang F., Si J., Feng B., Li S. Water-soluble phenolic compounds in the coat control germination and peroxidase reactivation in *Triticum aestivum* seeds. *Plant Growth Regul.* 2008;56:275-283. DOI 10.1007/s10725-008-9307-2

Kumar A., Prasad A., Pospíšil P. Formation of  $\alpha$ -tocopherol hydroperoxide and  $\alpha$ -tocopheroxyl radical: relevance for photooxidative stress in Arabidopsis. *Sci. Rep.* 2020;10(1):19646. DOI 10.1038/s41598-020-75634-0

Kurek K., Plitta-Michalak B., Ratajczak E. Reactive oxygen species as potential drivers of the seed aging process. *Plants*. 2019;8(6):174. DOI 10.3390/plants8060174

Landjeva S., Lohwasser U., Börner A. Genetic mapping within the wheat D genome reveals QTL for germination, seed vigour and longevity, and early seedling growth. *Euphytica*. 2010;171:129-143. DOI 10.1007/s10681-009-0016-3







- Li W., Faris J., Chittoor J., Leach J., Hulbert S., Liu D., Chen P., Gill B. Genomic mapping of defense response genes in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1999;98:226-233. DOI 10.1007/s001220051062
- Li W., Niu Y., Zheng Y., Wang Z. Advances in the understanding of reactive oxygen species-dependent regulation on seed dormancy, germination, and deterioration in crops. *Front. Plant Sci.* 2022;13:826809. DOI 10.3389/fpls.2022.826809
- Liu J., Zhou H., Song L., Yang Z., Qiu M., Wang J., Shi S. Anthocyanins: promising natural products with diverse pharmacological activities. *Molecules.* 2021;26(13):3807. DOI 10.3390/molecules26133807
- Longo C., Holness S., De Angelis V., Lepri A., Occhigrossi S., Ruta V., Vittorioso P. From the outside to the inside: new insights on the main factors that guide seed dormancy and germination. *Genes.* 2020;12(1):52. DOI 10.3390/genes12010052
- Loskutov I.G., Khlestkina E.K. Wheat, barley, and oat breeding for health benefit components in grain. *Plants.* 2021;10(1):86. DOI 10.3390/plants10010086
- Mares D., Himi E. The role of *TaMYB10-A1* of wheat (*Triticum aestivum* L.) in determining grain coat colour and dormancy phenotype. *Euphytica.* 2021;217(5):89. DOI 10.1007/s10681-021-02826-8
- Nagel M., Börner A. The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. *Seed Sci. Res.* 2010;20(1):1-12. DOI 10.1017/s0960258509990213
- Nagel M., Kranner I., Neumann K., Rolletschek H., Seal C.E., Colville L., Fernández-Marín B.E., Börner A. Genome-wide association mapping and biochemical markers reveal that seed ageing and longevity are intricately affected by genetic background and developmental and environmental conditions in barley. *Plant Cell Environ.* 2015;38(6):1011-1022. DOI 10.1111/pce.12474
- Patra S., Makhhal P., Jaryal S., Nilesh M., Kaki V.R. Anthocyanins: plant-based flavonoid pigments with diverse biological activities. *Int. J. Plant Based Pharm.* 2022;2(1):118-127. DOI 10.62313/ijpbp.2022.22
- Pourcel L., Routaboul J.M., Cheynier V., Lepiniec L., Debeaujon I. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends Plant Sci.* 2007;12(1):29-36. DOI 10.1016/j.tplants.2006.11.006
- Powell A., Matthews S. Seed aging/repair hypothesis leads to new testing methods. *Seed Technol.* 2012;34(1):15-25
- Rathod D.R., Kumar A., Lal S.K., Talukdar A. Seed coat permeability studies in wild and cultivated species of soybean. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 2017;6(7):2358-2363. DOI 10.20546/ijcmas.2017.607.279
- Rehman Arif M.A., Nagel M., Neumann K., Kobiljski B., Lohwasser U., Börner A. Genetic studies of seed longevity in hexaploid wheat using segregation and association mapping approaches. *Euphytica.* 2012;186:1-13. DOI 10.1007/s10681-011-0471-5
- Roach T., Nagel M., Börner A., Eberle C., Kranner I. Changes in tocopherols and glutathione reveal differences in the mechanisms of seed ageing under seedbank conditions and controlled deterioration in barley. *Environ. Exp. Bot.* 2018;156:8-15. DOI 10.1016/j.envexpbot.2018.08.027
- Sano N., Rajjou L., North H.M., Debeaujon I., Marion-Poll A., Seo M. Staying alive: molecular aspects of seed longevity. *Plant Cell Physiol.* 2016;57(4):660-674. DOI 10.1093/pcp/pcv186
- Schwember A.R., Bradford K.J. Quantitative trait loci associated with longevity of lettuce seeds under conventional and controlled deterioration storage conditions. *J. Exp. Bot.* 2010;61(15):4423-4436. DOI 10.1093/jxb/erq248
- Shah F.A., Ni J., Chen J., Wang Q., Liu W., Chen X., Tang C., Fu S., Wu L. Proanthocyanidins in seed coat tegmen and endospermic cap inhibit seed germination in *Sapum sebiferum*. *PeerJ.* 2018;6:e4690. DOI 10.7717/peerj.4690
- Shen N., Wang T., Gan Q., Liu S., Wang L., Jin B. Plant flavonoids: classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chem.* 2022;383:132531. DOI 10.1016/j.foodchem.2022.132531
- Shi H., Guan W., Shi Y., Wang S., Fan H., Yang J., Chen W., Zhang W., Sun D., Jing R. QTL mapping and candidate gene analysis of seed vigor-related traits during artificial aging in wheat (*Triticum aestivum*). *Sci. Rep.* 2020;10(1):22060. DOI 10.1038/s41598-020-75778-z
- Stegner M., Wagner J., Roach T. Antioxidant depletion during seed storage under ambient conditions. *Seed Sci. Res.* 2022;32(3):150-156. DOI 10.1017/s0960258522000101
- Tereshchenko O.Y., Gordeeva E.I., Arbusova V.S., Börner A., Khlestkina E. The D genome carries a gene determining purple grain colour in wheat. *Cereal Res. Commun.* 2012;40(3):334-341. DOI 10.1556/CRC.40.2012.3.2
- Waterworth W.M., Footitt S., Bray C.M., Finch-Savage W.E., West C.E. DNA damage checkpoint kinase ATM regulates germination and maintains genome stability in seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016;113(34):9647-9652. DOI 10.1073/pnas.1608829113
- Waterworth W.M., Bray C.M., West C.E. Seeds and the art of genome maintenance. *Front. Plant Sci.* 2019;10:706. DOI 10.3389/fpls.2019.00706
- Wiebach J., Nagel M., Börner A., Altmann T., Riewe D. Age-dependent loss of seed viability is associated with increased lipid oxidation and hydrolysis. *Plant Cell Environ.* 2020;43(2):303-314. DOI 10.1111/pce.13651
- Zhang T., Ayed C., Fisk I.D., Pan T., Wang J., Yang N., Sun Q. Evaluation of volatile metabolites as potential markers to predict naturally-aged seed vigour by coupling rapid analytical profiling techniques with chemometrics. *Food Chem.* 2022;367:130760. DOI 10.1016/j.foodchem.2021.130760
- Zhou G., Wu S., Chen D., Wu X., Cai Q. Polyphenols and phytohormones profiling of pre-harvest sprouting resistant and susceptible wheat genotypes. *SN Appl. Sci.* 2023;5:249. DOI 10.1007/s42452-023-05464-y
- Zhou W., Chen F., Luo X., Dai Y., Yang Y., Zheng C., Yang W., Shu K. A matter of life and death: molecular, physiological, and environmental regulation of seed longevity. *Plant Cell Environ.* 2020;43(2):293-302. DOI 10.1111/pce.13666

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

Поступила в редакцию 21.12.2023. После доработки 27.03.2024. Принята к публикации 01.04.2024.

DOI 10.18699/vjgb-24-57

# Изучение влияния транслокации T2DL.2DS-2SS и замещения 5S(5D) от *Aegilops speltoides* на селекционно-ценные признаки мягкой пшеницы

Р.О. Давоян , И.В. Бебякина<sup>1</sup>, Э.Р. Давоян<sup>1</sup>, А.Н. Зинченко<sup>1</sup>, Ю.С. Зубанова<sup>1</sup>, Д.М. Болдаков<sup>1</sup>, В.И. Басов<sup>1</sup>, Е.Д. Бадаева , И.Г. Адонина , Е.А. Салина 

<sup>1</sup> Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко, Краснодар, Россия

<sup>2</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>3</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

 davoyanro@mail.ru





**Аннотация.** Использование генофонда диких сородичей для расширения генетического разнообразия мягкой пшеницы является актуальным направлением селекции. Однако практическое применение линий мягкой пшеницы с чужеродным генетическим материалом сдерживается ввиду отсутствия информации о хромосомных перестройках и их влиянии на важные хозяйственные признаки. Целью настоящей работы было изучение 14 интрогрессивных линий с транслокацией T2DL.2DS-2SS и замещением 5S(5D) от *Aegilops speltoides*, полученных от скрещивания сортов мягкой пшеницы Аврора, Краснодарская 99, Ника Кубани с геномно-замещенной синтетической формой Авродес (BBAASS). Гибридные линии с различным сочетанием транслокаций T2DL.2DS-2SS и T1BL.1RS и замещения 5S(5D) были охарактеризованы по устойчивости к листовой и желтой ржавчине, компонентам продуктивности и технологическим качествам зерна. Оценка устойчивости сортов к ржавчинным болезням показала, что Краснодарская 99, Ника Кубани и сорт Аврора (носитель транслокации T1BL.1RS) высоковосприимчивы к болезням, тогда как наличие транслокации T2DL.2DS-2SS и замещения 5S(5D) как совместно, так и по отдельности обеспечивает устойчивость линий к грибным патогенам. Анализ линий с помощью маркеров, разработанных для известных генов устойчивости от *Ae. speltoides*, не выявил в линиях присутствия генов *Lr28*, *Lr35* и *Lr51*. Полученные результаты позволяют предположить, что генетический материал *Ae. speltoides* в хромосомах 2D и 5D содержит новые гены устойчивости. Для определения влияния транслокации T2DL.2DS-2SS и замещения 5S(5D) на продуктивность и технологические качества зерна проведено изучение линий по массе 1000 зерен, массе зерна и количеству колосьев с 1 м<sup>2</sup>, содержанию белка и клейковины, качеству клейковины и общей хлебопекарной оценке. Установлен положительный эффект по массе 1000 зерен, содержанию белка и клейковины. По остальным признакам существенных различий не найдено. Транслокация T2DL.2DS-2SS и замещение 5S(5D) не оказывают негативного влияния на продуктивность и технологические качества зерна и представляют интерес для селекционной практики.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum*; *Aegilops speltoides*; интрогрессивные линии; хромосомы; транслокации; молекулярные маркеры; устойчивость к болезням; продуктивность и технологические качества зерна.

**Для цитирования:** Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян Э.Р., Зинченко А.Н., Зубанова Ю.С., Болдаков Д.М., Басов В.И., Бадаева Е.Д., Адонина И.Г., Салина Е.А. Изучение влияния транслокации T2DL.2DS-2SS и замещения 5S(5D) от *Aegilops speltoides* на селекционно-ценные признаки мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(5):506-514. DOI 10.18699/vjgb-24-57

**Финансирование.** Цитогенетический анализ выполнен при поддержке бюджетного проекта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации FWNR-2022-0017.


## A study of the influence of the T2DL.2DS-2SS translocation and the 5S(5D) substitution from *Aegilops speltoides* on breeding-valuable traits of common wheat

R.O. Davoyan , I.V. Bebyakina<sup>1</sup>, E.R. Davoyan<sup>1</sup>, A.N. Zinchenko<sup>1</sup>, Y.S. Zubanova<sup>1</sup>, D.M. Boldakov<sup>1</sup>, V.I. Basov<sup>1</sup>, E.D. Badaeva , I.G. Adonina , E.A. Salina 

<sup>1</sup> National Center of Grain named after P.P. Lukyanenko, Krasnodar, Russia

<sup>2</sup> Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

 davoyanro@mail.ru

**Abstract.** The use of the gene pool of wild relatives for expanding the genetic diversity of common wheat is an important task of breeding programs. However, the practical application of common wheat lines with alien genetic material is constrained by the lack of information on chromosomal rearrangements and the negative impact of the transferred material on agronomically important traits. This research is aimed at studying 14 introgression lines with the T2DL.2DS-2SS translocation and the 5S(5D) substitution from *Aegilops speltoides* obtained from crossing common wheat varieties (Aurora, Krasnodarskaya 99, Nika Kubani) with the genome-substituted form Avrodес (BBAASS). Hybrid lines with different combinations of T2DL.2DS-2SS and T1BL.1RS translocations and 5S(5D) substitution were characterized by resistance to leaf and yellow rusts, productivity components and technological qualities of grain. The assessment of the varieties' resistance to rust diseases showed that Krasnodarskaya 99, Nika Kubani and the Aurora variety, which is a carrier of the T1BL.1RS translocation, are highly susceptible to diseases, while the presence of the T2DL.2DS-2SS translocation and the 5S(5D) substitution, both together and separately, provides resistance to fungal pathogens. The analysis of the lines using markers designed for known resistance genes of *Ae. speltoides* did not reveal the presence of the *Lr28*, *Lr35* and *Lr51* genes in the lines. The results suggest that the genetic material of *Ae. speltoides* transferred to chromosomes 2D and 5D contains new resistance genes. To determine the effect of the T2DL.2DS-2SS translocation and the 5S(5D) substitution on the productivity and technological qualities of grain, the lines were assessed by weight of 1000 grains, grain weight and number of ears per 1 m<sup>2</sup>, by protein and gluten content, gluten quality and general baking evaluation. A positive effect was determined upon the weight of 1000 grains, protein and gluten content. There were no significant differences in other characteristics. The T2DL.2DS-2SS translocation and the 5S(5D) substitution did not have a negative effect on the productivity and technological quality of grain, and are of interest for breeding practice.

**Key words:** *Triticum aestivum*; *Aegilops speltoides*; introgressive lines; chromosomes; translocations; molecular markers; disease resistance; productivity and technological qualities of grain.

**For citation:** Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan E.R., Zinchenko A.N., Zubanova Y.S., Boldakov D.M., Basov V.I., Badaeva E.D., Adonina I.G., Salina E.A. A study of the influence of the T2DL.2DS-2SS translocation and the 5S(5D) substitution from *Aegilops speltoides* on breeding-valuable traits of common wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(5):506-514. DOI 10.18699/vjgb-24-57

## Введение

Основа селекции, в том числе такой важной сельскохозяйственной культуры, как мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.), – наличие достаточного генетического разнообразия. Интенсификация селекционного процесса и широкое распространение однотипных сортов привели к значительной генетической эрозии, и в особенности генов устойчивости к болезням. Эффективное направление решения этой проблемы – использование генофонда многочисленных родственных мягкой пшенице видов и родов (Knott, 1987; Friebe et al., 1996).

Одним из наиболее широко используемых в качестве источника устойчивости к болезням дикорастущих сородичей является вид *Aegilops speltoides* Tausch (Manisterski et al., 1988; Kerber, Dyck, 1990). От этого вида пшенице переданы гены устойчивости: к листовой ржавчине – *Lr28*, *Lr35*, *Lr36*, *Lr47*, *Lr51* и *Lr66*, к стеблевой ржавчине – *Sr32*, *Sr39*, *Sr47*, к мучнистой росе – *Pm12*, *Pm32* (McIntosh et al., 2013). *Aegilops speltoides* также характеризуется высоким содержанием белка и способностью стимулировать гомеологичную конъюгацию хромосом (Dvorak, 1972). Однако из-за негативного влияния на другие хозяйственно ценные признаки интрогрессии от этого вида не нашли широкого применения в селекционной практике (McIntosh et al., 1995; Helguera et al., 2005; Song et al., 2007; Brevis et al., 2008). Следует отметить, что негативный эффект чужеродной интрогрессии может зависеть как от отрицательного влияния переданного вместе с целевым геном генетического материала дикого сородича, так и от генотипической среды сорта-реципиента (Hoffmann, 2008; Леонова, Будашкина, 2016).

В Национальном центре зерна (НЦЗ) им. П.П. Лукьяненко создана геномно-замещенная форма Авродес (BBAASS), которая используется в качестве «мостика» для передачи

генетического материала от *Ae. speltoides* в мягкую пшеницу (Жиров, Терновская, 1984; Давоян Р.О. и др., 2012). Эта форма проявляет групповую устойчивость к листовой ржавчине (*Puccinia triticina* Erikss.), желтой ржавчине (*Puccinia striiformis* West.), мучнистой росе (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) и отличается высоким содержанием белка (Давоян Р.О. и др., 2018). С ее участием получен большой набор интрогрессивных линий мягкой пшеницы, различающихся по комплексу морфо-биологических и хозяйственно ценных признаков, форме передачи генетического материала от *Ae. speltoides* (Давоян Р.О. и др., 2017).

С применением методов дифференциального окрашивания хромосом (С-бэндинг) и флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) было установлено, что интрогрессии затронули в основном хромосомы генома D. Этот факт объясняется тем, что в синтетической форме Авродес именно геном D мягкой пшеницы замещен на геном S *Ae. speltoides*. При этом для большинства изученных линий характерны транслокация T2DL.2DS-2SS и замещение 5S(5D). Для определения селекционной ценности полученных транслокаций и замещений от *Ae. speltoides* необходимо всестороннее изучение интрогрессивных линий по хозяйственно важным признакам.

Целью настоящего исследования было изучение влияния транслокации T2DL.2DS-2SS и замещения 5S(5D) от *Ae. speltoides* на продуктивность, качество зерна и устойчивость к грибным болезням трех различных по происхождению сортов мягкой пшеницы.

## Материалы и методы

Материалом для исследования служили 14 интрогрессивных линий мягкой пшеницы, полученных от скрещивания синтетической формы Авродес с восприимчивыми к листовой и желтой ржавчинам сортами селекции

**Таблица 1.** Условия амплификации, названия и источники праймеров, используемых для идентификации генов *Lr28*, *Lr35*, *Lr51*

Ген	Праймер	Температура отжига, °С	Размер фрагмента, п. н.	Литературный источник
<i>Lr28</i>	CS421570-L	60	570	Cherukuri et al., 2005
	CS421570-R			
<i>Lr35</i>	BCD260	59	931	Seyfarth et al., 1999
	35R2			
<i>Lr51</i>	AGA7-759	52	819	Helguera et al., 2005
	S30-13			

НЦЗ им. П.П. Лукьяненко: Аврора, Краснодарская 99 и Ника Кубани. Линии, созданные с использованием сортов Краснодарская 99 и Аврора, были получены ранее (Давоян Р.О. и др., 2017) и отобраны в рамках данной работы на наличие транслокаций T2DL.2DS-2SS и замещения 5S(5D). Линии, созданные на основе сорта Ника Кубани, были охарактеризованы цитологическими методами.

Дифференциальное окрашивание хромосом (С-бэндинг) проводили в Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова по методике, разработанной в лаборатории функциональной морфологии хромосом Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (Badaeva et al., 1994). Флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) выполняли в Институте цитологии и генетики СО РАН по ранее опубликованной методике (Salina et al., 2006) с применением зондов Spelt1 (Salina et al., 2004) – для выявления генетического материала *Ae. speltoides* в исследуемых линиях pSc119.2 (Bedbrook et al., 1980) и pAs1 (Rayburn, Gill, 1986) – для идентификации хромосом пшеницы и эгилопса (Badaeva et al., 1996; Schneider et al., 2003). Работы проводили в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (г. Новосибирск).

Заражение линий осуществляли в полевых условиях: желтой ржавчиной – в фазу «выход в трубку», листовой ржавчиной – в фазу «трубка–колошение». В обоих случаях использовали смесь уредоспор, собранных с разных сортов пшеницы. Оценку проводили при достижении у наиболее восприимчивого и позднего по созреванию сорта-реципиента Аврора максимальных показателей поражаемости (тип реакции 4, степень поражения 60 %). Тип реакции растений на заражение листовой ржавчиной определяли по шкале E.B. Mains и H.S. Jackson (1926), к желтой ржавчине – по шкале G. Gasner и U.W. Straib (1934). Растения с промежуточным типом реакции от 0 до 1 обозначали баллом 01. Степень поражения растений оценивали по модифицированной шкале Кобба (Peterson et al., 1948). К устойчивым относили растения с типом реакции от 0 до 2 и степенью поражения от 0 до 20 %.

ДНК выделяли из 5–7-дневных этиолированных проростков пшеницы по методу J. Plaschke с коллегами (1995). Идентификацию генов *Lr28*, *Lr35* и *Lr51* осуществляли с использованием ПЦР. Маркеры отбирали на основании литературных данных (табл. 1).

Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 1× буфер для Taq-ДНК-полимеразы (50 mM KCl, 20 mM трис-HCl, pH 8.4, 2–5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01 % Твин-20), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, по 0.2 mM каждого dNTP, 12.5 mM каждого праймера, 50 нг ДНК и 1 ед. Taq-полимеразы. Амплификацию проводили

согласно условиям, приведенным в табл. 1. Продукты ПЦР для генов *Lr28* и *Lr35* разделяли с помощью электрофореза в 1.8 % агарозном геле с 0.5× буфером TBE, в случае гена *Lr51* использовали 3 % агарозный гель с применением агарозы MS-12, Molecular Screening “diaGene” с повышенной четкостью разделения фрагментов. В качестве маркера молекулярного веса использовали ДНК-маркер M24 100 bp «СибЭнзим». Гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолетовом свете с помощью фотобокса Infiniti 1000.

Для характеристики линий по продуктивности определяли массу 1000 зерен, массу зерна и количество колосьев с одной делянки. Площадь делянки 1 м<sup>2</sup>, повторность четырехкратная. Технологические качества зерна и муки изучали в отделе технологии и биохимии зерна НЦЗ им. П.П. Лукьяненко по методикам государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур (Методика государственного сортоиспытания..., 1988). Статистическую обработку полученных результатов выполняли с применением программы AGROS-2.10.

## Результаты

Для определения селекционной ценности транслокации T2DL.2DS-2SS и замещения 5S(5D) от *Ae. speltoides* проведено изучение 14 интрогрессивных линий, полученных с участием трех восприимчивых к листовой и желтой ржавчинам сортов, Аврора, Краснодарская 99 и Ника Кубани (табл. 2).

Для большинства представленных линий характерно сочетание транслокации T2DL.2DS-2SS с хромосомным замещением 5S(5D) (см. табл. 2, рис. 1). Значительная часть линий имеет транслокацию T1BL.1RS (см. табл. 2, рис. 1), полученную от синтетической формы Авродес. У линии 1889п17 выявлена одиночная транслокация T2DL.2DS-2SS (рис. 2, а). Только хромосомное замещение 5S(5D) установлено в линиях 1009п19 и 493п20 (см. рис. 2, б).

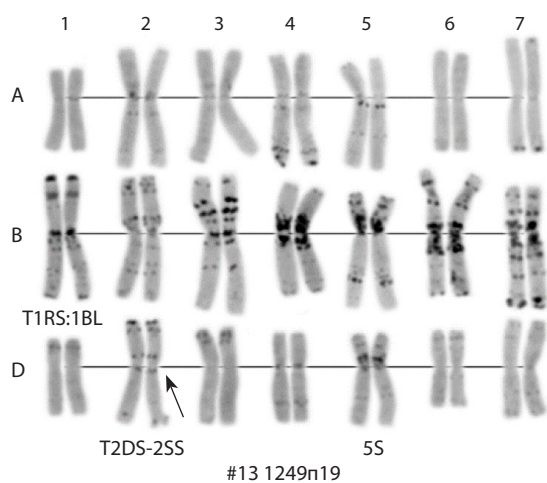
Сорта-реципиенты Аврора, Ника Кубани и Краснодарская 99 восприимчивы к листовой и желтой ржавчинам. Транслокация T2DL.2DS-2SS и замещение 5S(5D) как совместно, так и по отдельности обеспечивают устойчивость линий к этим патогенам (см. табл. 2). Линия 1889п17 с транслокацией T2DL.2DS-2SS проявляет более высокую устойчивость к листовой ржавчине (тип реакции 1, степень поражения 10 %) по сравнению с линиями 1009п19, 95п20 и 493п20 с замещением 5S(5D).

Так как одной из главных задач была передача от синтетической формы Авродес устойчивости к листовой



**Таблица 2.** Характеристика линий *T. aestivum*/Аврорес по наличию интрогрессий и устойчивости к листовой и желтой ржавчинам

Линия	<i>T. aestivum</i> (сорт-реципиент)	Транслокация, замещение	Тип реакции и степень поражения, балл/%	
			Листовая ржавчина	Желтая ржавчина
D37п10	Аврора	T1BL.1RS, T2DL.2DS-2SS, 5S(5D)	01/10	2/10
AA60п9	Аврора	T1BL.1RS, T2DL.2DS-2SS, 5S(5D)	01/10	2/20
1575п17	Аврора	T1BL.1RS, T2DL.2DS-2SS, 5S(5D)	1/10	1/5
3210п15	Краснодарская 99	T2DL.2DS-2SS, 5S(5D)	01/5	1/10
3198п15	Краснодарская 99	T1BL.1RS, T2DL.2DS-2SS, 5S(5D)	01/5	1/10
3193п15	Краснодарская 99	T2A, T1D, T2DL.2DS-2SS, 5S(5D)	01/5	1/5
2900п17	Краснодарская 99	T1BL.1RS, T2DL.2DS-2SS, 5S(5D)	1/10	1/10
2955п17	Краснодарская 99	T1BL.1RS, T2DL.2DS-2SS, 5S(5D)	01/5	1/10
2636п18	Краснодарская 99	T2DL.2DS-2SS, 5S(5D)	1/5	1/5
1009п19	Краснодарская 99	5S(5D)	2/20	2/10
95п20	Краснодарская 99	T1BL.1RS, 5S(5D)	2/20	1/10
1889п17	Ника Кубани	T2DL.2DS-2SS	1/10	1/5
1249п19	Ника Кубани	T1BL.1RS, T2DL.2DS-2SS, 5S(5D)	01/5	1/5
493п20	Ника Кубани	5S(5D)	2/10	1/10
Аврора		T1BL.1RS	4/60	4/60
Краснодарская 99			4/80	3/40
Ника Кубани			3/60	4/60



**Рис. 1.** Дифференциально окрашенный кариотип линии 1249п19.

ржавчине, то проводилась идентификация генов устойчивости к этой болезни с использованием ДНК-маркеров. Из известных идентифицированных генов устойчивости к листовой ржавчине, полученных от *Ae. speltoides*, в Авродес было установлено наличие эффективного гена *Lr35* (Давоян Э.Р. и др., 2012) (рис. 3, а), а также генов *Lr28* и *Lr51* (см. рис. 3, б и в соответственно). Поскольку ранее было установлено отсутствие генов *Lr28* и *Lr35* у линии AA60п9 (Давоян Р.О. и др., 2017), в данной работе эта линия изучалась на наличие только гена *Lr51*. Гены *Lr28*, *Lr35* и *Lr51* в исследуемых линиях не выявлены (см. рис. 3, а, 2–4, 6, 7, 9–17; рис. 3, б, 4–8, 10–15, 17; 3, в, 4–17).

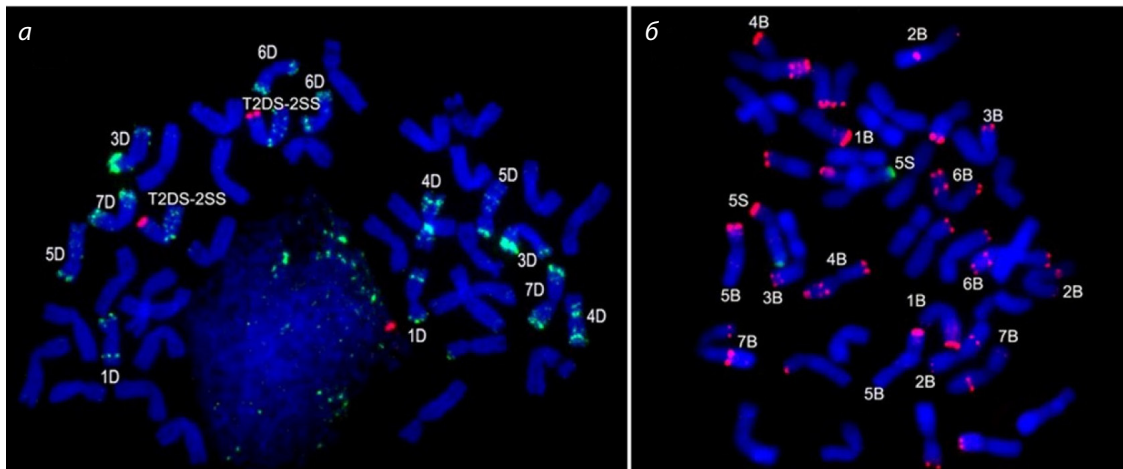
Для выяснения селекционной ценности транслокации T2DL.2DS-2SS и замещения 5S(5D) проведена оценка линий по компонентам продуктивности и технологическим качествам зерна и муки.

Продуктивность определяли по массе 1000 зерен, массе зерна и количества колосьев с 1 м<sup>2</sup> (табл. 3). У линий, полученных с участием в качестве реципиента сорта Аврора, обнаружено достоверное превышение по массе 1000 зерен. Наибольшее значение по этому показателю имела линия 1575п17 (41.7 г). По количеству сформированных колосьев на 1 м<sup>2</sup> существенных различий не установлено. По массе зерна с 1 м<sup>2</sup> линии D37п10 и AA60п9 были на уровне сорта Аврора, а линия 1575п17 достоверно превышала его.

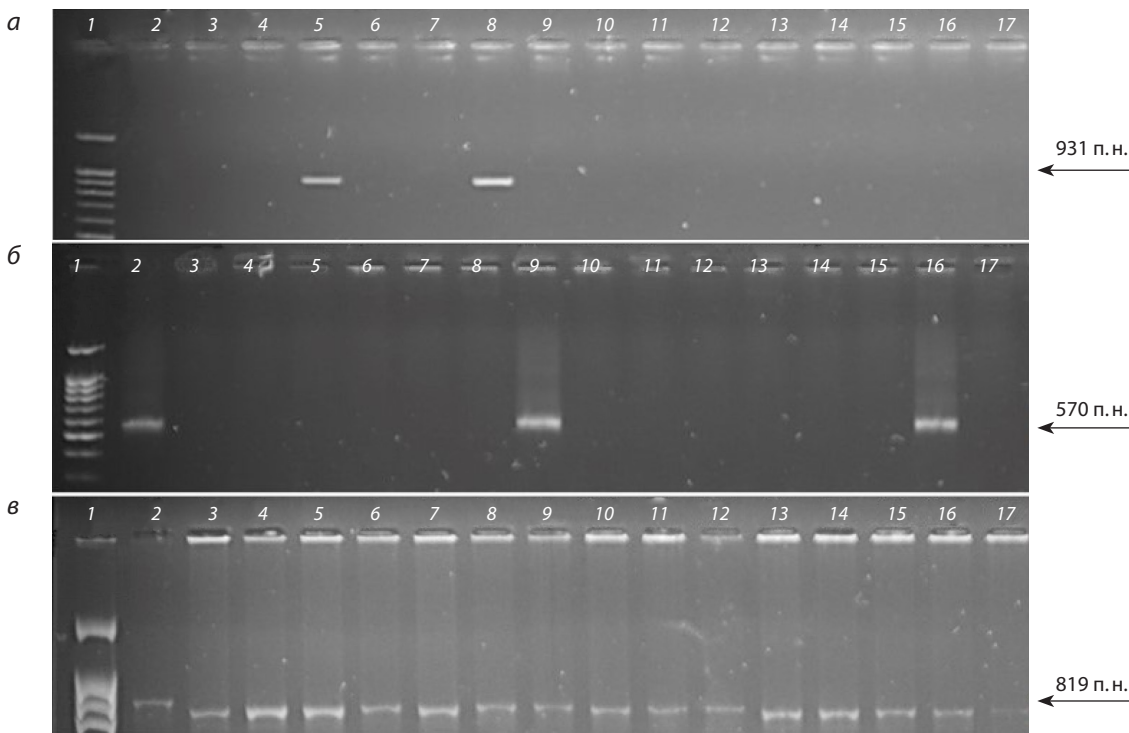
Все линии, полученные с участием сорта Краснодарская 99, достоверно превышали его по массе 1000 зерен. По количеству колосьев с 1 м<sup>2</sup> и массе зерна достоверных различий не выявлено.

Линия 1249п19 достоверно превышает сорт-реципиент Ника Кубани по массе 1000 зерен (40.2 г) и массе зерна с 1 м<sup>2</sup> (570.5 г). Масса 1000 зерен у линий 1889п17 и 493п20 также была выше, чем у сорта Ника Кубани. Различия по количеству колосьев и массе зерна с 1 м<sup>2</sup> были несущественными.

Важными признаками, лимитирующими использование в селекционной практике линий, несущих чужеродный генетический материал, являются технологические показатели зерна. Линии, полученные с участием в качестве реципиента сорта Аврора, имеют близкие с ним показатели содержания белка и клейковины, качества клейковины и общей хлебопекарной оценки (табл. 4).



**Рис. 2.** Результаты FISH на метафазных хромосомах линий: (а) 1889п17 с зондами pAs1 (зеленый) и Spelt1 (красный); (б) 493п20 с зондами pSc119.2 (красный) и Spelt1 (зеленый).



**Рис. 3.** Электрофореграммы продуктов амплификации с использованием праймеров к диагностическим маркерам, сцепленным с генами: а – *Lr35* (1 – маркер длины, 2 – Аврора, 5 – TcLr35, 8 – Авродес, 2–4, 6, 7, 9–17 – интрогрессивные линии); б – *Lr28* (1 – маркер длины, 2 – TcLr28, 9, 16 – Авродес, 3 – Аврора, 4–8, 10–15, 17 – интрогрессивные линии); в – *Lr51* (1 – маркер длины, 2 – Авродес, 3 – Аврора, 4–17 – интрогрессивные линии).

Передача транслокации T2DL.2DS-2SS и хромосомного замещения 5S(5D) сорту Краснодарская 99 способствовала повышению у линий содержания белка и клейковины (см. табл. 4). Превышение содержания белка у линий 3210п15, 2955п17, 2636п18 и 1009п19 составило от 2 до 3 %. В то же время следует отметить, что все линии имеют более высокие показатели ИДК и по качеству клейковины соответствуют второй группе ГОСТ. Линии также уступают сорту Краснодарская 99 по объемному выходу хлеба и общей хлебопекарной оценке. Линии 1249п19 и

493п20 имеют примерно одинаковые показатели с сортом-реципиентом Ника Кубани. Линия 1889п17 по содержанию белка и клейковины превышает показатели сорта-реципиента, но уступает ему по качеству клейковины (см. табл. 4).

### Обсуждение

Передача мягкой пшенице хозяйственно ценных генов из генофонда многочисленных родственных видов и родов остается эффективным направлением для решения актуальных задач селекции.

**Таблица 3.** Компоненты продуктивности интрогрессивных линий *T. aestivum*/Аврорес

Линия	<i>T. aestivum</i> (сорт-реципиент)	Масса 1000 зерен, г	Количество колосьев на 1 м <sup>2</sup> , шт.	Масса зерна с 1 м <sup>2</sup> , г
D37п10	Аврора	40.3	345.2	435.4
AA60п9	Аврора	40.9	331.7	448.2
1575п17	Аврора	41.7	352.3	528.5
3210п15	Краснодарская 99	39.3	437.2	558.3
3198п15	Краснодарская 99	40.2	474.2	570.2
3193п15	Краснодарская 99	41.1	452.9	543.4
2900п17	Краснодарская 99	40.5	450.7	537.9
2955п17	Краснодарская 99	39.7	461.5	542.8
2636п18	Краснодарская 99	40.3	452.7	527.5
1009п19	Краснодарская 99	39.8	462.7	556.2
95п20	Краснодарская 99	41.1	447.4	550.3
1889п17	Ника Кубани	39.4	443.6	540.8
1249п19	Ника Кубани	40.2	410.2	570.5
493п20	Ника Кубани	40.9	425.8	528.4
Аврора		39.4	357.0	410.7
Краснодарская 99		38.1	456.2	531.3
Ника Кубани		38.7	430.4	510.8
HCP <sub>0.5</sub>		0.6	28.6	40.7

Примечание. HCP – наименьшая существенная разница.

**Таблица 4.** Технологические характеристики интрогрессивных линий *T. aestivum*/Аврорес

Линия	Сорт-реципиент	Содержание белка, %	Содержание клейковины, %	Показатель ИДК, ед.	Объемный выход хлеба, мл	Общая оценка, балл
D37п10	Аврора	15.9	24.0	86	680	4.2
AA60п9	Аврора	16.1	29.1	85	700	4.3
1575п17	Аврора	15.0	27.8	90	720	4.1
3210п15	Краснодарская 99	16.4	32.2	80	770	4.2
3198п15	Краснодарская 99	15.2	28.7	86	700	4.3
3193п15	Краснодарская 99	15.6	29.6	85	760	4.5
2900п17	Краснодарская 99	16.3	28.5	85	720	4.3
2955п17	Краснодарская 99	15.9	31.3	93	670	4.3
2636п18	Краснодарская 99	15.8	29.3	82	750	4.5
1009п19	Краснодарская 99	16.1	30.8	91	690	4.1
95п20	Краснодарская 99	15.2	29.1	88	740	4.0
1889п17	Ника Кубани	15.4	31.1	87	780	4.3
1249п19	Ника Кубани	14.0	26.1	72	650	4.2
493п20	Ника Кубани	14.5	27.3	83	765	4.1
Аврора		15.7	29.8	84	700	4.3
Краснодарская 99		13.8	26.0	65	800	4.6
Ника Кубани		14.5	28.7	74	770	4.3
HCP <sub>0.5</sub>		0.3	0.8	1.4	10.2	–

Примечание. ИДК – индекс деформации клейковины.

Использование синтетической формы Авродес, в первую очередь, предполагало передачу от *Ae. speltoides* мягкой пшенице новых генов устойчивости к болезням, и в частности к листовой ржавчине. В настоящее время каталог генных символов пшеницы включает шесть генов устойчивости, переданных от этого вида: *Lr28*, *Lr35*, *Lr36*, *Lr47*, *Lr51* и *Lr66* (McIntosh et al., 2013), локализованных в хромосомах мягкой пшеницы 4A, 2B, 6B, 7A, 1B и 3A соответственно (Friebe et al., 1996). Дополнительно И.Г. Адониной с коллегами (2012) была охарактеризована транслокация T5BS-5BL-5SL от *Ae. speltoides* с эффективным геном, обозначенным как *LrASP5*.

Проведенный нами молекулярно-генетический анализ не выявил в исследованных линиях пшеницы наличия присутствующих у синтетика Авродес эффективных генов устойчивости *Lr28*, *Lr35* и *Lr51*. Мы установили, что транслокация T2DL.2DS-2SS и замещение 5S(5D) от *Ae. speltoides* как совместно, так и по отдельности обеспечивают устойчивость линий пшеницы к листовой ржавчине. При этом линия 1889п17 с транслокацией T2DL.2DS-2SS характеризуется более высокой устойчивостью к листовой ржавчине (тип реакции 1), чем линии только с замещением 5S(5D) (тип реакции 2) (см. табл. 2). Ни один из ранее переданных известных генов устойчивости к листовой ржавчине не имеет локализации на хромосомах 2D и 5D. По данным С.Н. Сибикеева с коллегами (2015), транслокацию 2D/2S несут полученные ими устойчивые к листовой и стеблевой ржавчинам линии Л195 и Л200. Ввиду отсутствия этих линий в нашем распоряжении мы не смогли выяснить вопрос об идентичности данных генов устойчивости к листовой ржавчине с генами, присутствующими в полученных нами линиях.

Следует также отметить устойчивость наших линий с транслокацией T2DL.2DS-2SS и замещением 5S(5D) к желтой ржавчине, являющейся одной из наиболее распространенных болезней пшеницы. Если до конца 1960-х гг. на территории России она не имела экономического значения, то с 1990 г. на юге, прежде всего в Краснодарском крае, отмечается тенденция расширения ареала возбудителя желтой ржавчины, а поражение некоторых сортов озимой пшеницы на естественном инфекционном фоне достигает 90 % (Волкова и др., 2020). При этом в каталоге генных символов не зарегистрирован ни один ген устойчивости к желтой ржавчине, перенесенный в геном пшеницы от *Ae. speltoides* (McIntosh et al., 2013). Таким образом, наши результаты свидетельствуют о возможной передаче мягкой пшенице новых генов устойчивости от данного вида. Для проверки этого предположения необходимы дополнительные исследования.

При передаче чужеродного генетического материала наряду с полезными признаками (устойчивость к болезням, высокое содержание белка и др.) часто наблюдается негативное влияние интрогрессий на продуктивность и технологические характеристики зерна. По этой причине ряд чужеродных транслокаций не нашел широкого применения в селекционной практике. Так, из приведенных выше шести генов устойчивости к листовой ржавчине в практической селекции используются только гены *Lr28* и *Lr47* (Леонова, 2018). В то же время интрогрессивные

линии с генетическим материалом *Ae. speltoides* могут сочетать устойчивость к болезням с продуктивностью и хорошими технологическими качествами зерна и муки (Лапочкина и др., 1996; Сибикеев и др., 2015; Давоян и др., 2017).

Исходя из полученных нами результатов (см. табл. 3), можно заключить, что наличие в линиях транслокации T2DL.2DS-2SS и даже хромосомного замещения 5S(5D) не имеет отрицательного влияния на элементы продуктивности. Две линии, 1575п17 и 1249п19, по массе зерна с 1 м<sup>2</sup> достоверно превышают сорта-реципиенты Аврора и Ника Кубани соответственно. У остальных линий ни по количеству колосьев с 1 м<sup>2</sup>, ни по массе зерна достоверных различий не обнаружено. Установлен положительный эффект транслокации T2DL.2DS-2SS и замещения 5S(5D) на массу 1000 зерен. Практически все изученные нами линии превышали сорта-реципиенты по этому признаку, в то время как, например, в работе Н.В. Петраш с коллегами (2016) было отмечено снижение массы 1000 зерен у всех интрогрессивных линий, независимо от хромосомной локализации (хромосомы 5BL, 6BL и 7D) чужеродного хроматина.

Изучение технологических характеристик зерна и муки также не выявило отрицательного влияния транслокации T2DL.2DS-2SS и замещения 5S(5D) (см. табл. 4). Между сортом Аврора и линиями, полученными на ее основе, не установлено существенных различий по содержанию белка и клейковины, качеству клейковины и общей хлебопекарной оценке. Линии, полученные с участием сорта Краснодарская 99, в сравнении с ним имеют более высокие показатели по содержанию белка и клейковины и, несмотря на незначительное ухудшение качества клейковины (вторая группа ГОСТ), в целом имеют довольно высокую хлебопекарную оценку. Технологические характеристики линий Ника Кубани/Авродес схожи с таковыми для сорта-реципиента Ника Кубани.

Проявление признаков у интрогрессивных линий зависит не только от представленного в них чужеродного генетического материала, но и от генотипической среды сорта-реципиента. В наших исследованиях влияние транслокации T2DL.2DS-2SS и замещения 5S(5D) на селекционно-ценные признаки мягкой пшеницы изучалось на генетическом фоне трех сортов мягкой пшеницы разного происхождения. Линии сочетают устойчивость к болезням с хорошими показателями продуктивности, качества зерна и муки независимо от сорта-реципиента.

## Заключение

Таким образом, можно заключить, что полученные нами новые транслокация T2DL.2DS-2SS и замещение 5S(5D) от *Ae. speltoides* могут способствовать улучшению мягкой пшеницы, в частности по устойчивости к болезням и содержанию белка и клейковины, массе 1000 зерен, и представляют интерес для селекционной практики.

## Список литературы / References

Адолина И.Г., Петраш Н.В., Тимонова Е.М., Христов Ю.А., Салина Е.А. Создание и изучение устойчивых к листовой ржавчине линий мягкой пшеницы с транслокациями от *Aegilops speltoides* Tauch. *Генетика*. 2012;48(4):488-494



- [Adonina I.G., Petrash N.V., Timonova E.M., Khristov Yu.A., Salina E.A. Construction and study of leaf rust resistant common wheat lines with translocations of *Aegilops speltoides* Tausch. Genetic material. *Russ. J. Genet.* 2012;48(4):404-409. DOI 10.1134/S1022795412020020]
- Волкова Г.В., Матвеева И.П., Кудинова О.А. Вирулентность популяции возбудителя желтой ржавчины пшеницы в Северо-Кавказском регионе России. *Микология и фитопатология.* 2020; 54(1):33-41. DOI 10.31857/s0026364820010110  
[Volkova G.V., Matveeva I.P., Kudina O.A. Virulence of the wheat stripe rust pathogen population in the North-Caucasus region of Russia. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology.* 2020;54(1):33-41. DOI 10.31857/s0026364820010110 (in Russian)]
- Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян О.Р., Зинченко А.Н., Давоян Э.Р., Кравченко А.М., Зубанова Ю.С. Синтетические формы как основа для сохранения и использования генофонда диких сородичей мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2012;16(1):44-51  
[Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan O.R., Zinchenko A.N., Davoyan E.R., Kravchenko A.M., Zubanova Y.S. The use of synthetic forms in the preservation and exploitation of the gene pool of wild common wheat relatives. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2012;2(6): 480-485. DOI 10.1134/S2079059712060044]
- Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян Э.Р., Миков Д.С., Бадаева Е.Д., Адонина И.Г., Салина Е.А., Зинченко А.С., Зубанова Ю.С. Использование синтетической формы Авродес для передачи устойчивости к листовой ржавчине от *Aegilops speltoides* мягкой пшенице. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2017;21(6): 663-670. DOI 10.18699/VJ17.284  
[Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan E.R., Mikov D.S., Badaeva E.D., Adonina I.G., Salina E.A., Zinchenko A.N., Zubanova Y.S. Use of a synthetic form Avrodes for transfer of leaf rust resistance from *Aegilops speltoides* to common wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2017; 21(6):663-670. DOI 10.18699/VJ17.284 (in Russian)]
- Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян Э.Р., Зинченко А.Н., Зубанова Ю.С., Бадаева Е.Д. Использование синтетических форм пшеницы для улучшения мягкой пшеницы. *Рисоводство.* 2018; 3(40):47-53  
[Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan E.R., Zinchenko A.N., Zubanova Yu.S., Badaeva E.D. Use of synthetic forms for common wheat improvement. *Risovodstvo = Rice Growing.* 2018;3(40):47-53 (in Russian)]
- Давоян Э.Р., Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян О.Р., Зубанова Ю.С., Зинченко А.Н., Кравченко А.М. Идентификация генов устойчивости к листовой ржавчине в видах *Aegilops* L., синтетических формах и интрогрессивных линиях мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2012;16(1):116-122  
[Davoyan E.R., Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan O.R., Zubanova Yu.S., Kravchenko A.M., Zinchenko A.N. Identification of a leaf-rust resistance gene in species of *Aegilops* L., synthetic forms, and introgression lines of common wheat. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2012;2(4):325-329. DOI 10.1134/S2079059712040041]
- Жиров Е.Г., Терновская Т.К. Геномная инженерия у пшеницы. *Вестн. с.-х. науки.* 1984;10:58-66  
[Zhirov E.G., Ternovskaya T.K. The genome engineering in wheat. *Vestnik Sel'skokhozyaystvennoy Nauki = Herald of Agricultural Science.* 1984;10:58-66 (in Russian)]
- Лапочкина И.Ф., Соломатин Д.А., Сержкина Г.В., Гришина Е.Е., Вишнякова Х.С., Пухальский В.А. Линии мягкой пшеницы с генетическим материалом *Aegilops speltoides* Tausch. *Генетика.* 1996;32(12):1651-1656  
[Lapochkina I.F., Grishina E.E., Vishnyakova Kh.S., Pukhalskiy V.A., Solomatin D.A., Serezhkina G.V. Common wheat lines with genetic material from *Aegilops speltoides* Tausch. *Russ. J. Genet.* 1996;32(12):1438-1442]
- 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 Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2018;22(3):321-328. DOI 10.18699/VJ18.367 (in Russian)]
- Леонова И.Н., Будашкина Е.Б. Изучение признаков продуктивности у интрогрессивных линий *Triticum aestivum/Triticum timopheevii*, устойчивых к грибным болезням. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2016;20(3):311-319. DOI 10.18699/VJ16.120  
[Leonova I.N., Budashkina E.B. The study of agronomical traits determining productivity of *Triticum aestivum/Triticum timopheevii* introgression lines with resistance to fungal diseases. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2016;20(3):311-319. DOI 10.18699/VJ16.120 (in Russian)]
- Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. М., 1988  
[Methodology of State Variety Testing of Agricultural Crops. Moscow, 1988 (in Russian)]
- Петраш Н.В., Леонова И.Н., Адонина И.Г., Салина Е.А. Влияние транслокаций от *Aegilops speltoides* Tausch на устойчивость к грибным болезням и продуктивность мягкой пшеницы. *Генетика.* 2016;52(12):1407-1417. DOI 10.7868/S0016675816120092  
[Petrash N.V., Leonova I.N., Adonina I.G., Salina E.A. Effect of translocations from *Aegilops speltoides* Tausch on resistance to fungal diseases and productivity in common wheat. *Russ. J. Genet.* 2016;52(12):1253-1262. DOI 10.1134/S1022795416120097]
- Сибикеев С.Н., Воронина С.А., Бадаева Е.Д., Дружин А.Е. Изучение линий *Triticum aestivum-Aegilops speltoides*, устойчивых к листовой и стеблевой ржавчинам. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2015;19(2):165-170  
[Sibikeev S.N., Voronina S.A., Badaeva E.D., Druzhin A.E. Study of resistance to leaf and stem rusts in *Triticum aestivum-Aegilops speltoides* lines. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2015;19(2):165-170 (in Russian)]
- Badaeva E.D., Badaev N.S., Gill B.S., Filatenko A.A. Intraspecific karyotype divergence in *Triticum araraticum* (Poaceae). *Plant Syst. Evol.* 1994;192(1):117-145. DOI 10.1007/BF00985912
- Badaeva E.D., Friebe B., Gill B.S. Genome differentiation in *Aegilops*. I. Distribution of highly repetitive DNA sequence on chromosomes of diploid species. *Genome.* 1996;39(2):293-306. DOI 10.1139/g96-040
- Bedbrook J.R., Jones J., O'Dell M., Thompson R.D., Flavell R.B. A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale species*. *Cell.* 1980;19(2):545-560. DOI 10.1016/0092-8674(80)90529-2
- Brevis J.C., Chicaiza O., Khan I.A., Jackson L., Morris C.F., Dubcovsky J. Agronomic and quality evaluation of common wheat nearisogenic lines carrying the leaf rust resistance gene *Lr47*. *Crop Sci.* 2008;48(4):1441-1451. DOI 10.2135/cropsci2007.09.0537
- Cherukuri D.P., Gupta S.K., Charpe A., Koul S., Prabhu K.V., Singh R.B., Haq Q.M.R. Molecular mapping of *Aegilops speltoides* derived leaf rust resistance gene *Lr28* in wheat. *Euphytica.* 2005; 143:19-26. DOI 10.1007/s10681-005-1680-6
- Dvorak J. Genetic variability in *Aegilops speltoides* affecting on homoeologous pairing in wheat. *Can. J. Genet. Cytol.* 1972;14(2):133-141. DOI 10.1139/g72-046
- 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

- Gasner G., Straib U.W. Weitere Untersuchungen über die Spezialisierung sverhältnissesdes Gelbrostes *Puccinia glumarum* (Schm.) Erikss. u. Henn. *Arb. Boil. Reichsanstalt*. 1934;21:121-145
- Helguera M., Vanzetti L., Soria M., Khan I.A., Kolmer J., Dubcovsky J. PCR markers for *Triticum speltoides* leaf rust resistance gene *Lr51* and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines. *Crop Sci*. 2005;45(2):728-734. DOI 10.2135/cropsci2005.0728
- Hoffmann B. Alteration of drought tolerance of winter wheat caused by translocation of rye chromosome segment 1RS. *Cereal Res. Comm*. 2008;36:269-278. DOI 10.1556/CRC.36.2008.2.7
- Kerber E.R., Dyck P.L. Transfer to hexaploid wheat of linked genes for adult-plant leaf rust and seedling stem rust resistance from an amphiploid of *Aegilops speltoides* × *Triticum monococcum*. *Genome*. 1990;33(4):530-537. DOI 10.1139/g90-07
- Knott D.R. Transferring alien genes to wheat. In: Heyne E.G. (Ed.). *Wheat and Wheat Improvement*. American Society of Agronomy. Madison, WI, USA, 1987;462-471
- Mains E.B., Jakson H.S. Physiologic specialization in leaf rust of wheat, *Puccinia triticiana* Erikss. *Phytopatology*. 1926;16:89-120
- Manisterski A., Segal A., Lev A.A., Feeldman M. Evaluation of Israel *Aegilops* and *Agropyron* species for resistance to wheat leaf rust. *Plant Disease*. 1988;72(11):941-944. DOI 10.1094/PD-72-0941
- McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F. *Wheat Rust: an Atlas of Resistance Genes*. Australia: CSIRO Publ., 1995
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubovsky J., Rogers J., Morris C., Appels R., Xia X.C. *Catalogue of Gene Symbols for Wheat*. 2013. Available at: <http://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes>
- Peterson R.F., Cambell A.B., Hannah A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity of leaves and stem 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
- Rayburn A.L., Gill B.S. Isolation of a D-genome specific repeated DNA sequence from *Aegilops squarrosa*. *Plant Mol. Biol. Rep*. 1986;4:102-109. DOI 10.1007/BF02732107
- Salina E., Adonina I., Vatolina T., Kurata N. A comparative analysis of the composition and organization of two subtelomeric repeat families in *Aegilops speltoides* Tausch. and related species. *Genetics*. 2004;122(3):227-237. DOI 10.1007/s10709-004-5602-7
- Salina E.A., Lim Y.K., Badaeva E.D., Shcherban A.B., Adonina I.G., Amosova A.V., Samatadze T.E., Vatolina T.Yu., Zoshchuk S.A., Leitch A.A. Phylogenetic reconstruction of *Aegilops* section *Sitopsis* and the evolution of tandem repeats in the diploids and derived wheat polyploids. *Genome*. 2006;49(8):1023-1035. DOI 10.1139/G06-050
- Schneider A., Linc G., Molnar-Lang M. Fluorescence *in situ* hybridization polymorphism using two repetitive DNA clones in different cultivars of wheat. *Plant Breed*. 2003;122(5):396-400. DOI 10.1046/j.1439-0523.2003.00891
- Song W., Xie H., Liu Q., Xie C., Ni Z., Yang T., Sun Q., Liu Z. Molecular identification of *Pm12* carrying introgression lines in wheat using genomic and EST-SSR markers. *Euphytica*. 2007;158:95-102. DOI 10.1007/s10681-007-9432-4

---

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

Поступила в редакцию 04.08.2023. После доработки 02.04.2024. Принята к публикации 02.04.2024.

DOI 10.18699/vjgb-24-58

## Identification of quantitative trait loci of pod dehiscence in a collection of soybean grown in the southeast of Kazakhstan

B.N. Doszhanova <sup>1,2</sup>, A.K. Zatybekov <sup>1</sup>, S.V. Didorenko <sup>3</sup>, T. Suzuki <sup>4</sup>, Y. Yamashita <sup>4</sup>, Y. Turuspekov <sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup> Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan

<sup>2</sup> Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

<sup>3</sup> Kazakh Research Institute of Agriculture and Plant Growing, Almalyk, Almaty region, Kazakhstan

<sup>4</sup> Hokkaido Research Organization, Sapporo, Japan

 yerlant@yahoo.com

**Abstract.** Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] is one of the important crops that are constantly increasing their cultivation area in Kazakhstan. It is particularly significant in the southeastern regions of the country, which are currently predominant areas for cultivating this crop. One negative trait reducing yield in these dry areas is pod dehiscence (PD). Therefore, it is essential to understand the genetic control of PD to breed new cultivars with high yield potential. In this study, we evaluated 273 soybean accessions from different regions of the world for PD resistance in the conditions of southeastern regions of Kazakhstan in 2019 and 2021. The field data for PD suggested that 12 accessions were susceptible to PD in both studied years, and 32 accessions, in one of the two studied years. The genotyping of the collection using a DNA marker for the *Pdh1* gene, a major gene for PD, revealed that 244 accessions had the homozygous *R* (resistant) allele, 14 had the homozygous *S* (susceptible) allele, and 15 accessions showed heterozygosity. To identify additional quantitative trait loci (QTLs), we applied an association mapping study using a 6K SNP Illumina iSelect array. The results suggested that in addition to major QTL on chromosome 16, linked to the physical location of *Pdh1*, two minor QTLs were identified on chromosomes 10 and 13. Both minor QTLs for PD were associated with calmodulin-binding protein, which presumably plays an important role in regulating PD in dry areas. Thus, the current study provided additional insight into PD regulation in soybean. The identified QTLs for PD can be efficiently employed in breeding for high-yield soybean cultivars.

**Key words:** soybean; pod dehiscence; seed yield; genome-wide association study; quantitative trait locus.

**For citation:** Doszhanova B.N., Zatybekov A.K., Didorenko S.V., Suzuki T., Yamashita Y., Turuspekov Y. Identification of quantitative trait loci of pod dehiscence in a collection of soybean grown in the southeast of Kazakhstan. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(5):515-522. DOI 10.18699/vjgb-24-58

**Funding.** The research was supported using the grant AP13068118 provided by the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan.

## Идентификация количественных локусов признака растрескивания бобов в коллекции сои, выращенной на юго-востоке Казахстана

Б.Н. Досжанова <sup>1,2</sup>, А.К. Затыбеков <sup>1</sup>, С.В. Дидоренко <sup>3</sup>, Т. Сузуки <sup>4</sup>, Й. Ямашита <sup>4</sup>, Е.К. Туруспеков <sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup> Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан

<sup>2</sup> Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

<sup>3</sup> Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства, пос. Алмалыбак, Алматинская область, Казахстан

<sup>4</sup> Научно-исследовательская организация Хоккайдо, Саппоро, Япония

 yerlant@yahoo.com

**Аннотация.** Соя [*Glycine max* (L.) Merr.] – одна из важнейших сельскохозяйственных культур, площади которой в Казахстане постоянно увеличиваются. Особенно эта культура значима в южных и юго-восточных регионах страны, которые являются основными регионами выращивания сои. К негативным факторам, влияющим на урожайность сои в засушливых районах, относится растрескивание стручков. Поэтому понимание генетического механизма растрескиваемости стручков сои важно для выведения новых высокоурожайных сортов. В настоящем исследовании мы изучили 273 сорта и линии сои из разных регионов мира на устойчивость к растрескиваемости в условиях Южного Казахстана в 2019 и 2021 гг. Наблюдения за признаком «растрескиваемость стручков сои» в полевых условиях Алматинской области выявили, что в 2019 г. растрескиванию были подвержены 23 сорта, в 2021 г. – 21 сорт. Двенадцать сортов сои повторно подвергались растрескиванию в оба года эксперимента. Согласно средним данным испытаний, всего подвержены растрескиванию 32 сорта сои. При генотипировании коллекции с использованием ДНК-маркера гена *Pdh1*, основного гена растрескиваемости стручков сои, у 244 образцов был выявлен устойчивый аллель, у 14 образцов – восприимчивый, а 15 образцов обладали гетерозиготностью. Для идентифи-

кации дополнительных локусов количественных признаков (quantitative trait locus, QTL) мы применили полногеномный анализ с использованием 6 тысяч SNP-маркеров на основе чипа 6K SNP Illumina iSelect. В дополнение к основному QTL на хромосоме 16, связанному с физическим расположением гена *Pdh1*, были идентифицированы два минорных QTL на хромосомах 10 и 13. Оба минорных локуса ассоциированы с растрескиванием стручков сои и связаны с кальмодулин-связывающим белком, который, вероятно, играет важную роль в регулировании растрескиваемости стручков сои в засушливых регионах. Таким образом, нами получена дополнительная информация о регуляции растрескиваемости в сое. Идентифицированные QTL для признака «растрескиваемость стручков сои» могут быть эффективно использованы при селекции высокоурожайных сортов сои.

**Ключевые слова:** соя; растрескивание бобов; урожай зерна; полногеномный анализ; локусы количественных признаков; QTL.

## Introduction

Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] is a major crop among oilseeds worldwide and a global source of edible protein and oil, providing approximately 60 and 28 % of the world supply, respectively (Vollmann et al., 2000; Zhou et al., 2020). According to the USDA, Brazil, the United States of America, and Argentina are the largest soybean production countries, while Kazakhstan is on the list of the top forty producers (<https://ipad.fas.usda.gov>). Kazakhstan is one of the largest agro-industrial countries in Central Asia and is interested in increasing soybean production areas (Abugalieva et al., 2016; Didorenko et al., 2016; Zatybekov et al., 2017). Therefore, developing new competitive cultivars for new cultivation areas is a priority for the local breeding community.

One of the limiting factors for the increase in soybean productivity, particularly in southern regions, is pod dehiscence (PD), which leads to a substantial yield loss (Zhang Q. et al., 2018). For wild plants, PD is an important mechanism for spreading progenies (Benvenuti, 2007; Fuller, 2007), but for cultivated plants, it is an unfavorable agronomic trait because mature pods open to release seeds before harvesting (Kang et al., 2009; Zhang L., Boahen, 2010). PD was nearly eliminated during soybean domestication and breeding (Liu et al., 2007; Krisnawati, Adie, 2017). Nevertheless, the yield losses due to PD today may range from 34 to 99 % depending on genetic background, environmental factors, pod morphology and anatomy, and management (Romkaew, Umezaki, 2006; Bhor et al., 2014; Parker et al., 2021).

Pod dehiscence is a highly heritable and complex trait; it was shown that its broad sense heritability may range from 90 to 98 % in different populations (Tsuchiya, 1987; Bailey et al., 1997; Kang et al., 2009). Previously, two genes, *Pdh1* and *SHATI-5*, were identified and mapped on chromosome 16 (Funatsuki et al., 2008, 2014; Dong et al., 2014). The gene *pdh1* was identified in cultivated soybeans by Funatsuki and co-authors in 2014 (Funatsuki et al., 2014). The dominant *Pdh1* encodes a dirigent family protein in soybean and is highly expressed in the pod endocarp layer, increasing dehiscing forces. The recessive *pdh1* in dehiscence-resistant types includes a premature stop codon, which blocks proper protein synthesis (Funatsuki et al., 2014). The effect of *pdh1* on pod dehiscence is generally larger among the other genes that had important value in worldwide soybean cultivation (Funatsuki et al., 2014; Hu et al., 2019; Zhang J., Singh, 2020). *SHATI-5* gene activates secondary wall synthesis and stimulates the dehiscence site's thickening in pods. The domestication process resulted in extra *SHATI-5* expression compared to the wild soybean allele (Dong et al., 2014). Previous research suggested that all domesticated soybeans carry *SHATI-5* haplotypes

derived from a haplotype that differs from wild soybeans (Funatsuki et al., 2014; Sedivy et al., 2017).

Recently, a genome-wide association study (GWAS) described another dehiscence-associated candidate gene, Glyma09g06290 (Hu et al., 2019). This gene is highly expressed in developing pods; however, the biological functions of this gene should be further investigated (Hu et al., 2019). Later, another GWAS showed that the *NSTIA* gene (Glyma.07G050600) has a potential role in soybean pod dehiscence (Zhang J., Singh, 2020). *NSTIA* codes a NAC family transcription factor and a paralog of *SHATI-5* (NAC are NAM, ATAF1/2, and CUC2 proteins, the largest families of transcription factors in plants: NAM – no apical meristem proteins, ATAF1/2 – Arabidopsis transcription activation factor, CUC2 – cup-shaped cotyledon; NST1-NAC secondary thickening1) (Zhang J., Singh, 2020). The authors identified an indel in its coding sequence, leading to a premature stop codon. Epistatic analyses showed that *NSTIA* works with *Pdh1* to provide durable resistance to pod dehiscence (Zhang J., Singh, 2020; Parker et al., 2021).

Apart from genes, several QTLs were repeatedly identified throughout the soybean genome on different chromosomes. To date, several QTLs for PD have been identified on almost all chromosomes in different soybean populations (Bailey et al., 1997; Liu et al., 2007; Kang et al., 2009; Yamada et al., 2009; Han et al., 2019; Hu et al., 2019). The identified QTL on chromosome 16 was located near the major gene *pdh1* and had a high value of the coefficient of determination (Seo et al., 2020; Jia et al., 2022).

Most new QTLs were identified using GWAS, a powerful tool for detecting natural variation involving the regulation of complex traits based on genotype-phenotype association (Rafalski, 2010; Huang, Han, 2014). Although many QTLs for PD in soybeans were discovered, some can be unstable in different environments and may vary in diverse genetic backgrounds (Hu et al., 2019; Seo et al., 2020; Jia et al., 2022). Hence, additional studies for searching QTLs for PD are important for breeding practices in new soybean environments. Therefore, this study aimed to identify QTLs for PD in the southeast region of Kazakhstan using a diverse world soybean collection.

## Materials and methods

**Field evaluation of the collection.** The soybean collection consisted of 273 cultivars and lines from Eastern and Western European countries, North America, and East and Central Asia (Supplementary Material 1)<sup>1</sup> (Zatybekov et al., 2017, 2018).

<sup>1</sup> Supplementary Materials 1–5 are available at: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx19.pdf>



The collection was grown in 2019 and 2021 at the experimental stations of Kazakh Research Institute of Agriculture and Plant Growing (KRIAPG, Almaty region, Kazakhstan) located at an altitude of 740 m above sea level, 43°15' N, 76°54' W (Doszhanova et al., 2019). This site is characterized by continental climatic conditions: mild and cool winters, cool spring, hot and dry summers, and warm and dry fall. The meteorological data registered for the experiments are provided in Supplementary Material 2. The collection was planted in four rows per plot, 25 cm plant spacing, 50 cm row spacing, and 1 m row length without soil fertilizers.

The yield component traits screened in soybean accessions are the number of fruiting nodes (NFN, pcs), the number of seeds per plant (NSP, pcs), yield per plant (YP, g), thousand seed weight (TSW, g). The PD data was collected by visually estimating the percentage of pods at the R8 stage in a plot that had dehisced at the full maturity stage on a scale of 1–5, where 1 ≤ 1–20 %, 2 ≤ 21–40 %, 3 ≤ 41–60 %, 4 ≤ 61–80 % and 5 ≤ 81–100 % (Supplementary Material 1). Correlation analysis was conducted using RStudio software (Allaire, 2011).

**DNA extraction and PCR procedure.** DNA was extracted from young leaves by a modified CTAB method (Suzuki et al., 2012). Amplification of DNA was performed using an allele-specific PCR method with four primers for the SNP marker of the *Pdh1* gene associated with pod dehiscence in soybean (Funatsuki et al., 2014). PCR reaction of 10 µl of the solution containing the DNA template (50 ng/µl), AmpliTaqGold MasterMix (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific), two pairs of primers (forward and reverse outer primers, forward and reverse inner primers), and M13 primer, labeled with fluorescent (FAM, NED, VIC and PET, Applied Biosystems). PCR amplification used an initial 95 °C for 7 min; 35 cycles of 94 °C for 30 sec, 56 °C for 30 sec, and 72 °C for 1 min, and a final 72 °C extension for 7 min. PCR products were analyzed on an ABI Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) with GeneMapper software as described previously (Suzuki et al., 2012).

**Linkage disequilibrium, population structure, and genome-wide association study.** For GWAS, the genomic DNA of all samples in the collection was genotyped using the 6K SNP Illumina iSelect array (Song et al., 2013) at the Trait Genetics Company (TraitGenetics GmbH Gatersleben, Germany). SNP genotype analysis was carried out using Illumina Genome Studio software (GS V2011.1). The quality control of genotyped data was performed by filtering SNPs with call rate ≥90 % and minor allele frequency (MAF) ≥5 %. Accessions with missing data being greater than 10 % were removed. SNP loci with more than 10 % heterozygous calls were also removed (Bradbury et al., 2007). Pairwise linkage disequilibrium (LD) between the markers based on their correlations (R<sup>2</sup>) was calculated using TASSEL. R statistical software was used to plot the correlation between pairwise R<sup>2</sup> and the genetic distance, LD decay plot (www.R-project.org).

The population structure (Q) analysis was performed using STRUCTURE software version 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). The optimal number of clusters (K) was chosen based on the ΔK as described by (Evanno et al., 2005). The obtained values were then transformed into a population structure (Q) matrix. The kinship matrix (K) was generated by TASSEL software V5.0 (Bradbury et al., 2007).

GWAS was conducted based on the Mixed Linear Model (Q + K) using TASSEL software V5.0 (Bradbury et al., 2007). The statistical significance thresholds, Bonferroni correction, and alternative method False Discovery Rate (FDR) were used to distinguish true positives from false positives and false negatives. The significance level of 5 % after Bonferroni multiple test correction was used to identify significant associations (Buckler et al., 2011). The Benjamini–Hochberg procedure was calculated to control the FDR threshold at 5 % (Benjamini, Hochberg, 1995). The SoyBase database (www.soybase.org) was used to search genes for identified marker-trait associations.

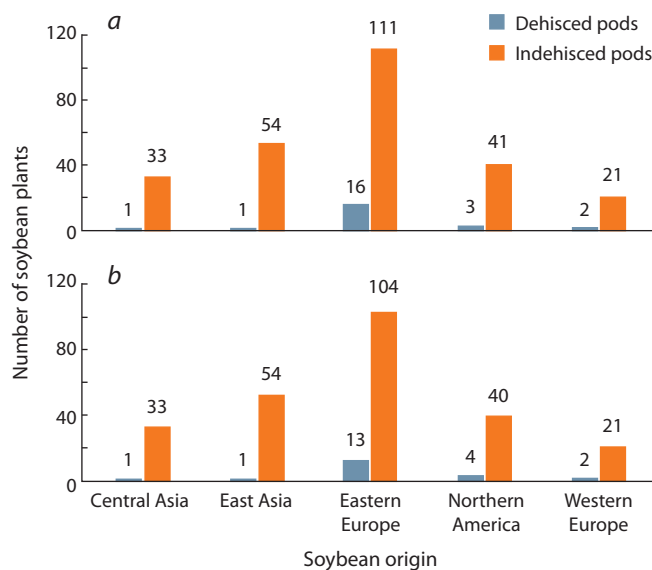
## Results

### Field experiments and traits evaluation

Observing PD in the field conditions of the Almaty region showed that 23 accessions in 2019 and 21 accessions in 2021 dehisced their pods in the field conditions (Fig. 1), and 12 accessions repeatedly fully or almost fully dehisced their pods with grade 4 or 5 in two years of experiments in the Almaty region (Supplementary Material 1).

The results of two years of experiments showed that the vast majority of the soybean collection was resistant to PD in the Almaty region conditions, but 32 accessions were found to be susceptible to PD in one of the two years of study. After harvesting, the soybean collection was analyzed by yield components, such as NSP, NFN, YP, and TSW. The soybean collection studied in the Almaty region was more productive in 2021 than in 2019. The average values of two years for NFN, NSP, YP, and TSW were 15.01 nodes, 37.88 seeds, 9.62 g, and 149.12 g, respectively. The ranges of soybean yield components in the Almaty region in two experimental years and average data are shown in Table 1.

Pearson correlation analysis suggested that the average data of the PD trait in the field conditions of the Almaty region were negatively and significantly associated with all yield com-

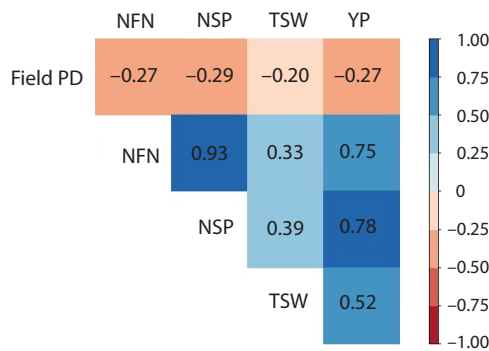


**Fig. 1.** The field screening of the world soybean collection by the pod dehiscence trait in 2019 (a) and 2021 (b) years of experiments.

**Table 1.** The variability ranges of yield component traits in 2019, 2021, and the average of two years

Year	Ranges	NFN	NSP	YP	TSW
2019	Max	31.3	87.7	39.3	310.9
	Min	4.9	8.4	1.5	18.9
	Mean ± SE	14.38 ± 0.33	36.28 ± 0.95	10.38 ± 0.34	124.28 ± 3.38
2021	Max	52	126	55.6	276
	Min	3.7	6.3	0.3	118
	Mean ± SE	15.63 ± 0.44	39.43 ± 1.25	8.85 ± 0.41	173.18 ± 1.51
Average	Max	34.05	81.85	31.5	228.4
	Min	5.2	10.5	1.95	97.05
	Mean ± SE	15.01 ± 0.35	37.88 ± 1.01	9.62 ± 0.32	149.12 ± 1.63

Note. NFN – number of fruiting nodes (pcs), NSP – number of seeds per plant (pcs), YP – yield per plant (g), TSW – thousand seed weight (g), SE – standard error.



**Fig. 2.** Correlation analysis of the pod dehiscence trait in the field conditions and yield components.

Field PD – pod dehiscence in the field conditions.

ponents, NFN, NSP, YP, and TSW, with coefficients of correlation  $-0.27$ ,  $-0.29$ ,  $-0.2$ , and  $-0.27$  respectively ( $p < 0.01$ , RStudio). In their turn, NSP, YP, and TSW had a significant and positive correlation with each other ( $p < 0.01$ ) (Fig. 2).

### Genotyping of soybean collection

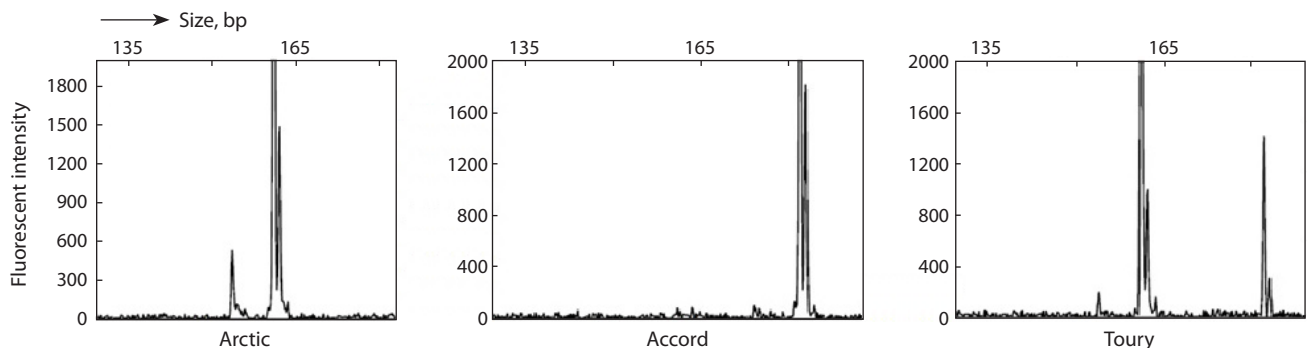
The soybean collection consisted of 273 samples and was genotyped using four primers for the SNP marker of the *Pdh1* gene, which is associated with PD. The SNP analysis of soy-

bean accessions identified three alleles: *S* – pod dehiscence susceptible, *R* – pod dehiscence resistant, and *H* – heterozygous (Fig. 3). A *t*-test with significance confirmed the difference among groups of three alleles at  $p < 0.001$ .

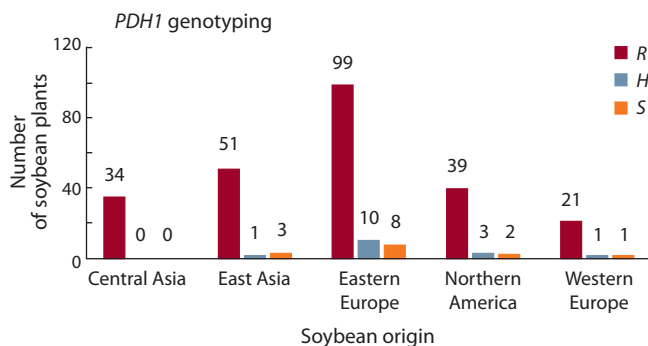
The results of *Pdh1* genotyping using an allele-specific SNP marker showed that 244 out of 273 accessions were with the homozygous *R* (resistant) allele, 14 had the homozygous *S* (susceptible) allele, and 15 samples were heterozygotes (Supplementary Material 1). Figure 4 illustrates the distribution of alleles of different origins in the soybean collection.

Most of the accessions carrying the susceptible *S* alleles in homozygous or heterozygous genotypes were from Eastern Europe (10 and 8 accessions, respectively). In accessions from East Asia, three cultivars were with the homozygote *S* allele (‘Kheikhek14’, ‘Dong doe 641’ and ‘Ken feng 20’, China), and one was heterozygous (‘Kharbin’, China). In accessions from Northern America, two cultivars were with the homozygous *S* allele (‘KG 20’, Canada and ‘Carola’, USA), and three were heterozygous genotypes (‘Maple Arrow’ and ‘GEO’, Canada and ‘Lincoln’, USA). In accessions from Western Europe, one cultivar carried the *S* allele (‘Sepia’, France), and one was heterozygous (‘Fiskeby5’, Sweden). All Central Asian accessions carried the homozygous *R* allele of the *pdh1* (Fig. 4).

The results of field screening for PD of the average data for the two years of experiments and genotyping data by



**Fig. 3.** Amplification products of specific SNP marker for the *Pdh1* gene in Arctic, Accord, and Toury soybean varieties with *S* and *R* alleles and heterozygote (*H*), respectively, detected by Genetic Analyzer 3500.



**Fig. 4.** The genotyping results of the soybean collection studied using an allele-specific SNP marker of the *Pdh1* gene.

S – homozygous genotypes with the susceptible allele, R – homozygous genotypes with the resistant allele, H – heterozygotes.

DNA marker showed a moderate correlation link ( $p < 0.01$ ). Comparative assessment of PD in field studies and *Pdh1* genotyping indicated that in 14 accessions with the homozygous S allele, only seven cultivars were susceptible to PD in both years, and ten samples, in one of the two studies years (Supplementary Material 1). These seven cultivars were from Eastern Europe (6 accessions) and Northern America (1 accession). In 244 identified samples with the homozygous R allele, four accessions were susceptible to PD in both years, and 19 accessions, in at least one out of two studied years (Supplementary Material 1). These four cultivars were from Eastern Europe (3) and North America (1).

#### Linkage disequilibrium, population structure, and genome-wide association study

After filtering the genotyping data by MAFs, missing data in individuals, and heterozygous calls, a total of 4,651 SNPs remained. The average density of the SNP map was one marker per 246 Kb. Linkage disequilibrium (LD) decayed at 3.3 Mb for the whole genome at R<sup>2</sup> of 0.1 (Fig. 5a). The population structure (Q) based on the results of STRUCTURE and STRUCTURE Harvester analyses showed three subpopula-

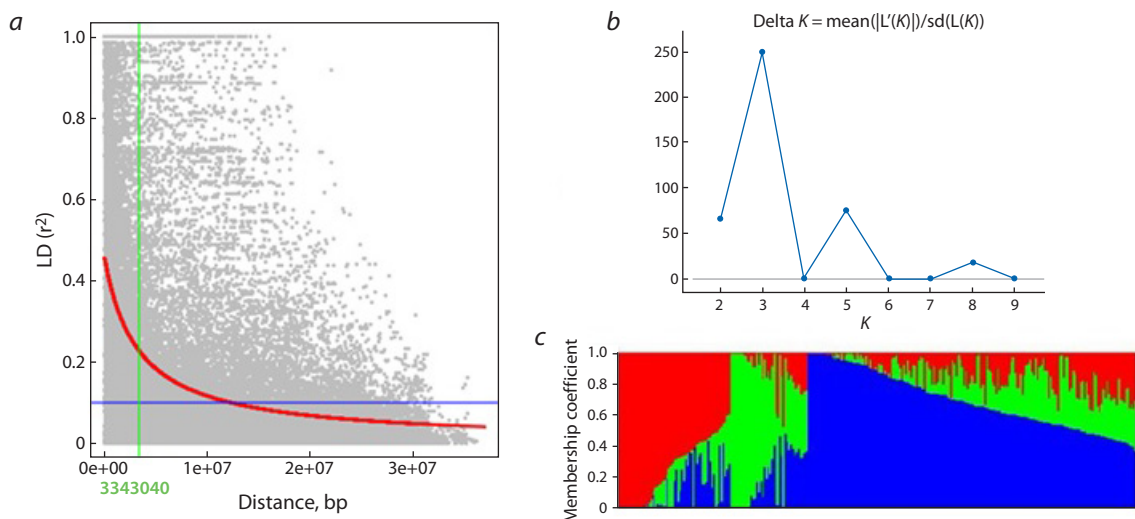
tions (Fig. 5c). The Q matrix was developed using  $K = 3$  as the optimum (Fig. 5b).

The Manhattan plot with SNP markers associated with PD and the QQ plot are illustrated in Figure 6, the Manhattan plot and the QQ plot of each year of the experiment are illustrated in Supplementary Materials 3, 4. The threshold is  $1.0 \times 10^{-5}$  at a significance level of 5 % after Bonferroni multiple test correction. A significance threshold of 5 % FDR was used to identify putative SNP associations. If two SNPs were closer than the genome average LD decay value of 3.3 Mbp, they were considered to belong to the same locus.

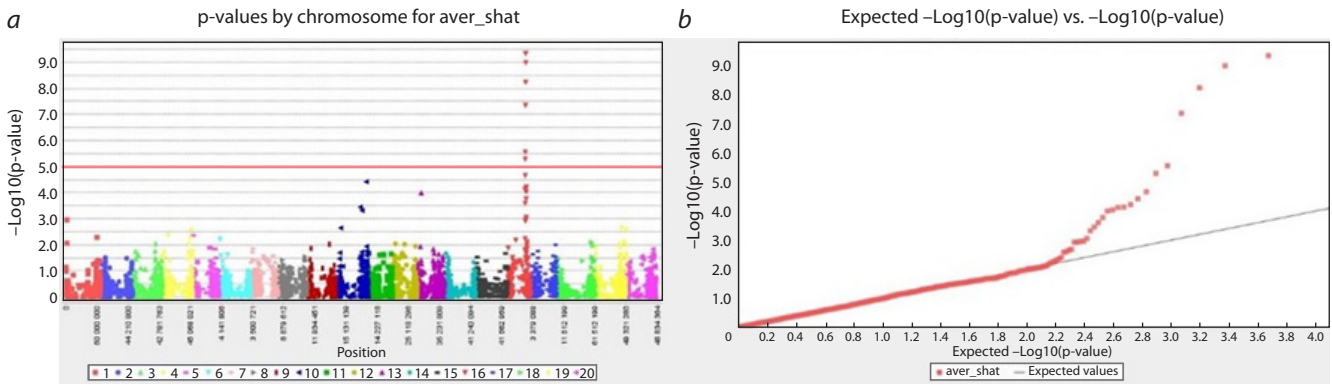
The GWAS with significance thresholds of FDR and Bonferroni correction allowed the identification of three QTLs for PD on chromosomes 10, 13, and 16 (Fig. 6, Table 2, Supplementary Materials 3–5). For each identified QTL, one most significant SNP marker with the lowest  $p$ -value was selected: Gm10\_47774781 on chromosome 10, Gm13\_6207590 on chromosome 13, and Gm16\_29681065 on chromosome 16. The information about the marker positions on the chromosomes,  $p$ -values, effects, and phenotypic variations for alleles is shown in Table 2.

Gm16\_29681065 was located in the vicinity of *Pdh1* on chromosome 16 (Table 2). Other two minor QTLs were identified on chromosomes 10 and 13. Identified SNPs with the most significant  $p$ -values of Gm16\_29681065, Gm10\_47774781, and Gm13\_6207590 were designated as *qPD16-1*, *qPD10-1*, and *qPD13-1*.

The influence of the allelic status of the most significant SNPs of three stable QTLs for the PD phenotype is shown in Table 3. The results in Table 3 indicate that the combination of effective SNP alleles (TTG) in three QTLs resulted in PD resistance with a value of 0.1. In contrast, the combination of alternative alleles (GCA) showed susceptibility to PD with a value of 3.9. Interestingly, two plants with the TCA combination (a resistant allele for Gm16\_29681065 and two susceptible alleles for Gm10\_47774781 and Gm13\_6207590) showed PD phenotype with the value of 4.5 (Table 3), suggesting that the effective allele in Gm16\_29681065 alone is not sufficient for PD resistance.



**Fig. 5.** a, LD decay plot of 4,651 SNPs through the whole soybean genome; b, Delta K for differing numbers of subpopulations; c, bar plot of estimated population structure of 273 soybean genotypes on  $K = 3$ .



**Fig. 6.** Manhattan (a) and QQ plots (b) for the pod dehiscence trait in the world soybean collection for average data of 2019 and 2021 in the Almaty region.

**Table 2.** The list of identified significant SNP markers associated with PD for 2019 and 2021 and the average data for the two years of the experiment using the genome-wide association study

Parameter	Gm16_29681065, <i>qPD16-1</i>	Gm10_47774781, <i>qPD10-1</i>	Gm13_6207590, <i>qPD13-1</i>
Chromosome	16	10	13
Position, bp	29681065	47774781	6207590
Allele	G	C	A
2019			
<i>p</i> -value/FDR	1.7576E-10/8,17E-07	0.00203/4,50E-01	0.00391/6,99E-01
Effect*	1.05999	0.36111	0.29456
R2**	0.1645	0.03655	0.03527
2021			
<i>p</i> -value/FDR	1.5159E-6/2,35E-03	2.1195E-5/1,97E-02	5.89E-4/1,61E-01
Allele effect	0.38581	0.24986	0.17689
R2	0.08677	0.06757	0.04363
Average			
<i>p</i> -value/FDR	4.7063E-10/2,19E-06	3.8127E-5/2,22E-02	1.0165E-4/3,64E-02
Allele effect	0.45428	0.20783	0.1743
R2	0.15097	0.06413	0.05917
Candidate loci	<i>Pdh1</i> /Glyma16g25580 (Gm16:29601346...29601897) (Funatsuki et al., 2014)	Glyma10g40330 (Calmodulin-binding protein, start 47773565–stop 47775599) (Schmutz et al., 2010)	Near Glyma13g05890 (Calmodulin-binding protein, start 6199393–stop 6203098) (Schmutz et al., 2010)

\* Absolute effect; \*\* R2 – marker phenotypic variation.

**Table 3.** Mean of PD scores for allelic combinations of SNP markers in three identified quantitative trait loci of PD in field conditions

Gm16_29681065	Gm10_47774781	Gm13_6207590	Number of lines	Mean PD score
T	T	G	192	0.1
T	T	A	29	0.3
T	C	G	19	0.4
T	C	A	2	4.5
G	T	G	9	1.5
G	C	G	4	4.5
G	C	A	4	3.9



## Discussion

The assessment of the collection in the field conditions of the southeast of Kazakhstan has confirmed a high negative impact of PD on yield performance (Fig. 2). The field evaluation of average data revealed that 32 genotypes were susceptible to PD in at least one of the two studied years (Fig. 1). The phenotypic results for PD over two years of study were stable and largely coincided with genotypic results using an allele-specific SNP marker of *Pdh1*, confirming the fact that *Pdh1* played a critical role in soybean expansion (Funatsuki et al., 2014). Nevertheless, 19 out of 244 accessions with homozygous *R* alleles showed susceptibility to PD in the field conditions of southeast Kazakhstan, suggesting that more genes are involved in regulating PD. Therefore, GWAS was applied to identify additional genetic factors that can potentially be involved in the genetic control of PD. The application of GWAS suggested that three stable QTLs for PD were significant in this study.

The three identified QTLs (*qPD10-1*, *qPD13-1*, and *qPD16-1*) were located on chromosomes 10, 13, and 16, respectively (Table 2). As QTL *qPD16-1* was highly significant both in 2019 and 2021, it can be considered a major genetic factor showing a remarkable effect on PD. The location of QTN *qPD16-1* coincided with the genetic position of *Pdh1* (Funatsuki et al., 2014) (Table 2). The literature survey suggests that *Pdh1* (Gm16:29601346–Gm16:29601897) encodes a dirigent family protein known to be involved in lignification, which increases dehiscing forces by promoting torsion of dried pod walls (Funatsuki et al., 2014). The loss-of-function *pdh1* gene has been widely used in soybean breeding as a pod dehiscence resistance gene (Funatsuki et al., 2014).

The other significant SNP for PD identified on chromosome 10, *qPD10-1*, was located in Glyma10g40330 (Schmutz et al., 2010), the gene that is responsible for the expression of plant calmodulin-binding protein (soybase.org). Previously, another QTL for PD was identified on chromosome 10, which was located within 10 cM of Satt243 (Gm10:46088332–46088382, soybase.org) (Kang et al., 2009), suggesting a strong genetic linkage between QTNs in two association findings. Interestingly, the significant QTL identified on chromosome 13 was located in the vicinity of Glyma13g05890, which is also expressing plant calmodulin-binding protein (Schmutz et al., 2010; soybase.org).

The results of influences of all three identified genetic factors on PD performance suggest that although the role of *qPD16-1* is remarkable, the allelic statuses of Gm10\_47774781 and Gm13\_6207590 are also essential (Table 3). Hence, it can be hypothesized that calmodulin-binding protein is part of the gene network controlling PD. Calmodulin (CAM) is a Ca<sup>2+</sup> sensor known to regulate the activity of many eucaryote proteins and plays an important role in plant growth and development (Yu et al., 2021). An increasing number of studies have illustrated that plant calcium signals play a vital role in life processes by acting as a messenger transducer in the complicated signal network to regulate plant growth and development and the response and adaptation to environmental stresses (Hong-Bo et al., 2008). Hypothetically, drought or high temperature as environmental stress can induce responses by activating calmodulin-binding protein, leading to a change in the structure of soybean pods. In general, the results of the soybean PD study in conditions of southeast Kazakhstan sug-

gest that it is controlled by one major and two minor QTLs, which is congruent with results of previous reports, where one major and few minor QTLs were revealed (Tsuchiya, 1987; Bailey et al., 1997; Ogutcen et al., 2018; Seo et al., 2020). Nevertheless, *qPD13-1*, identified in this work, has not been reported in any previous PD studies, and, therefore, it can be considered a putatively novel genetic factor for the regulation of PD in soybeans.

## Conclusion

The evaluation of the collection consisting of 273 soybean accessions with different origins for PD has confirmed a strong influence of the *Pdh1* gene on trait performance and a negative impact on yield and yield components over two studied seasons in southeast Kazakhstan. The application of GWAS has allowed the identification of one major (*qPD16-1*) and two minor (*qPD10-1* and *qPD13-1*) QTLs for PD. The location of the major QTL has coincided with the physical position of the *Pdh1*. Two minor QTLs have been associated with the genes for calmodulin-binding protein on chromosomes 10 and 13. The assessment of available scientific reports for the genetic control of PD suggests that the QTL for PD on chromosome 13 is a novel genetic factor for regulating the studied trait.

## References

- Abugalieva S., Didorenko S., Anuarbek S., Volkova L., Gerasimova Y., Sidorik I., Turuspekov Y. Assessment of soybean flowering and seed maturation time in different latitude regions of Kazakhstan. *PLoS One*. 2016;11(12):e0166894. DOI 10.1371/journal.pone.0166894
- Allaire J. RStudio: Integrated Development Environment for R. In: The R User Conference, useR! August 16–18 2011. Book of Contributed Abstracts. Univ. of Warwick, Coventry, UK, 2011;14
- Bailey M.A., Mian M.A.R., Carter J., Ashley D.A., Boerma H.R. Pod dehiscence of soybean: identification of quantitative trait loci. *J. Hered.* 1997;88(2):152-154. DOI 10.1093/oxfordjournals.jhered.a023075
- Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. B: Stat. Methodol.* 1995;57(1):289-300. DOI 10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x
- Benvenuti S. Weed seed movement and dispersal strategies in the agricultural environment. *Weed Biol. Manage.* 2007;7(3):141-157. DOI 10.1111/j.1445-6664.2007.00249.x
- Bhor T.J., Chimote V.P., Deshmukh M.P. Inheritance of pod shattering in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Electron. J. Plant Breed.* 2014;5(4):671-676
- Bradbury P.J., Zhang Z., Kroon D.E., Casstevens T.M., Ramdoss Y., Buckler E.S. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics.* 2007;23(19):2633-2635. DOI 10.1093/bioinformatics/btm308
- Buckler E., Casstevens T., Bradbury P., Zhang Z. User Manual for TASSEL – Trait Analysis by aSSociation, Evolution and Linkage. Version 3. The Buckler Lab at Cornell University, 2011
- Didorenko S.V., Alenkanovna Z.A., Sidorik I., Abugalieva A.I., Kudaibergenov M.S., Iskakov A.R. Diversification of crop production by means of spreading soybeans to the northern regions of the Republic of Kazakhstan. *Biosci. Biotechnol. Res. Asia.* 2016;13(1):23-30. DOI 10.13005/bbra/1998
- Dong Y., Yang X., Liu J., Wang B.H., Liu B.L., Wang Y.Z. Pod shattering resistance associated with domestication is mediated by a NAC gene in soybean. *Nat. Commun.* 2014;5:3352. DOI 10.1038/ncomms4352
- Doszhanova B.N., Didorenko S.V., Zatybekov A.K., Turuspekov Y.K., Abugalieva S.I. Analysis of soybean world collection in conditions of south-eastern Kazakhstan. *Int. J. Biol. Chem.* 2019;12(1):33-40. DOI 10.26577/ijbch-2019-1-i5

- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 2005;14(8):2611-2620. DOI 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Fuller D.Q. Contrasting patterns in crop domestication and domestication rates: recent archaeobotanical insights from the Old World. *Ann. Bot.* 2007;100(5):903-924. DOI 10.1093/aob/mcm048
- Funatsuki H., Hajika M., Hagihara S., Yamada T., Tanaka Y., Tsuji H., Ishimoto M., Fujino K. Confirmation of the location and the effects of a major QTL controlling pod dehiscence, qPDH1, in soybean. *Breed. Sci.* 2008;58(1):63-69. DOI 10.1270/jsbbs.58.63
- Funatsuki H., Suzuki M., Hirose A., Inaba H., Yamada T., Hajika M., Komatsu K., Katayama T., Sayama T., Ishimoto M., Fujino K. Molecular basis of a shattering resistance boosting global dissemination of soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014;111(50):17797-17802. DOI 10.1073/pnas.1417282111
- Han J., Han D., Guo Y., Yan H., Wei Z., Tian Y., Qiu L. QTL mapping pod dehiscence resistance in soybean (*Glycine max* L. Merr.) using specific-locus amplified fragment sequencing. *Theor. Appl. Genet.* 2019;132(8):2253-2272. DOI 10.1007/s00122-019-03352-x
- Hong-Bo S., Li-Ye C., Ming-An S., Shi-Qing L., Ji-Cheng Y. Bioengineering plant resistance to abiotic stresses by the global calcium signal system. *Biotechnol. Adv.* 2008;26(6):503-510. DOI 10.1016/j.biotechadv.2008.04.004
- Hu D., Kan G., Hu W., Li Y., Hao D., Li X., Yang H., Yang Z., He X., Huang F., Yu D. Identification of loci and candidate genes responsible for pod dehiscence in soybean via genome-wide association analysis across multiple environments. *Front. Plant Sci.* 2019;10:811. DOI 10.3389/fpls.2019.00811
- Huang X., Han B. Natural variations and genome-wide association studies in crop plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2014;65:531-551. DOI 10.1146/annurev-arplant-050213-035715
- Jia J., Huan W., Zhan-dong C., Ru-qian W., Jing-hua H., Qiu-ju X., Xiaohui X., Qi-bin M., Hai N., Yan-bo C. Identification and validation of stable and novel quantitative trait loci for pod shattering in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *J. Integr. Agric.* 2022;21(11):3169-3184. DOI 10.1016/j.jia.2022.08.082
- Kang S.T., Kwak M., Kim H.K., Choung M.G., Han W.Y., Baek I.Y., Kim M.Y., Van K., Lee S.H. Population-specific QTLs and their different epistatic interactions for pod dehiscence in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Euphytica.* 2009;166(1):15-24. DOI 10.1007/s10681-008-9810-6
- Krisnawati A., Adie M.M. Identification of soybean genotypes for pod shattering resistance associated with agronomical and morphological characters. *Biosaintifika.* 2017;9(2):193-200. DOI 10.15294/biosaintifika.v9i2.8722
- Liu B., Fujita T., Yan Z.H., Sakamoto S., Xu D., Abe J. QTL mapping of domestication-related traits in soybean (*Glycine max*). *Ann. Bot.* 2007;100(5):1027-1038. DOI 10.1093/aob/mcm149
- Ogutcen E., Pandey A., Khan M.K., Marques E., Penmetza R.V., Kahraman A., Von Wettberg E.J.B. Pod shattering: a homologous series of variation underlying domestication and an avenue for crop improvement. *Agronomy.* 2018;8(8):1-23. DOI 10.3390/agronomy8080137
- Parker T.A., Lo S., Gepts P. Pod shattering in grain legumes: emerging genetic and environment-related patterns. *Plant Cell.* 2021;33(2):179-199. DOI 10.1093/plcell/koaa025
- Pritchard J.K., Stephens P., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 2000;155(2):945-959. DOI 10.1093/genetics/155.2.945
- Rafalski J.A. Association genetics in crop improvement. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2010;13(2):174-180. DOI 10.1016/j.pbi.2009.12.004
- Romkaew J., Umezaki T. Pod dehiscence in soybean: assessing methods and varietal difference. *Plant Prod. Sci.* 2006;9(4):373-382. DOI 10.1626/pp.s.9.373
- Schmutz J., Cannon S.B., Schlueter J., Ma J., Mitros T., Nelson W., Hyten D.L., Song Q., Thelen J.J., Cheng J., ... Cregan P., Specht J., Grimwood J., Rokhsar D., Stacey G., Shoemaker R.C., Jackson S.A. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature.* 2010;463(7278):178-183. DOI 10.1038/nature08670
- Sedivy E.J., Wu F., Hanzawa Y. Soybean domestication: the origin, genetic architecture and molecular bases. *New Phytol.* 2017;214(2):539-553. DOI 10.1111/nph.14418
- Seo J.H., Kang B.K., Dhungana S.K., Oh J.H., Choi M.S., Park J.H., Shin S.O., Kim H.S., Baek I.Y., Sung J.S., Jung C.S., Kim K.S., Jun T.H. QTL mapping and candidate gene analysis for pod shattering tolerance in soybean (*Glycine max*). *Plants.* 2020;9(9):1163. DOI 10.3390/plants9091163
- Song Q., Hyten D.L., Jia G., Quigley C.V., Fickus E.W., Nelson R.L., Cregan P.B. Development and evaluation of SoySNP50K, a high-density genotyping array for soybean. *PLoS One.* 2013;8(1):e54985. DOI 10.1371/journal.pone.0054985
- Suzuki T., Sato M., Takeuchi T. Evaluation of the effects of five QTL regions on Fusarium head blight resistance and agronomic traits in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Breed. Sci.* 2012;62(1):11-17. DOI 10.1270/jsbbs.62.11
- Tsuchiya T. Physiological and genetic analysis of pod shattering in soybeans. *Jpn. Agric. Res. Q.* 1987;21(3):166-175
- Vollmann J., Fritz C.N., Wagentristl H., Ruckebauer P. Environmental and genetic variation of soybean seed protein content under Central European growing conditions. *J. Sci. Food Agric.* 2000;80(9):1300-1306. DOI 10.1002/1097-0010(200007)80:9<1300::AID-JSFA640>3.0.CO;2-I
- Yamada T., Funatsuki H., Hagihara S., Fujita S., Tanaka Y., Tsuji H., Ishimoto M., Fujino K., Hajika M. A major QTL, qPDH1, is commonly involved in shattering resistance of soybean cultivars. *Breed. Sci.* 2009;59(4):435-440. DOI 10.1270/jsbbs.59.435
- Yu Q., Liu Y.L., Sun G.Z., Liu Y.X., Chen J., Zhou Y.B., Chen M., Ma Y.Z., Xu Z.S., Lan J.H. Genome-wide analysis of the soybean calmodulin-binding protein 60 family and identification of GmCBP60A-1 responses to drought and salt stresses. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(24):13501. DOI 10.3390/ijms222413501
- Zatybekov A., Abugaliev S., Didorenko S., Gerasimova Y., Sidorik I., Anuarbek S., Turuspekov Y. GWAS of agronomic traits in soybean collection included in breeding pool in Kazakhstan. *BMC Plant Biol.* 2017;17(Suppl.1):179. DOI 10.1186/s12870-017-1125-0
- Zatybekov A., Abugaliev S., Didorenko S., Rsaliyev A., Turuspekov Y. GWAS of a soybean breeding collection from South East and South Kazakhstan for resistance to fungal diseases. *Vavilov J. Genet. Breed.* 2018;22(5):536-543. DOI 10.18699/VJ18.392
- Zhang J., Singh A.K. Genetic control and geo-climate adaptation of pod dehiscence provide novel insights into soybean domestication. *G3: Genes Genomes Genetics.* 2020;10(2):545-554. DOI 10.1534/g3.119.400876
- Zhang L., Boahen S. Evaluation of critical shattering time of early-maturity soybeans under early soybean production system. *Agric. Biol. J. North Am.* 2010;1(4):440-447. DOI 10.5251/abjna.2010.1.4.440.447
- Zhang Q., Tu B., Liu C., Liu X. Pod anatomy, morphology and dehiscing forces in pod dehiscence of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Flora.* 2018;248:48-53. DOI 10.1016/j.flora.2018.08.014
- Zhou Y., Zhao W., Lai Y., Zhang B., Zhang D. Edible plant oil: global status, health issues, and perspectives. *Front. Plant Sci.* 2020;11:1315. DOI 10.3389/fpls.2020.01315

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received December 12, 2023. Revised April 10, 2024. Accepted April 19, 2024.

DOI 10.18699/vjgb-24-59

## Перспективы биообогащения пшеницы минералами: классическая селекция и агрономия

И.Н. Леонова <sup>1</sup>, Е.В. Агеева <sup>2</sup>, В.К. Шумный<sup>1</sup><sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия<sup>2</sup> 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 leonova@bionet.nsc.ru

**Аннотация.** Недостаток потребления микро- и макроэлементов и витаминов в продуктах питания, который затрагивает более двух миллиардов человек на земном шаре, негативно сказывается на здоровье и приводит к развитию хронических заболеваний. Одним из источников полезных нутриентов является пшеница, которая обеспечивает пищевой энергией большинство населения мира. Создание современных высокоурожайных сортов привело к значительному обеднению минерального состава зерна и сокращению потребления минералов через продукты питания. Биофортификация – активно развивающееся направление, основной целью которого является улучшение питательных качеств сельскохозяйственных культур с помощью комплекса классических и современных методов. К числу основных технологий, используемых в программах биофортификации пшеницы, можно отнести традиционную селекцию, включающую методы гибридизации и отбора, современную селекцию с дополнительным привлечением методов картирования генов/QTL и биоинформатического анализа, трансгенез, мутагенез и геномное редактирование. Успехи в создании биообогащенных сортов были достигнуты в рамках различных международных программ, финансируемых HarvestPlus, CIMMYT, ICARDA, с помощью традиционной селекции и агрономических методов. Несмотря на перспективность методов трансгенеза и геномного редактирования для создания биообогащенных культур, они требуют значительных инвестиционных вложений и трудозатратны, поэтому данные технологии применительно к пшенице находятся в стадии разработки и не имеют пока практического выхода. В последние годы интерес к биообогащению пшеницы возрос в связи с успехами в области картирования генов и QTL для хозяйственно важных признаков. Разработка новых маркеров на основе результатов секвенирования генома пшеницы и привлечение биоинформатических методов анализа (GWAS, meta-QTL) расширили информацию по контролю признаков, определяющих содержание минералов в зерне, и выявили ключевые гены-кандидаты. В данном обзоре описано современное состояние исследований в области генетической биофортификации пшеницы в мире и в России. Приведены сведения об использовании гермоплазмы культурных и дикорастущих родственников для расширения генетического разнообразия современных сортов пшеницы.

**Ключевые слова:** пшеница; микроэлементы; макроэлементы; селекция; агрономия; биофортификация.

**Для цитирования:** Леонова И.Н., Агеева Е.В., Шумный В.К. Перспективы биообогащения пшеницы минералами: классическая селекция и агрономия. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(5):523-535. DOI 10.18699/vjgb-24-59

**Финансирование.** Обзор подготовлен при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 23-16-00041, <https://rscf.ru/project/23-16-00041/>).

## Prospects for mineral biofortification of wheat: classical breeding and agronomy

I.N. Leonova <sup>1</sup>, E.V. Ageeva <sup>2</sup>, V.K. Shumny<sup>1</sup><sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia<sup>2</sup> 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 leonova@bionet.nsc.ru

**Abstract.** Low intake of micro- and macroelements and vitamins in food negatively affects the health of more than two billion people around the world provoking chronic diseases. For the majority of the world's population, these are soft and durum wheats that provide beneficial nutrients, however their modern high-yielding varieties have a significantly depleted grain mineral composition that have reduced mineral intake through food. Biofortification is a new research trend, whose main goal is to improve the nutritional qualities of agricultural crops using a set of classical (hybridization and selection) methods as well and the modern ones employing gene/QTL mapping, bioinformatic



analysis, transgenesis, mutagenesis and genome editing. Using the classical breeding methods, biofortified varieties have been bred as a part of various international programs funded by HarvestPlus, CIMMYT, ICARDA. Despite the promise of transgenesis and genome editing, these labor-intensive methods require significant investments, so these technologies, when applied to wheat, are still at the development stage and cannot be applied routinely. In recent years, the interest in wheat biofortification has increased due to the advances in mapping genes and QTLs for agronomically important traits. The new markers obtained from wheat genome sequencing and application of bioinformatic methods (GWAS, meta-QTL analysis) has expanded our knowledge on the traits that determine the grain mineral concentration and has identified the key gene candidates. This review describes the current research on genetic biofortification of wheat in the world and in Russia and provides information on the use of cultivated and wild-relative germplasms to expand the genetic diversity of modern wheat varieties.

**Key words:** wheat; microelements; macroelements; breeding; agronomy; biofortification.

**For citation:** Leonova I.N., Ageeva E.V., Shumny V.K. Prospects for mineral biofortification of wheat: classical breeding and agronomy. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(5):523-535. DOI 10.18699/vjgb-24-59

## Введение

Пшеница играет важную роль в мире как источник полноценного растительного белка, микро- и макроэлементов и витаминов. За счет потребления продукции, произведенной из пшеницы, население получает в среднем до 20–30 % калорий в день; в некоторых развивающихся странах эта цифра достигает 70 % (Shewry, 2009a; Shiferaw et al., 2013; Tadesse et al., 2019). Для удовлетворения растущих потребностей в зерне пшеницы начиная с 60-х гг. прошлого века основной акцент был сделан на повышении урожайности. В результате расширения посевных площадей и внедрения новых высокопродуктивных сортов мировое производство пшеницы постепенно растет. По данным ФАО, сбор зерна в 2023 г. составил 805.6 млн тонн по сравнению с ~ 600 млн тонн в 2000 г. (<https://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/ru>). По сравнению с началом 2000-х гг. отмечен значительный прирост урожайности – в 1.3–1.8 раза у основных стран-производителей пшеницы, таких как Китай, Индия, Россия и США (<https://www.fao.org/faostat/ru/#country/>).

Однако достигнутые успехи в повышении урожайности пшеницы за счет внедрения высокопродуктивных сортов сопровождаются ухудшением показателей качества зерна, снижением содержания белка, клейковины, минералов, которые обеспечивают питательную ценность конечного продукта (Митрофанова, Хакимова, 2016; Helguera et al., 2020). Опубликованные данные свидетельствуют о том, что содержание микро- и макроэлементов в зерне современных сортов значительно ниже по сравнению со стародавними сортами и дикорастущими сородичами (Salantur, Karaoğlu, 2021; Zeibig et al., 2022).

Микро- и макроэлементы участвуют во многих процессах развития растений с момента прорастания семян, при развитии корневой системы вплоть до формирования урожая (Marschner, 1995). Известна роль минеральных веществ в протекании процессов фотосинтеза и дыхания и регуляции устойчивости к стрессовым факторам (De Santis et al., 2021; Shoormij et al., 2022; Khan et al., 2023). Список макроэлементов, которые сегодня считаются необходимыми для здорового образа жизни и нормального функционирования организма, включает натрий (Na), калий (K), магний (Mg), кальций (Ca), хлор (Cl), фосфор (P) и серу (S). В качестве незаменимых микроэлементов принято выделять железо (Fe), цинк (Zn), медь (Cu), марганец (Mn), йод (I), селен (Se) (Jomova et al., 2022; Ali A.A.H.,

2023). Ряд специалистов в список необходимых минералов дополнительно включают бром (Br), ванадий (V), кремний (Si), никель (Ni) и хром (Cr), однако данные о положительном влиянии этих элементов на животных и человека в настоящее время противоречивы (Vincent, 2017; Genchi et al., 2020).

Недостаток потребления микро- и макроэлементов с продуктами питания, или так называемый скрытый голод, приводит к развитию хронических заболеваний, снижению умственного развития и даже повышенной смертности в большинстве развивающихся стран (Faber et al., 2014; Lockyer et al., 2018). Дефицит макроэлементов, таких как Na, K, Ca, Mg, P, нарушает функционирование нервной, сердечно-сосудистой, скелетно-мышечной систем. Среди необходимых микроэлементов особую опасность вызывает дефицит железа, цинка, йода, селена, которые участвуют в синтезе гемоглобина, регуляции функций ряда ферментов, включая инсулин, в обмене веществ, подавлении образования раковых клеток и др. (Prashanth et al., 2015; Islam et al., 2023).

В настоящее время актуальным и приоритетным направлением в области генетики и селекции пшеницы стало улучшение питательных свойств за счет повышения концентрации и биодоступности необходимых микро- и макроэлементов. Данное направление, для которого используют устоявшийся термин «биофортификация» (или биообогащение), решается с помощью различных подходов, основными из которых являются агрономия и генетическая биофортификация с применением методов традиционной селекции и современных молекулярно-генетических подходов. В обзоре кратко описаны результаты, полученные с помощью агрономических методов и классической селекции с применением технологий картирования генов, и перспективы их использования для создания сортов пшеницы с улучшенным содержанием минерального состава.

## Минеральный состав зерна пшеницы и ее сородичей

Концентрация минералов как в цельном зерне, так и в пшеничной муке имеет большой размах вариативности и определяется генотипом образца, влиянием факторов внешней среды, составом почвы, внесением минеральных удобрений и другими агротехническими подходами. Существенный вклад в фенотипическое проявление и



наследование признака вносит генотип, что позволяет использовать образцы с повышенным содержанием минералов для создания новых селекционных линий пшеницы.

Содержание минеральных элементов в зерне современных сортов мягкой пшеницы значительно варьирует: концентрация микроэлементов Zn, Fe, Cu, Mn находится в пределах до 40, 50, 4 и 38 мкг/г соответственно; содержание макроэлементов K, Mg и Ca не превышает в среднем 4200, 1150 и 370 мкг/г (Murphy et al., 2008; Zhao et al., 2009; Khokhar et al., 2018; Morgounov et al., 2022; Potarova et al., 2023). Несмотря на то что сорта твердой пшеницы незначительно отличаются от мягкой по концентрации основных минеральных элементов (Ficco et al., 2009; Shewry et al., 2023), некоторые авторы указывают на то, что содержание цинка и железа в зерне многих сортов твердой пшеницы достоверно выше (Cakmak et al., 2010; Rachón et al., 2012).

Современные сорта пшеницы имеют более низкие концентрации макро- и микроэлементов по сравнению со стародавними образцами и дикорастущими и культурными родичами. В ряде работ показано, что снижение содержания веществ не всегда связано с изменениями климатических факторов или характеристиками почвы (Garvin et al., 2006; Ficco et al., 2009). M.S. Fan с коллегами (Fan et al., 2008) провели масштабное исследование состава почвы и изменений в содержании цинка, железа, меди и магния в зернах пшеницы, произошедших за 160 лет. Содержание минералов оставалось стабильным в период с 1845 до 1960-х гг., после чего существенно снизилось в связи с внедрением урожайных короткостебельных сортов. Данная тенденция сохранялась независимо от изменения концентрации элементов в почве или внесения органических и неорганических удобрений. Наличие генов короткостебельности *Rht* в сортах твердой и мягкой пшеницы сопровождается понижением концентрации микроэлементов, при этом уровень сокращения варьирует и зависит от генетической основы сорта (Velu et al., 2017a). Некоторые авторы отмечают наличие отрицательных корреляций между урожайностью современных сортов и содержанием цинка и железа, что может быть причиной снижения концентрации данных минералов в зерне в связи с выращиванием высокопродуктивных сортов (Monasterio, Graham, 2000; Garvin et al., 2006).

При создании биообогащенных сортов пшеницы возникает проблема сохранения высокого содержания минералов в конечной продукции, поскольку значительная часть микроэлементов сконцентрирована в оболочке зерна. Концентрации цинка, железа, меди в муке снижаются в 2–10 раз по сравнению с цельным зерном, тогда как в отрубях из зерновой оболочки они остаются на прежнем уровне (Peterson et al., 1986; Ciudad-Mulero et al., 2021). Хорошей альтернативой может быть использование цельнозерновой муки или добавки в муку отрубей, которые содержат на порядок больше необходимых минералов. Включение различных пропорций пшеничных отрубей в муку позволяет повысить содержание железа в выпечке, при этом наибольший эффект наблюдался при добавке 10 % отрубей, что сравнимо с хлебом, полученным из цельнозерновой муки (Butt et al., 2004).

Скрининг зародышевой плазмы диких и культурных сородичей пшеницы также выявил значительные генетические различия в концентрациях минеральных элементов. Несмотря на широкий диапазон изменчивости в содержании кальция, магния, калия, цинка, железа, марганца и меди у диплоидных и тетраплоидных предков *T. durum*, *T. dicoccum*, *T. monococcum*, *T. araraticum*, *T. timopheevii* и *Ae. tauschii*, ученые отмечают, что гексаплоидная пшеница *T. aestivum* в среднем уступает им по концентрации большинства элементов (Marschner, 1995; Cakmak et al., 2004; Gupta P.K. et al., 2021; Zeibig et al., 2024). Концентрации Zn и Fe в зерне различных представителей рода *Aegilops* (*Ae. searsii*, *Ae. umbellulata*, *Ae. caudata*, *Ae. geniculata* и др.) в 2–3 раза выше, чем у современных гексаплоидных сортов пшеницы (Gupta P.K. et al., 2021; Zeibig et al., 2022). Высокое генетическое разнообразие по минеральному составу обнаружено у дикой полбы *T. dicoccoides*; при этом для некоторых разновидностей наблюдалось сочетание высокого содержания цинка, железа и белка в зерне и высокой урожайности (Peleg et al., 2008; Chatzav et al., 2010).

Значительное внутривидовое разнообразие является основой для использования генетического потенциала дикорастущих и культурных родичей в качестве источников высокого содержания минеральных элементов в зерне. Наличие положительных корреляций между концентрациями некоторых элементов (Zn, Fe, Mg), содержанием белка и урожайностью позволяет проводить одновременное улучшение нескольких качественных параметров без снижения продуктивности (Oury et al., 2006; Chatzav et al., 2010).

Для улучшения минерального состава были созданы различные интрогрессивные, дополненные, замещенные линии, полученные на основе гибридизации современных сортов мягкой и твердой пшеницы с дикорастущими и культурными родичами (Wang S. et al., 2011; Farkas et al., 2014; Савин и др., 2018). Изучение таких линий позволило выделить образцы, обладающие лучшими характеристиками в сравнении с исходными коммерческими сортами пшеницы, выявить критические хромосомы, содержащие целевые генетические факторы, и создать основу для последующего картирования генов.

Обширным источником генетического разнообразия по минеральному составу являются синтетические гексаплоидные линии, полученные на основе гибридизации различных представителей *T. turgidum* ssp. *durum* и *Ae. tauschii* (Alvarez, Guzmán, 2018; Morgounov et al., 2022). С привлечением синтетических линий было картировано большое число благоприятных аллелей целевых генов, которые могут быть использованы в схемах генетической биофортификации (Bhatta et al., 2018; Morgounov et al., 2022). Однако детальный анализ продуктивности образцов, созданных с участием сородичей пшеницы, показывает, что большинство из них характеризуются снижением показателей урожайности и ее компонентов в зависимости от генетической основы сорта-реципиента и количества чужеродного генетического материала (Calderini, Ortiz-Monasterio, 2003; Velu et al., 2017b). Этот факт существенно усложняет перенос целевых генов в коммерческие сорта пшеницы.

## Генетическая биофортификация

Биофортификация путем традиционной селекции является наиболее распространенным и экономически эффективным методом для улучшения минерального состава зерна пшеницы. При использовании классических методов образцы-доноры высокого содержания питательных веществ скрещивают с сортом-реципиентом, обладающим комплексом необходимых хозяйственно важных признаков, с отбором по признаку в последующих поколениях. В том случае, если в качестве донора берется чужеродный вид, процесс может сопровождаться несколькими циклами беккроссирования для переноса целевого интроgressированного фрагмента и снижения количества чужеродного генетического материала.

В рамках выполнения программ по биофортификации в крупных международных центрах, занимающихся изучением зерновых культур (CGIAR, CIMMYT, HarvestPlus, ICARDA), были использованы результаты скрининга коллекций современных сортов пшеницы, ландрасов и дикорастущих видов, позволившие определить вариабельность минерального состава, разработать рекомендации и создать селекционные пребридинговые линии (Monasterio, Graham, 2000; Peleg et al., 2008; Ficco et al., 2009).

Традиционные методы селекции для биообогащения зерна пшеницы стали применяться в Европе после реализации программы HEALTHGRAIN (2005–2010), в которой приняли участие 43 партнера из 17 стран. Благодаря этой программе на нескольких селекционных участках в европейских странах в течение трех лет проводилась оценка современных сортов и селекционных линий, староместных сортов мягкой пшеницы и других видов злаковых культур (рожь, ячмень, овес) на содержание фитохимических компонентов и минералов. Результаты показали, что значительная часть вариаций генетически детерминирована, поэтому отобранный материал может быть доступен для селекционных программ (Shewry, 2009b; Van Der Kamp et al., 2014).

Начиная с 2003 г. международный центр HarvestPlus инвестирует значительные средства для создания биофортифицированных сортов пшеницы, риса, кукурузы, проса, фасоли, батата и других культур с повышенным содержанием витамина А, железа и цинка. Биофортификация пшеницы в рамках данной программы ведется в странах Африки (Египет, Эфиопия, Мадагаскар, Нигерия, ЮАР, Замбия и Зимбабве), Азии (Афганистан, Бангладеш, Китай, Индия, Непал, Пакистан, Филиппины) и Латинской Америки (Боливия, Бразилия, Мексика) (<https://www.harvestplus.org/biofortification-hub>). К настоящему времени для стран Азии и Африки создано 37 биофортифицированных сортов пшеницы, из которых 12 отличаются высокой урожайностью и устойчивостью к грибным болезням (Andersson et al., 2017; Bouis, Saltzman, 2017; Kamble et al., 2022). Изучение сортов с повышенным содержанием Zn, созданных в Индии, позволило авторам эксперимента сделать заключение, что, несмотря на невысокий вклад генотипа в общую изменчивость концентрации Zn в зерне, биофортифицированные генотипы проявляли экологическую стабильность при выращивании на разных типах почв, в том числе с низкой доступностью цинка (Khokhar et al., 2018). Список биофортифицированных сортов мяг-

кой и твердой пшеницы, созданных крупными селекционными учреждениями Индии, Пакистана, Бангладеш, Непала и Боливии в сотрудничестве с CIMMYT и рекомендованных для коммерческого выращивания, представлен в статье (Gupta O.P. et al., 2022). Среди них можно отметить сорта твердой пшеницы HI8777 и MACS 4028 с содержанием железа 48.7 и 46.1 мг/кг и цинка 40.3 и 43.6 мг/кг соответственно, сорта мягкой пшеницы WB 02, HI 1633, DBW 187, DBW 332 и PBW 757, у которых концентрация данных микроэлементов превышает 40 мг/кг.

В последние годы пристальное внимание уделяется созданию биообогащенных генотипов пшеницы с нестандартной окраской зерна (синий, фиолетовый, черный), которые отличаются от обычных красnozерных и белозерных сортов высоким содержанием антоцианов, обладающих антиоксидантной, антимикробной и антиканцерогенной активностью. Изучение пигментированных образцов показало, что некоторые из них обладают дополнительными характеристиками, в том числе повышенным содержанием белка, микро- и макроэлементов (Sharma S. et al., 2018; Xia et al., 2020; Dhua et al., 2021; Liu Y. et al., 2021). Анализ муки из образцов пшеницы с голубыми, зелеными и черными зернами установил, что по содержанию белка и аминокислот пигментированные сорта превышают стандартные на 7–18 %; содержание цинка было выше почти в 2 раза, а железа и марганца – на 8–40 % (Tian et al., 2018). Имеются данные, что образцы голубозерной пшеницы характеризуются более высокой концентрацией железа и цинка по сравнению с сортами фиолетовой, красной и белой окраской (Ficco et al., 2014). Проведены эксперименты по поиску среди пигментированных сортов пшеницы образцов с высоким содержанием селена, который обладает противоопухолевой активностью. Согласно результатам Q. Xia с соавторами (2020), при опрыскивании растений селеном или при внесении его в почву фиолетовозерные сорта накапливают больше Se в зерне по сравнению с белозерными. Однако по данным других авторов, при отсутствии дополнительных обработок селеном голубо- и фиолетовозерные сорта уступают стандартным сортам пшеницы почти в 5 раз по концентрации Se в зерне (Phuong et al., 2017).

В связи с тем, что пигментированные образцы пшеницы могут содержать повышенное количество клейковины, антоцианов, минералов, их рассматривают в качестве перспективных источников полезных нутриентов при приготовлении хлебобулочных и макаронных изделий. Работ, в которых детально изучены качественные характеристики конечной продукции, полученной из муки пигментированной пшеницы, немного, и включают они в основном оценку содержания антоцианов, белка и клейковины, характеристику теста и органолептические свойства (Pasqualone et al., 2015; Василова и др., 2021; Sharma N. et al., 2022; Гордеева и др., 2023; Фитилева, Сибикеев, 2023). Тем не менее имеются обнадеживающие результаты, что продукция из пшеницы с окрашенным зерном сохраняет значительно больше полезных нутриентов в процессе переработки (Padhy et al., 2022). Так, A. Kumari с коллегами (Kumari et al., 2020), анализируя чапати, выпеченный из пигментированных сортов пшеницы, показали, что по содержанию фенольных веществ, антоцианов, антиокси-

дантной активности образцы располагались в следующем порядке: зерно черное > голубое > фиолетовое > белое. На данный момент пигментированные сорта пшеницы рассматриваются как многообещающий источник биологически активных веществ и высокой антиоксидантной активности.

### Картирование локусов количественных признаков

Важным этапом биофортификации является отбор потенциальных генотипов, содержащих целевые локусы, наличие которых будет сопровождаться повышением минеральных элементов в зерне. На этом этапе огромное значение имеют ДНК-маркеры, которые почти три десятка лет используются для картирования локусов количественных признаков (QTL) и в технологиях маркер-ориентированной и геномной селекции (Collard, Mackill, 2008). Определение хромосомной локализации и позиции локуса на хромосоме позволяет понять генетическую основу признака, определить локусы, контролирующие содержание минеральных элементов, выявить новые QTL и на основе полученной информации провести отбор генотипов, подходящих для селекционных программ.

Для локализации целевых локусов и выявления новых аллелей генов применяют два подхода: генетическое картирование с использованием популяций, основанных на двуродительских скрещиваниях, и полногеномный поиск ассоциаций (genome-wide association study, GWAS), главным преимуществом которого является использование панелей генотипов, характеризующихся большим генетическим разнообразием (Collard, Mackill, 2008; Tibbs Cortes et al., 2021).

За последние 15 лет было опубликовано много работ по картированию QTL, наличие которых определяет содержание необходимых минералов в зерне пшеницы. Надо отметить, что большинство исследований выполнялось преимущественно с целью выявления геномных районов, контролирующих концентрацию Zn и Fe, поскольку эти микроэлементы считаются наиболее важными для здоровья человека (Peleg et al., 2009; Tiwari et al., 2009; Wang S. et al., 2011; Hao et al., 2014; Pu et al., 2014). С использованием GWAS проведено более точное картирование геномных локусов, выявлены новые, ранее не опубликованные QTL и выполнен поиск функциональных генов-кандидатов в районах целевых локусов (Bhatta et al., 2018; Alomari et al., 2019; Rathan et al., 2022; Tadesse et al., 2023). Комплексная работа по выявлению ключевых геномных районов для биофортификации Zn и Fe у мягкой пшеницы была проведена Р. Juliana с коллегами (2022), которые, используя панель из 5585 пребридинговых линий продвинутых поколений, идентифицировали 141 маркер на всех хромосомах пшеницы, за исключением хромосом 3A и 7D. Результаты, суммирующие данные по хромосомной локализации QTL для содержания цинка и железа в зерне пшеницы, частично представлены в обзорных статьях (García-Oliveira et al., 2018; Gupta O.P. et al., 2022). В настоящее время идет процесс накопления информации о наиболее информативных локусах, их хромосомной локализации и валидации маркеров KASP, созданных на основе однонуклеотидных полиморфизмов. Сделаны первые

шаги в направлении создания маркеров KASP по результатам картирования QTL (Wang Y. et al., 2021; Sun M. et al., 2023), однако пока нет доступной информации об их специфичности и практическом использовании.

Ограниченное число работ имеется по генетическому и ассоциативному картированию QTL для других минеральных элементов (Alomari et al., 2017; Manickavelu et al., 2017; Wang P. et al., 2017; Qiao et al., 2021; Hao et al., 2024). С помощью сравнительного геномного и мета-QTL анализа, выполненного с использованием ранее опубликованных данных по картированию QTL для минералов, было идентифицировано более 400 стабильных локусов, для некоторых из которых показаны плеiotропные эффекты по отношению к разным минеральным элементам и компонентам урожайности (Shariatipour et al., 2021; Singh et al., 2022; Potapova et al., 2023; Cabas-Lühmann et al., 2024). GWAS, проведенный для 205 генотипов озимой мягкой пшеницы из Китая, выявил более 280 ассоциаций молекулярных маркеров с содержанием Ca, Mn, Cu и Se в различных хромосомах пшеницы. При этом было показано, что наиболее высокий вклад в содержание данных элементов вносят кластеры генов в хромосомах 3B и 5A (для Ca), 4B (для Cu) и 1B (для Mn) (Wang W. et al., 2021). На основе полногеномного анализа 252 сортов мягкой пшеницы по содержанию селена сделано заключение, что использование сцепленных с целевыми локусами SNP маркеров в хромосомах 5D и 1D может повысить концентрацию Se на 6.62 % при проведении геномной селекции (Tadesse et al., 2023). С помощью GWAS, выполненного на панели из 768 сортов, были идентифицированы геномные области, ассоциированные с концентрацией Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, Se, Zn в мягкой пшенице, и стабильно экспрессирующиеся гены-кандидаты, расположенные в областях локализации QTL (Hao et al., 2024). В процессе идентификации генетических локусов, связанных с накоплением кальция, было детектировано 11 локусов в хромосомах 2A, 3A (2 локуса), 3B (2 локуса), 3D, 4A, 4B, 5B (2 локуса) и 6A, из которых четыре QTL стабильно проявлялись в разных условиях среды (Shi X. et al., 2022). Проведенный этими авторами анализ генов-кандидатов выделил в хромосоме 4A ген *TraesCS4A02G428900*, который высоко экспрессируется в зернах пшеницы и может быть связан с накоплением кальция.

Для поиска источников и доноров эффективных локусов, связанных с накоплением высоких концентраций минералов в зерне, выполнен поиск новых локусов с использованием родичей мягкой пшеницы и различных синтетических линий (synthetic hexaploid wheats, SHW) (см. таблицу). SHW, полученные от скрещивания тетраплоидных видов (*T. durum*, *T. dicoccum*) с *Ae. tauschii*, являются источниками новых аллелей генов для различных хозяйственно важных признаков пшеницы. По данным Z.E. Pu с соавторами (2014), 22 из 29 аллелей, ответственных за повышенную концентрацию Zn, Fe, Mn, Cu и Se в зерне рекомбинантных инбредных линий, происходят из генома синтетической линии, полученной от скрещивания *T. turgidum* ssp. *turgidum* с *Ae. tauschii* ssp. *tauschii*. Значительное число локусов, в том числе новых, было выявлено в хромосомах генома D, происходящих от разновидностей *Ae. tauschii*, что свидетельствует о высоком потенциале



## Хромосомная локализация локусов, ассоциированных с содержанием минералов в зерне синтетических гексаплоидных линий и родичей пшеницы, установленная с помощью генетического и ассоциативного картирования

Элемент	Картирующая популяция/ метод картирования	Хромосома	Концентрация*, мкг/г	Наследуемость ( $h^2$ )	Литературный источник
Zn	RIL ( <i>T. durum</i> × <i>Ae. tauschii</i> × <i>T. aestivum</i> )/ QTL картирование	2D, 3D, 4D, 5B	43.9	Н.д.**	Pu et al., 2014
	SHW ( <i>Triticum durum</i> × <i>Ae. tauschii</i> )/ GWAS	1A, 2A, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A, 6B	23.1	0.65	Bhatta et al., 2018
	<i>Triticum boeoticum</i> × <i>T. monococcum</i> / QTL картирование	7A	32.4	Н.д.	Tiwari et al., 2009
	<i>T. aestivum</i> × <i>T. dicoccoides</i> /GWAS	1A, 2A	60.6	0.97	Liu J. et al., 2021
	RIL ( <i>T. durum</i> × <i>T. dicoccoides</i> )/ QTL картирование	2A, 5A, 6B, 7A, 7B	58.0	0.62	Peleg et al., 2009
	RIL ( <i>T. dicoccum</i> × <i>Ae. tauschii</i> × <i>T. aestivum</i> )/ QTL картирование	4B, 5A, 5B, 6B, 6D	54.9	0.79	Crespo-Herrera et al., 2016
	RIL ( <i>T. spelta</i> × <i>T. aestivum</i> )/ QTL картирование	2A, 2B, 3D, 6A, 6B	42.2	0.80	Srinivasa et al., 2014
	RIL (SHW × <i>T. spelta</i> )/QTL картирование	1A, 1B, 3B, 3D, 4A, 5B, 6A, 7B, 7D	57.2	0.65	Crespo-Herrera et al., 2017
	RIL ( <i>T. durum</i> × <i>T. dicoccum</i> )/ QTL картирование	1B, 5A, 6A, 6B	60.2	0.73	Velu et al., 2017c
	Пшенично-эгилопсные замещенные и добавочные линии/GWAS	1B, 2B, 3A, 3B, 5D, 6A, 6D, 7B	42.0	0.61	Kaur et al., 2023
RIL ( <i>T. aestivum</i> × <i>T. dicoccum</i> × <i>Ae. tauschii</i> )/ GWAS	2A, 2D, 7D	38.0	0.77	Krishnappa et al., 2021	
SHW ( <i>T. durum</i> × <i>Ae. tauschii</i> )/GWAS	1B, 2B, 2D, 3D	47.4	0.44	Morgounov et al., 2022	
Fe	RIL ( <i>T. aestivum</i> × <i>T. dicoccum</i> × <i>Ae. tauschii</i> )/ GWAS	1D, 2A, 3B, 6D, 7D	37.0	0.81	Krishnappa et al., 2021
	Пшенично-эгилопсные замещенные и добавочные линии/GWAS	1B, 2A, 2B, 3B, 3D, 5A, 5B, 5D, 6A, 6B, 6D, 7A, 7D	39.0	0.68	Kaur et al., 2023
	RIL ( <i>T. durum</i> × <i>T. dicoccum</i> )/ QTL картирование	1B, 3A, 3B, 5B	57.2	0.30	Velu et al., 2017c
	RIL (SHW × <i>T. spelta</i> )/QTL картирование	2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B, 4D, 5B	34.3	0.35	Crespo-Herrera et al., 2017
	RIL ( <i>T. durum</i> × <i>Ae. tauschii</i> × <i>T. aestivum</i> )/ QTL картирование	2B, 5B, 5D, 7D	72.6	Н.д.	Pu et al., 2014
	RIL ( <i>T. dicoccum</i> × <i>Ae. tauschii</i> × <i>T. aestivum</i> )/ QTL картирование	2B, 2D, 4B, 5A, 5B, 6A, 6B, 6D, 7D	37.3	0.62	Crespo-Herrera et al., 2016
	SHW ( <i>T. durum</i> × <i>Ae. tauschii</i> )/GWAS	1A, 3A	39.4	0.78	Bhatta et al., 2018
	<i>T. boeoticum</i> × <i>T. monococcum</i> / QTL картирование	2A, 7A	31.6	Н.д.	Tiwari et al., 2009
	RIL ( <i>T. durum</i> × <i>T. dicoccoides</i> )/ QTL картирование	2A, 2B, 3A, 3B, 4B, 5A, 6A, 6B, 7A, 7B	33.8	0.69	Peleg et al., 2009
	<i>T. aestivum</i> × <i>T. dicoccoides</i> /GWAS	3B, 4A, 4B, 5A, 7B	98.3	0.97	Liu J. et al., 2021
	RIL ( <i>T. spelta</i> × <i>T. aestivum</i> )/ QTL картирование	1A, 2A, 3B	41.1	0.79	Srinivasa et al., 2014
	SHW ( <i>T. durum</i> × <i>Ae. tauschii</i> )/GWAS	4A, 7B	35.9	0.38	Morgounov et al., 2022
	Cu	RIL ( <i>T. durum</i> × <i>Ae. tauschii</i> × <i>T. aestivum</i> )/ QTL картирование	2A, 3D, 4A, 4D, 5A, 6D, 7B	5.86	Н.д.
SHW ( <i>T. durum</i> × <i>Ae. tauschii</i> )/GWAS		1B, 2A, 3A, 3B, 4B, 5A, 5B, 5D, 6A, 6B	6.6	0.63	Bhatta et al., 2018
RIL ( <i>T. durum</i> × <i>T. dicoccoides</i> )/ QTL картирование		1A, 2A, 3B, 4A, 4B, 5A, 6A, 6B, 7A, 7B	6.9	0.76	Peleg et al., 2009
SHW ( <i>T. durum</i> × <i>Ae. tauschii</i> )/GWAS		2B, 6D	4.25	0.40	Morgounov et al., 2022



## Окончание таблицы

Элемент	Картирующая популяция/ метод картирования	Хромосома	Концентрация*, мкг/г	Наследуемость ( $h^2$ )	Литературный источник
Mn	RIL ( <i>T. durum</i> × <i>Ae. tauschii</i> × <i>T. aestivum</i> )/ QTL картирование	1A, 2A, 2D, 4D, 5D	26.99	Н.д.	Pu et al., 2014
	SHW ( <i>T. durum</i> × <i>Ae. tauschii</i> )/GWAS	2D, 3A, 4B, 5D, 6B	43.1	0.67	Bhatta et al., 2018
	<i>T. aestivum</i> × <i>T. dicoccoides</i> /GWAS	1B	33.4	0.94	Liu J. et al., 2021
	RIL ( <i>T. durum</i> × <i>T. dicoccoides</i> )/ QTL картирование	2B, 7B	41.6	0.41	Peleg et al., 2009
	SHW ( <i>T. durum</i> × <i>Ae. tauschii</i> )/GWAS	2A, 3A, 4B, 7B	42.5	0.41	Morgounov et al., 2022
Ca	SHW ( <i>T. durum</i> × <i>Ae. tauschii</i> )/GWAS	1B, 2B, 2D, 3A, 3B, 3D, 6A, 6B, 7A	73.7	0.41	Bhatta et al., 2018
	RIL ( <i>T. durum</i> × <i>T. dicoccoides</i> )/ QTL картирование	1A, 2B, 4A, 4B, 5B, 6A, 6B, 7B	435.5	0.79	Peleg et al., 2009
	SHW ( <i>T. durum</i> × <i>Ae. tauschii</i> )/GWAS	3B, 5A, 5D, 6D	389.5	0.50	Morgounov et al., 2022
Mg	SHW ( <i>T. durum</i> × <i>Ae. tauschii</i> )/GWAS	1B, 1D, 2D, 3A, 3B, 4A, 4B, 4D, 5B, 5D, 7A	1424.5	0.62	Bhatta et al., 2018
	RIL ( <i>T. durum</i> × <i>T. dicoccoides</i> )/ QTL картирование	1B, 2A, 3A, 5B, 6A, 6B, 7A, 7B	1534.5	0.74	Peleg et al., 2009
	SHW ( <i>T. durum</i> × <i>Ae. tauschii</i> )/GWAS	1B, 2A, 4B, 5A, 5B, 6D, 7B	1203.5	0.59	Morgounov et al., 2022
K	RIL ( <i>T. durum</i> × <i>T. dicoccoides</i> )/ QTL картирование	1A, 2A, 1A, 2B, 5B, 6A, 6B, 7B	4568.4	0.58	Peleg et al., 2009
	SHW ( <i>T. durum</i> × <i>Ae. tauschii</i> )/GWAS	3A, 7A	3924.5	0.44	Morgounov et al., 2022
Cd	SHW ( <i>T. durum</i> × <i>Ae. tauschii</i> )/GWAS	1A, 2A, 2D, 3A, 6D	0.07	0.28	Bhatta et al., 2018
	SHW ( <i>T. durum</i> × <i>Ae. tauschii</i> )/GWAS	1A, 1B, 2A, 2B, 3D, 4A, 4D, 5D, 7A, 7B	0.033	0.44	Morgounov et al., 2022
Se	RIL ( <i>T. durum</i> × <i>Ae. tauschii</i> × <i>T. aestivum</i> )/ QTL картирование	3D, 4A, 5B, 7D	0.55	Н.д.	Pu et al., 2014

\* Приведены средние значения за годы проведения полевых экспериментов; \*\* н.д. – нет данных.

этого вида для улучшения содержания таких элементов в зерне, как Ca, Co, Cu, Li, Mg, Mn и Ni (Bhatta et al., 2018; Krishnappa et al., 2021; Morgounov et al., 2022).

В некоторых работах было показано, что наличие чужеродных хромосом в геномах замещенных, интрогрессивных и добавочных линий пшеницы приводит к повышению концентрации цинка, железа и других минералов (Wang S. et al., 2011; Velu et al., 2017c; Gupta P.K. et al., 2020; Potarova et al., 2023). У диплоидных видов пшеницы (*T. monoccum*, *T. boeoticum*) было идентифицировано два локуса в хромосомах 2A и 7A, отвечающих за содержание железа, и один – в хромосоме 7A для цинка (Tiwari et al., 2009) (см. таблицу). Использование различных популяций культурных и дикорастущих тетраплоидных видов, рекомбинантных инбредных линий, а также синтетических линий, полученных с их участием, выявило много QTL, происходящих из A и B геномов *T. durum*, *T. dicoccum*, *T. dicoccoides* и ассоциированных с содержанием железа и цинка (Peleg et al., 2009; Crespo-Herrera et al., 2016, 2017; Cabas-Lühmann et al., 2024). Надо отметить, что у ряда картированных QTL для Zn, Fe, Mn и других минералов отсутствуют негативные эффекты по отношению к содержанию белка в зерне, массе 1000 зерен и урожайности в целом, что позволяет улучшать сорта по нескольким

признакам одновременно (Uauy et al., 2006; Liu J. et al., 2021; Cabas-Lühmann et al., 2024). Также во многих исследованиях показан высокий уровень наследуемости изученных признаков, свидетельствующий о значительном вкладе генотипа, что позволяет использовать образцы с чужеродными транслокациями в качестве источников целевых генетических факторов в селекционных программах (см. таблицу).

### Агрономические методы

Наиболее простым и доступным из всех методов биофортификации является применение удобрений, обогащенных микро- и макроэлементами, при внесении в почву или в качестве внекорневых подкормок. Ряд данных свидетельствует, что применение азотных удобрений различных концентраций отдельно или в сочетании с минеральными добавками может оказывать положительный эффект на содержание микроэлементов в зерне (Shi R. et al., 2010; Kutman et al., 2011; Niyigaba et al., 2019). По степени эффективности разных методов (обработка семян, внесение удобрений в почву, листовое опрыскивание) и их влияния на урожайность, содержание белка и концентрацию минералов наиболее действенным способом считается внекорневая листовая обработка (Stepien, Wojtkowiak,

2016; Hassan et al., 2019; Saqee et al., 2023). Анализ эффективности листовых обработок пшеницы растворами соединений цинка, проведенных на 23 экспериментальных участках в семи странах (Китай, Индия, Казахстан, Мексика, Пакистан, Турция и Замбия), показал повышение концентрации цинка в зерне на 80–90 % при отсутствии снижения урожайности (Zou et al., 2012).

Обеспечение запаса Zn в вегетативных тканях во время налива зерна с помощью опрыскивания листьев растворами цинка является важным приемом повышения концентрации Zn в зерне (Sakmak et al., 2010; Velu et al., 2014). Эффективность листовых обработок была продемонстрирована в экспериментах по биофортификации образцов твердой пшеницы с целью насыщения зерна селеном (De Vita et al., 2017). Концентрация Se после помола, а также в макаронных изделиях повысилась на 11 %, при этом не произошло снижения остальных показателей качества, урожайности и органолептических характеристик готовой пасты.

Надо отметить, что данные по влиянию различных удобрений на концентрацию минеральных веществ в зерне достаточно противоречивы. Некоторые исследователи отмечают отсутствие корреляций между применением удобрений и накоплением минералов в зерне, указывая на сложные взаимодействия нескольких факторов, таких как условия среды, генотип, нормы внесения удобрений, механизированная обработка почвы и др. (Jaskulska et al., 2018; Caldelas et al., 2023).

К основным недостаткам агрономической биофортификации можно отнести применение минеральных обработок каждый сезон вегетации и необходимость учитывать ряд дополнительных факторов, таких как структура почвы и концентрация в ней необходимых минералов, недостаток или избыток осадков, температурные условия, степень биологического поглощения минералов из почвы растениями, а также влияние генотипа сорта (Костин и др., 2020). По мнению I. Sakmak с соавторами (Sakmak et al., 2010), отсутствие достаточной влагообеспеченности, высокий pH почвы, большое содержание CaCO<sub>3</sub> и малое количество органических веществ значительно снижают доступность и поглощение Zn и Fe из почвы, что не позволяет достичь оптимальной концентрации минералов в зерне.

Еще одним направлением агрономической биофортификации является возможность применения почвенных микроорганизмов (*Bacillus*, *Azotobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* и др.) для солубилизации минеральных веществ и их подвижности из почвы в съедобные части растений. Показано, что различные способы инокуляции семенного материала или внесение микроорганизмов непосредственно в почву сопровождаются повышением концентрации таких элементов, как Zn, Fe, Mn, Cu и Se, в зерне и побегах пшеницы (Rana et al., 2012; Голубкина и др., 2017; Sun Z. et al., 2021; Ali M. et al., 2023). Механизмы микробной биофортификации и эффективность метода для поглощения Fe и Zn различными сельскохозяйственными растениями подробно описаны в обзоре (Verma et al., 2021).

Кроме ризосферных микроорганизмов, внимание исследователей обращено на использование арбускулярных микоризных грибов в качестве дополнительного агента

для улучшения хозяйственно важных характеристик сельскохозяйственных культур. Использование штаммов арбускулярной микоризы отдельно или в сочетании с ризосферными микроорганизмами повышает концентрацию макроэлементов (азот и фосфор), микроэлементов (цинк и железо) в зерне пшеницы, а также параметры продуктивности (масса 1000 зерен, число зерен в колосе и число продуктивных побегов) (Ma et al., 2019; Yadav et al., 2020).

Несмотря на обнадеживающие результаты по привлечению ризосферных микроорганизмов для биофортификации, пока в этой области достигнуты ограниченные успехи из-за сложности механизмов взаимодействия микроорганизмов с растением-хозяином и влияния абиотических факторов внешней среды (минеральный состав почвы, температура, влияние фитиновой кислоты на биодоступность Zn и Fe). Эффективность микробной биофортификации значительно зависит также от генотипа, что предполагает проведение дополнительных экспериментов для оценки отзывчивости генотипа и подбора эффективных штаммов микроорганизмов (Garg et al., 2018).

### Биофортификация в России

В России работы по изучению сортообразцов пшеницы с целью создания генотипов с повышенным содержанием минеральных элементов практически не ведутся. К настоящему времени опубликовано ограниченное число данных по скринингу сортов и селекционных линий отечественной селекции по содержанию некоторых микро- и макроэлементов и по отработке технологий применения удобрений, регуляторов роста и микроорганизмов для улучшения минерального состава зерна (Голубкина и др., 2017; Аристархов и др., 2018; Чикишев и др., 2020). В Институте биологии Карельского научного центра РАН разрабатываются методы повышения содержания меди в корневой системе и побегах *Triticum aestivum* L. и *Hordeum vulgare* L. (Казнина и др., 2022).

В рамках комплексной Казахстано-Сибирской программы (КАСИБ) регулярно проводится скрининг новых сортов и селекционных линий на урожайность, параметры качества зерна и муки и хлебопекарные качества. Что касается содержания минерального состава, то работы в этой области только начаты и опубликованы первые данные по анализу больших коллекций сортообразцов и синтетических линий гексаплоидной пшеницы различного географического происхождения (Шаманин и др., 2021; Morgounov et al., 2022). Согласно результатам анализа российских сортов по программе КАСИБ, содержание цинка в зерне сортов российской селекции выше, чем у сортов, созданных в рамках международной программы HarvestPlus (Шаманин и др., 2021; Shepelev et al., 2022). Однако по содержанию Fe, Ca, Mo, Mg российско-казахстанские образцы уступают генотипам из США и Японии.

Работы по выведению сортов пшеницы, перспективных для функционального питания, включают создание и изучение фиолетовозерных сортов. Показано, что наличие антоцианов не влияет на технологические свойства хлеба. Добавление при выпечке хлеба отрубей из фиолетовозерных образцов обогащает продукцию пищевыми волокнами и антоцианами (Фисенко и др., 2020). Получен фиолетовозерный сорт яровой мягкой пшеницы Надира

с повышенной антиоксидантной активностью, устойчивостью к болезням и высокой урожайностью (Василова и др., 2021).

Начаты работы по выявлению генетических факторов и картированию генов/QTL в сортах российского происхождения, синтетических, рекомбинантных и интрогрессивных линиях пшеницы (Morgounov et al., 2022; Potarova et al., 2023). Сделаны первые шаги по разработке моделей геномной селекции для улучшения минерального состава зерна пшеницы (Потапова и др., 2024).

## Заключение

Биофортификация – один из современных и эффективных подходов, направленных на обогащение пшеницы необходимыми витаминами и минеральными веществами. Биообогащение помогает не только преодолеть дефицит минеральных элементов в зерне, но и повысить качество зерна, урожайность и устойчивость ко многим заболеваниям. В разработанных программах по биофортификации для создания новых генотипов пшеницы с улучшенными свойствами используются различные подходы, основными из которых являются методы традиционной селекции с привлечением современных технологий генетического картирования и агрономические приемы.

Технологии трансгенеза и геномного редактирования находятся в стадии разработки и не имеют на данный момент практического выхода. Генетическая биофортификация считается более эффективной с экономической точки зрения и имеет более длительный период действия по сравнению с агрономической. В настоящее время поиск перспективных источников и доноров улучшения минерального состава зерна пшеницы предполагается вести в нескольких направлениях: 1) изучение вариативности концентрации микро- и макроэлементов среди стародавних сортов пшеницы, обладающих большим генетическим разнообразием по сравнению с современными сортами; 2) поиск новых генетических локусов в гермоплазме сородичей пшеницы и создание с их участием доноров целевых генов; 3) разработка и использование новых ДНК-маркеров, полученных на основе данных секвенирования геномов злаков; 4) усовершенствование методов картирования генов/QTL с привлечением биоинформатических подходов для выявления ключевых генов-кандидатов, связанных с накоплением минералов; 5) разработка программ геномной селекции для целенаправленного создания генотипов с биообогащенным минеральным составом. Использование комплекса методов генетической фортификации в сочетании с оптимальными агротехнологическими приемами позволит решить проблему дефицита минеральных нутриентов в продуктах питания.

## Список литературы / References

Аристархов А.Н., Бусыгин А.С., Яковлева Т.А. Влияние селеновых удобрений на продуктивность и элементный состав яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в почвенно-климатических условиях Северо-Восточного Нечерноземья. *Пробл. агрохимии и экологии*. 2018;1:3-12  
[Aristarkhov A.N., Busygin A.S., Yakovleva T.A. Selenium fertilizer effect on the yield and elemental composition of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) in the soil and climatic conditions of the north-east

of Non-Chernozem zone. *Problemy Agrokhimii i Ekologii = Agrochemistry and Ecology Problems*. 2018;1:3-12 (in Russian)]

Василова Н.З., Асхадуллин Д.Ф., Асхадуллин Д.Ф., Багавиева Э.З., Тазутдинова М.Р., Хусаинова И.И. Фиолетовозерный сорт яровой мягкой пшеницы Надира. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2021;4(40):66-75. DOI 10.24412/2309-348X-2021-4-66-75  
[Vasilova N.Z., Askhadullin D.F., Askhadullin D.F., Bagavieva E.Z., Tazutdinova M.R., Khusainova I.I. Violet-green variety of spring soft wheat Nadira. *Zernobobovye i Krupyanye Kultury = Legumes and Groat Crops*. 2021;4(40):66-75. DOI 10.24412/2309-348X-2021-4-66-75 (in Russian)]

Голубкина Н.А., Соколова А.Я., Синдирева А.В. Роль ростоформирующих бактерий в аккумуляции селена растениями. *Овощи России*. 2017;2:81-85. DOI 10.18619/2072-9146-2017-2-81-85

[Golubkina N.A., Sokolova A.J., Sindireva A.V. The role of growth promoting bacteria in selenium accumulation by plants. *Ovoshchi Rossii = Vegetable Crops of Russia*. 2017;2:81-85. DOI 10.18619/2072-9146-2017-2-81-85 (in Russian)]

Гордеева Е.И., Шоева О.Ю., Шаманин В.П., Хлесткина Е.К. Использование молекулярных маркеров в селекции мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с различной антоциановой окраской зерновок. *Письма в Вавилонский журнал генетики и селекции*. 2023;9(2):86-99. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-11

[Gordeeva E.I., Shoeva O.Y., Shamanin V.P., Khlestkina E.K. The molecular markers applying in breeding of spring bread wheat (*Triticum aestivum* L.) lines with different anthocyanin coloration of the grains. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;9(2):86-99. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-11 (in Russian)]

Казнина Н.М., Игнатенко А.А., Батова Ю.В. Содержание меди в корнях и побегах культурных злаков при разных способах обработки салициловой кислотой. *Тр. Карел. науч. центра РАН*. 2022;7:92-99. DOI 10.17076/eb1701

[Kaznina N.M., Ignatenko A.A., Batova Yu.V. Copper content in roots and shoots of cereals under different types of salicylic acid treatment. *Trudy Karelskogo Nauchnogo Tsentra RAN = Transactions of the Karelian Research Centre RAS*. 2022;7:92-99. DOI 10.17076/eb1701 (in Russian)]

Костин В.И., Мударисов Ф.А., Исайчев В.А. Роль микроэлементов в повышении урожайности яровой и озимой пшеницы и улучшении мукомольных и хлебопекарных качеств зерна. Ульяновск: УлГАУ, 2020

[Kostin V.I., Mudarisov F.A., Isaychev V.A. The Role of Microelements in Increasing the Yield of Spring and Winter Wheat and Improving the Milling and Baking Qualities of Grain. Ulyanovsk: UIGAU Publ., 2020 (in Russian)]

Митрофанова О.П., Хакимова А.Г. Новые генетические ресурсы в селекции пшеницы на увеличение содержания белка в зерне. *Вавилонский журнал генетики и селекции*. 2016;20(4):545-554. DOI 10.18699/VJ16.177

[Mitrofanova O.P., Khakimova A.G. New genetic resources in wheat breeding for an increased grain protein content. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2017;7(4):477-487. DOI 10.1134/S2079059717040062]

Потапова Н.А., Злобин А.С., Леонова И.Н., Салина Е.А., Цепилов Я.А. Использование метода BLUP для оценки селекционной ценности образцов мягкой яровой пшеницы по содержанию микро- и макроэлементов в зерне. *Вавилонский журнал генетики и селекции*. 2024;28(4):456-462. DOI 10.18699/vjgb-24-51

[Potapova N.A., Zlobin A.S., Leonova I.N., Salina E.A., Tsepilov Ya.A. The BLUP method in evaluation of breeding value of Russian spring wheat lines using micro- and macroelements in seeds. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(4):456-462. DOI 10.18699/vjgb-24-51]

Савин Т.В., Аbugалиева А.И., Чакмак И., Кожакметов К. Минеральный состав зерна диких сородичей и интрогрессивных форм в селекции пшеницы. *Вавилонский журнал генетики и селекции*. 2018;22(1):88-96. DOI 10.18699/VJ18.335



- [Savin T.V., Abugaliyeva A.I., Cakmak I., Kozhakhmetov K. Mineral composition of wild relatives and introgressive forms in wheat selection. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(1):88-96. DOI 10.18699/VJ18.335 (in Russian)]
- Фисенко А.В., Калмыкова Л.П., Кузнецова Н.Л., Кузьмина Н.П., Ермоленко О.И., Упельник В.П. Селекция фиолетовозерной мягкой пшеницы и ее технологические свойства. *Аграр. Россия*. 2020;10:43-48. DOI 10.30906/1999-5636-2020-10-43-48 [Fisenko A.V., Kalmykova L.P., Kuznetsova N.L., Kuz'mina N.P., Yermolenko O.I., Upelnik V.P. Selection of purple-grain common wheat and its technological properties. *Agrarnaya Rossiya = Agricultural Russia*. 2020;10:43-48. DOI 10.30906/1999-5636-2020-10-43-48 (in Russian)]
- Фитилева З.Е., Сибикеев С.Н. Селекция мягкой пшеницы на продукты функционального питания. *Аграр. науч. журн.* 2023;7:48-55. DOI 10.28983/asj.y2023i7pp48-55 [Fitileva Z.E., Sibikeev S.N. Bread wheat breeding for functional nutrition products. *Agrarnyi Nauchnyi Zhurnal = The Agrarian Scientific Journal*. 2023;7:48-55. DOI 10.28983/asj.y2023i7pp48-55 (in Russian)]
- Чикишев Д.В., Абрамов Н.В., Ларина Н.С., Шерстобитов С.В. Формирование химического состава зерна яровой пшеницы при различном уровне минерального питания. *Изв. вузов. Прикл. химия и биотехнология*. 2020;10(3):496-505. DOI 10.21285/2227-2925-2020-10-3-496-505 [Chikishev D.V., Abramov N.V., Larina N.S., Sherstobitov S.V. Chemical composition of spring wheat at different levels of mineral nutrition. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(3):496-505. DOI 10.21285/2227-2925-2020-10-3-496-505 (in Russian)]
- Шаманин В.П., Флис П., Савин Т.В., Шепелев С.С., Кузьмин О.Г., Чурсин А.С., Потоцкая И.В., Лихенко И.Е., Кушниренко И.Ю., Казак А.А., Чудинов В.А., Шелаева Т.В., Моргунов А.И. Генотипическая и экологическая изменчивость содержания цинка в зерне сортов яровой мягкой пшеницы международного питомника КАСИБ. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(5):543-551. DOI 10.18699/VJ21.061 [Shamanin V.P., Flis P., Savin T.V., Shepelev S.S., Kuzmin O.G., Chursin A.S., Pototskaya I.V., Likhenco I.E., Kushnirenko I.Yu., Kazak A.A., Chudinov V.A., Shelaeva T.V., Morgounov A.I. Genotypic and ecological variability of zinc content in the grain of spring bread wheat varieties in the international nursery KASIB. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(5):543-551. DOI 10.18699/VJ21.061]
- Ali A.A.H. Overview of the vital roles of macro minerals in the human body. *J. Trace Elem. Miner.* 2023;4:100076. DOI 10.1016/j.jtemin.2023.100076
- Ali M., Ahmed I., Tariq H., Abbas S., Zia M.H., Mumtaz A., Sharif M. Growth improvement of wheat (*Triticum aestivum*) and zinc biofortification using potent zinc-solubilizing bacteria. *Front. Plant Sci.* 2023;14:1140454. DOI 10.3389/fpls.2023.1140454
- Alomari D.Z., Eggert K., Von Wirén N., Pillen K., Röder M.S. Genome-wide association study of calcium accumulation in grains of European wheat cultivars. *Front. Plant Sci.* 2017;8:1797. DOI 10.3389/fpls.2017.01797
- Alomari D.Z., Eggert K., Von Wirén N., Polley A., Plieske J., Ganal M.W., Liu F., Pillen K., Röder M.S. Whole-genome association mapping and genomic prediction for iron concentration in wheat grains. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(1):76. DOI 10.3390/ijms20010076
- Alvarez J.B., Guzmán C. Interspecific and intergeneric hybridization as a source of variation for wheat grain quality improvement. *Theor. Appl. Genet.* 2018;131(2):225-251. DOI 10.1007/s00122-017-3042-x
- Andersson M.S., Saltzman A., Virk P.S., Pfeiffer W.H. Progress update: crop development of biofortified staple food crops under HarvestPlus. *Afr. J. Food Agric. Nutr. Dev.* 2017;17(2):11905-11935. DOI 10.18697/ajfand.78.HarvestPlus05
- Bhatta M., Stephen Baenziger P., Waters B.M., Poudel R., Belamkar V., Poland J., Morgounov A. Genome-wide association study reveals novel genomic regions associated with 10 grain minerals in synthetic hexaploid wheat. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(10):3237. DOI 10.3390/ijms19103237
- Bouis H.E., Saltzman A. Improving nutrition through biofortification: a review of evidence from HarvestPlus, 2003 through 2016. *Glob. Food Sec.* 2017;12:49-58. DOI 10.1016/j.gfs.2017.01.009
- Butt M.S., Ihsanullah Qamar M., Anjum F.M., Aziz A., Randhawa M.A. Development of minerals-enriched brown flour by utilizing wheat milling by-products. *Nutr. Food Sci.* 2004;34(4):161-165. DOI 10.1108/00346650410544855
- Cabas-Lühmann P., Schwember A.R., Arriagada O., Marcotuli I., Matus I., Alfaro C., Gadaleta A. Meta-QTL analysis and candidate genes for quality traits, mineral content, and abiotic-related traits in wild emmer. *Front. Plant Sci.* 2024;15:1305196. DOI 10.3389/fpls.2024.1305196
- Cakmak I., Torun A., Özkan H., Millet E., Feldman M., Fahima T., Korol A., Nevo E., Braun H.J. *Triticum dicoccoides*: an important genetic resource for increasing zinc and iron concentration in modern cultivated wheat. *Soil Sci. Plant Nutr.* 2004;50(7):1047-1054. DOI 10.1080/00380768.2004.10408573
- Cakmak I., Pfeiffer W.H., McClafferty B. Biofortification of durum wheat with zinc and iron. *Cereal Chem.* 2010;87(1):10-20. DOI 10.1094/CCHEM-87-1-0010
- Caldelas C., Rezzouk F.Z., Aparicio Gutiérrez N., Diez-Fraile M.C., Araus Ortega J.L. Interaction of genotype, water availability, and nitrogen fertilization on the mineral content of wheat grain. *Food Chem.* 2023;404:134565. DOI 10.1016/j.foodchem.2022.134565
- Calderini D.F., Ortiz-Monasterio I. Are synthetic hexaploids a means of increasing grain element concentrations in wheat? *Euphytica*. 2003;134(2):169-178. DOI 10.1023/B:EUPH.0000003849.10595.ac
- Chatzav M., Peleg Z., Ozturk L., Yazici A., Fahima T., Cakmak I., Saranga Y. Genetic diversity for grain nutrients in wild emmer wheat: potential for wheat improvement. *Ann. Bot.* 2010;105(7):1211-1220. DOI 10.1093/aob/mcq024
- Ciudad-Mulero M., Matallana-González M.C., Callejo M.J., Carrillo J.M., Morales P., Fernández-Ruiz V. Durum and bread wheat flours. Preliminary mineral characterization and its potential health claims. *Agronomy*. 2021;11:108. DOI 10.3390/agronomy11010108
- Collard B.C.Y., Mackill D.J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2008;363(1491):557-572. DOI 10.1098/rstb.2007.2170
- Crespo-Herrera L.A., Velu G., Singh R.P. Quantitative trait loci mapping reveals pleiotropic effect for grain iron and zinc concentrations in wheat. *Ann. Appl. Biol.* 2016;169(1):27-35. DOI 10.1111/aab.12276
- Crespo-Herrera L.A., Govindan V., Stangoulis J., Hao Y., Singh R.P. QTL mapping of grain Zn and Fe concentrations in two hexaploid wheat RIL populations with ample transgressive segregation. *Front. Plant Sci.* 2017;8:01800. DOI 10.3389/fpls.2017.01800
- De Santis M.A., Soccio M., Laus M.N., Flagella Z. Influence of drought and salt stress on durum wheat grain quality and composition: a review. *Plants*. 2021;10(12):2599. DOI 10.3390/plants10122599
- De Vita P., Platani C., Fragasso M., Ficco D.B.M., Colecchia S.A., Del Nobile M.A., Padalino L., Di Gennaro S., Petrozza A. Selenium-enriched durum wheat improves the nutritional profile of pasta without altering its organoleptic properties. *Food Chem.* 2017;214:374-382. DOI 10.1016/j.foodchem.2016.07.015
- Dhua S., Kumar K., Kumar Y., Singh L., Sharanagat V.S. Composition, characteristics and health promising prospects of black wheat: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 2021;112:780-794. DOI 10.1016/j.tifs.2021.04.037
- Faber M., Berti C., Smuts M. Prevention and control of micronutrient deficiencies in developing countries: current perspectives. *Nutr. Diet. Suppl.* 2014;6:41-57. DOI 10.2147/nds.s43523



- Fan M.S., Zhao F.J., Fairweather-Tait S.J., Poulton P.R., Dunham S.J., McGrath S.P. Evidence of decreasing mineral density in wheat grain over the last 160 years. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2008;22(4):315-324. DOI 10.1016/j.jtemb.2008.07.002
- Farkas A., Molnár I., Dulai S., Rapi S., Oldal V., Cseh A., Kruppa K., Molnár-Láng M. Increased micronutrient content (Zn, Mn) in the 3M<sup>b</sup>(4B) wheat-*Aegilops biuncialis* substitution and 3M<sup>b</sup>.4BS translocation identified by GISH and FISH. *Genome.* 2014;57(2):61-67. DOI 10.1139/gen-2013-0204
- Ficco D.B.M., Riefolo C., Nicasro G., De Simone V., Di Gesù A.M., Beleggia R., Platani C., Cattivelli L., De Vita P. Phytate and mineral elements concentration in a collection of Italian durum wheat cultivars. *Field Crop. Res.* 2009;111(3):235-242. DOI 10.1016/j.fcr.2008.12.010
- Ficco D.B.M., De Simone V., Colecchia S.A., Pecorella I., Platani C., Nigro F., Finocchiaro F., Papa R., De Vita P. Genetic variability in anthocyanin composition and nutritional properties of blue, purple, and red bread (*Triticum aestivum* L.) and durum (*Triticum turgidum* L. ssp. *turgidum* convar. *durum*) wheats. *J. Agric. Food Chem.* 2014;62(34):8686-8695. DOI 10.1021/jf5003683
- Garcia-Oliveira A.L., Chander S., Ortiz R., Menkir A., Gedil M. Genetic basis and breeding perspectives of grain iron and zinc enrichment in cereals. *Front. Plant Sci.* 2018;9:937. DOI 10.3389/fpls.2018.00937
- Garg M., Sharma N., Sharma S., Kapoor P., Kumar A., Chunduri V., Arora P. Biofortified crops generated by breeding, agronomy, and transgenic approaches are improving lives of millions of people around the world. *Front. Nutr.* 2018;5:12. DOI 10.3389/fnut.2018.00012
- Garvin D.F., Welch R.M., Finley J.W. Historical shifts in the seed mineral micronutrient concentration of US hard red winter wheat germplasm. *J. Sci. Food Agric.* 2006;86(13):2213-2220. DOI 10.1002/jsfa.2601
- Genchi G., Carocci A., Lauria G., Sinicropi M.S., Catalano A. Nickel: human health and environmental toxicology. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2020;17(3):679. DOI 10.3390/ijerph17030679
- Gupta O.P., Singh A.K., Singh A., Singh G.P., Bansal K.C., Datta S.K. Wheat biofortification: utilizing natural genetic diversity, genome-wide association mapping, genomic selection, and genome editing technologies. *Front. Nutr.* 2022;9:826131. DOI 10.3389/fnut.2022.826131
- Gupta P.K., Balyan H.S., Sharma S., Kumar R. Genetics of yield, abiotic stress tolerance and biofortification in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2020;133:1569-1602. DOI 10.1007/s00122-020-03583-3
- Gupta P.K., Balyan H.S., Sharma S., Kumar R. Biofortification and bioavailability of Zn, Fe and Se in wheat: present status and future prospects. *Theor. Appl. Genet.* 2021;134:1-35. DOI 10.1007/s00122-020-03709-7
- Hao Y., Velu G., Peña R.J., Singh S., Singh R.P. Genetic loci associated with high grain zinc concentration and pleiotropic effect on kernel weight in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol. Breed.* 2014;34(4):1893-1902. DOI 10.1007/s11032-014-0147-7
- Hao Y., Kong F., Wang L., Zhao Yu, Li M., Che N., Li S., Wang M., Hao M., Zhang X., Zhao Y. Genome-wide association study of grain micronutrient concentrations in bread wheat. *J. Integr. Agric.* 2024; 23(5):1468-1480. DOI 10.1016/j.jia.2023.06.030
- Hassan M.U., Chattha M.U., Ullah A., Khan I., Qadeer A., Aamer M., Khan A.U., Nadeem F., Khan T.A. Agronomic biofortification to improve productivity and grain Zn concentration of bread wheat. *Int. J. Agric. Biol.* 2019;21:615-620. DOI 10.17957/IJAB/15.0936
- Helguera M., Abugalieva A., Battenfield S., Békés F., Branlard G., Cuniberti M., Hüskén A., Johansson E., Morris C.F., Nurit E., Sissons M., Vazquez D. Grain quality in breeding. In: Igrejas G., Ikeda T.M., Guzmán C. (Eds.) *Wheat Quality for Improving Processing and Human Health.* Switzerland: Springer, 2020;273-308. DOI 10.1007/978-3-030-34163-3
- Islam M.R., Akash S., Jony M.H., Alam M.N., Nowrin F.T., Rahman M.M., Rauf A., Thiruvengadam M. Exploring the potential function of trace elements in human health: a therapeutic perspective. *Mol. Cell. Biochem.* 2023;478(10):2141-2171. DOI 10.1007/s11010-022-04638-3
- Jaskulska I., Jaskulski D., Gałęzewski L., Knapowski T., Kozera W., Waclawowicz R. Mineral composition and baking value of the winter wheat grain under varied environmental and agronomic conditions. *J. Chem.* 2018;2018:5013825. DOI 10.1155/2018/5013825
- Jomova K., Makova M., Alomar S.Y., Alwasel S.H., Nepovimova E., Kuca K., Rhodes C.J., Valko M. Essential metals in health and disease. *Chem. Biol. Interact.* 2022;367:110173. DOI 10.1016/j.cbi.2022.110173
- Juliana P., Govindan V., Crespo-Herrera L., Mondal S., Huerta-Espino J., Shrestha S., Poland J., Singh R.P. Genome-wide association mapping identifies key genomic regions for grain zinc and iron biofortification in bread wheat. *Front. Plant Sci.* 2022;13:903819. DOI 10.3389/fpls.2022.903819
- Kamble U., Mishra C.N., Govindan V., Sharma A.K., Pawar S., Kumar S., Krishnappa G., Gupta O.P., Singh G.P., Singh G. Ensuring nutritional security in India through wheat biofortification: a review. *Genes.* 2022;13(12):2298. DOI 10.3390/genes13122298
- Kaur H., Sharma P., Kumar J., Singh V.K., Vasistha N.K., Gahlaut V., Tyagi V., Verma S.K., Singh S., Dhaliwal H.S., Sheikh I. Genetic analysis of iron, zinc and grain yield in wheat-*Aegilops* derivatives using multi-locus GWAS. *Mol. Biol. Rep.* 2023;50(11):9191-9202. DOI 10.1007/s11033-023-08800-y
- Khan M.I.R., Nazir F., Maheshwari C., Chopra P., Chhillar H., Sreenivasulu N. Mineral nutrients in plants under changing environments: a road to future food and nutrition security. *Plant Genome.* 2023;16(4):e20362. DOI 10.1002/tpg2.20362
- Khokhar J.S., Sareen S., Tyagi B.S., Singh G., Wilson L., King I.P., Young S.D., Broadley M.R. Variation in grain Zn concentration, and the grain ionome, in field-grown Indian wheat. *PLoS One.* 2018; 13(1):e0192026. DOI 10.1371/journal.pone.0192026
- Krishnappa G., Rathana N.D., Sehgal D., Ahlawat A.K., Singh Santosh K., Singh Sumit K., Shukla R.B., Jaiswal J.P., Solanki I.S., Singh G.P., Singh A.M. Identification of novel genomic regions for biofortification traits using an SNP marker-enriched linkage map in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Front. Nutr.* 2021;8:669444. DOI 10.3389/fnut.2021.669444
- Kumari A., Sharma S., Sharma N., Chunduri V., Kapoor P., Kaur S., Goyal A., Garg M. Influence of biofortified colored wheats (purple, blue, black) on physicochemical, antioxidant and sensory characteristics of chapatti (Indian flatbread). *Molecules.* 2020;25:5071. DOI 10.3390/molecules25215071
- Kutman U.B., Yildiz B., Cakmak I. Improved nitrogen status enhances zinc and iron concentrations both in the whole grain and the endosperm fraction of wheat. *J. Cereal Sci.* 2011;53(1):118-125. DOI 10.1016/j.jcs.2010.10.006
- Liu J., Huang L., Li T., Liu Y., Yan Z., Tang G., Zheng Y., Liu D., Wu B. Genome-wide association study for grain micronutrient concentrations in wheat advanced lines derived from wild emmer. *Front. Plant Sci.* 2021;12:651283. DOI 10.3389/fpls.2021.651283
- Liu Y., Huang S., Jiang Z., Wang Y., Zhang Z. Selenium biofortification modulates plant growth, microelement and heavy metal concentrations, selenium uptake, and accumulation in black-grained wheat. *Front. Plant Sci.* 2021;12:748523. DOI 10.3389/fpls.2021.748523
- Lockyer S., White A., Buttriss J.L. Biofortified crops for tackling micronutrient deficiencies – what impact are these having in developing countries and could they be of relevance within Europe? *Nutr. Bull.* 2018;43(4):319-357. DOI 10.1111/nbu.12347
- Ma X., Luo W., Li J., Wu F. Arbuscular mycorrhizal fungi increase both concentrations and bioavailability of Zn in wheat (*Triticum aestivum* L.) grain on Zn-spiked soils. *Appl. Soil Ecol.* 2019;135:91-97. DOI 10.1016/j.apsoil.2018.11.007

- Manickavelu A., Hattori T., Yamaoka S., Yoshimura K., Kondou Y., Onogi A., Matsui M., Iwata H., Ban T. Genetic nature of elemental contents in wheat grains and its genomic prediction: toward the effective use of wheat landraces from Afghanistan. *PLoS One*. 2017; 12(1):e0169416. DOI 10.1371/journal.pone.0169416
- Marschner H. Mineral Nutrition of Higher Plants. Acad. Press, 1995. DOI 10.1016/C2009-0-02402-7
- Monasterio I., Graham R.D. Breeding for trace minerals in wheat. *Food Nutr. Bull.* 2000;21(4):392-396. DOI 10.1177/156482650002100409
- Morgounov A., Li H., Shepelev S., Ali M., Flis P., Koxsel H., Savin T., Shamanin V. Genetic characterization of spring wheat germplasm for macro-, microelements and trace metals. *Plants*. 2022;11(16): 2173. DOI 10.3390/plants11162173
- Murphy K.M., Reeves P.G., Jones S.S. Relationship between yield and mineral nutrient concentrations in historical and modern spring wheat cultivars. *Euphytica*. 2008;163(3):381-390. DOI 10.1007/s10681-008-9681-x
- Niyigaba E., Twizerimana A., Mugenzi I., Ngnadong W.A. Winter wheat grain quality, zinc and iron concentration affected by a combined foliar spray of zinc and iron fertilizers. *Agronomy*. 2019;9(5):250. DOI 10.3390/agronomy9050250
- Oury F.X., Leenhardt F., Rémésy C., Chanliaud E., Duperrier B., Balfourier F., Charmet G. Genetic variability and stability of grain magnesium, zinc and iron concentrations in bread wheat. *Eur. J. Agron.* 2006;25(2):177-185. DOI 10.1016/j.eja.2006.04.011
- Padhy A.K., Kaur P., Singh S., Kashyap L., Sharma A. Colored wheat and derived products: key to global nutritional security. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2022;64(7):1894-1910. DOI 10.1080/10408398.2022.2119366
- Pasqualone A., Bianco A.M., Paradiso V.M., Summo C., Gambacorta G., Caponio F., Blanco A. Production and characterization of functional biscuits obtained from purple wheat. *Food Chem.* 2015; 180:64-70. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.02.025
- Peleg Z., Saranga Y., Yazici A., Fahima T., Ozturk L., Cakmak I. Grain zinc, iron and protein concentrations and zinc-efficiency in wild emmer wheat under contrasting irrigation regimes. *Plant Soil*. 2008;306(1-2):57-67. DOI 10.1007/s11104-007-9417-z
- Peleg Z., Cakmak I., Ozturk L., Yazici A., Jun Y., Budak H., Korol A.B., Fahima T., Saranga Y. Quantitative trait loci conferring grain mineral nutrient concentrations in durum wheat × wild emmer wheat RIL population. *Theor. Appl. Genet.* 2009;119(2):353-369. DOI 10.1007/s00122-009-1044-z
- Peterson C.J., Jonson V.A., Mattern P.J. Influence of cultivar and environment on mineral and protein concentration of wheat flour, bran, and grain. *Cereal Chem.* 1986;63(3):183-186
- Phuong L.M., Lachman J., Kotíková Z., Orsák M., Michlová T., Martinek P. Selenium in colour-grained winter wheat and spring tritordeum. *Plant Soil Environ.* 2017;63(7):315-321. DOI 10.17221/259/2017-PSE
- Potapova N.A., Timoshchuk A.N., Tiys E.S., Vinichenko N.A., Leonova I.N., Salina E.A., Tsepilov Y.A. Multivariate genome-wide association study of concentrations of seven elements in seeds reveals four new loci in Russian wheat lines. *Plants*. 2023;12(17): 12173019. DOI 10.3390/plants12173019
- Prashanth L., Kattapagari K., Chitturi R., Baddam V.R., Prasad L. A review on role of essential trace elements in health and disease. *J. Dr. NTR Univ. Heal. Sci.* 2015;4(2):75-85. DOI 10.4103/2277-8632.158577
- Pu Z.E., Yu M., He Q.Y., Chen G.Y., Wang J.R., Liu Y.X., Jiang Q.T., Li W., Dai S.F., Wei Y.M., Zheng Y.L. Quantitative trait loci associated with micronutrient concentrations in two recombinant inbred wheat lines. *J. Integr. Agric.* 2014;13(11):2322-2329. DOI 10.1016/S2095-3119(13)60640-1
- Qiao L., Wheeler J., Wang R., Isham K., Klassen N., Zhao W., Su M., Zhang J., Zheng J., Chen J. Novel quantitative trait loci for grain cadmium content identified in hard white spring wheat. *Front. Plant Sci.* 2021;12:756741. DOI 10.3389/fpls.2021.756741
- Rachoń L., Palys E., Szumiło G. Comparison of the chemical composition of spring durum wheat grain (*Triticum durum*) and common wheat grain (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare*). *J. Elem.* 2012;17(1): 105-114. DOI 10.5601/jelem.2012.17.1.10
- Rana A., Joshi M., Prasanna R., Shivay Y.S., Nain L. Biofortification of wheat through inoculation of plant growth promoting rhizobacteria and cyanobacteria. *Eur. J. Soil Biol.* 2012;50:118-126. DOI 10.1016/j.ejsobi.2012.01.005
- Rathan N.D., Krishna H., Ellur R.K., Sehgal D., Govindan V., Ahlawat A.K., Krishnappa G., Jaiswal J.P., Singh J.B., Sv S., Ambati D., Singh S.K., Bajpai K., Mahendru-Singh A. Genome-wide association study identifies loci and candidate genes for grain micronutrients and quality traits in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Sci. Rep.* 2022;12(1):7037. DOI 10.1038/s41598-022-10618-w
- Salantur A., Karaoğlu C. Macro-microelements in wheat landraces and their use in breeding. In: Zencirci N., Baloch F.S., Habyarimana E., Chung G. (Eds.) *Wheat Landraces*. Cham: Springer, 2021;83-91. DOI 10.1007/978-3-030-77388-5\_5
- Saquee F.S., Diakite S., Kavhiza N.J., Pakina E., Zargar M. The efficacy of micronutrient fertilizers on the yield formulation and quality of wheat grains. *Agronomy*. 2023;13(2):566. DOI 10.3390/agronomy13020566
- Shariatipour N., Heidari B., Tahmasebi A., Richards C. Comparative genomic analysis of quantitative trait loci associated with micronutrient contents, grain quality, and agronomic traits in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Front. Plant Sci.* 2021;12:709817. DOI 10.3389/fpls.2021.709817
- Sharma N., Kumari A., Chunduri V., Kaur S., Banda J., Goyal A., Garg M. Anthocyanin biofortified black, blue and purple wheat exhibited lower amino acid cooking losses than white wheat. *LWT – Food Sci. Technol.* 2022;154:112802. DOI 10.1016/j.lwt.2021.112802
- Sharma S., Chunduri V., Kumar A., Kumar R., Khare P., Kondepudi K.K. Anthocyanin bio-fortified colored wheat: nutritional and functional characterization. *PLoS One*. 2018;13:e0194367. DOI 10.1371/journal.pone.0194367
- Shepelev S., Morgounov A., Flis P., Koxsel H., Li H., Savin T., Sharma R., Wang J., Shamanin V. Variation of macro- and microelements, and trace metals in spring wheat genetic resources in Siberia. *Plants*. 2022;11(2):149. DOI 10.3390/plants11020149
- Shewry P.R. Wheat. *J. Exp. Bot.* 2009a;60(6):1537-1553. DOI 10.1093/jxb/erp058
- Shewry P.R. The HEALTHGRAIN programme opens new opportunities for improving wheat for nutrition and health. *Nutr. Bull.* 2009b; 34(2):225-231. DOI 10.1111/j.1467-3010.2009.01747.x
- Shewry P.R., Brouns F., Dunn J., Hood J., Burridge A.J., America A.H.P., Gilissen L., Proos-Huijsmans Z.A.M., van Straaten J.P., Jonkers D., Lazzeri P.A., Ward J.L., Lovegrove A. Comparative compositions of grain of tritordeum, durum wheat and bread wheat grown in multi-environment trials. *Food Chem.* 2023;423:136312. DOI 10.1016/j.foodchem.2023.136312
- Shi R., Zhang Y., Chen X., Sun Q., Zhang F., Römheld V., Zou C. Influence of long-term nitrogen fertilization on micronutrient density in grain of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Cereal Sci.* 2010; 51(1):165-170. DOI 10.1016/j.jcs.2009.11.008
- Shi X., Zhou Z., Li W., Qin M., Yang P., Hou J., Huang F., Lei Z., Wu Z., Wang J. Genome-wide association study reveals the genetic architecture for calcium accumulation in grains of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biol.* 2022;22(1):229. DOI 10.1186/s12870-022-03602-z
- Shiferaw B., Smale M., Braun H.J., Duveiller E., Reynolds M., Muricho G. Crops that feed the world 10. Past successes and future challenges to the role played by wheat in global food security. *Food Secur.* 2013;5(3):291-317. DOI 10.1007/s12571-013-0263-y
- Shoormij F., Mirlohi A., Saeidi G., Shirvani M. Combined foliar application of Zn and Fe increases grain micronutrient concentrations and alleviates water stress across diverse wheat species and ploidal levels. *Sci. Rep.* 2022;12(1):20328. DOI 10.1038/s41598-022-24868-1

- Singh R., Saripalli G., Gautam T., Kumar A., Jan I., Batra R., Kumar J., Kumar R., Balyan H.S., Sharma S., Gupta P.K. Meta-QTLs, ortho-MetaQTLs and candidate genes for grain Fe and Zn contents in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 2022; 28(3):637-650. DOI 10.1007/s12298-022-01149-9
- Srinivasa J., Arun B., Mishra V.K., Singh G.P., Velu G., Babu R., Vasishta N.K., Joshi A.K. Zinc and iron concentration QTL mapped in a *Triticum spelta* × *T. aestivum* cross. *Theor. Appl. Genet.* 2014; 127(7):1643-1651. DOI 10.1007/s00122-014-2327-6
- Stepien A., Wojtkowiak K. Effect of foliar application of Cu, Zn, and Mn on yield and quality indicators of winter wheat grain. *Chil. J. Agric. Res.* 2016;76(2):220-227. DOI 10.4067/S0718-58392016000200012
- Sun M., Luo Q., Zheng Q., Tong J., Wang Y., Song J., Zhang Y., Pu Z., Zheng J., Liu L., Zhou A., Rasheed A., Li M., Cao S., Xia X., He Z., Hao Y. Molecular characterization of stable QTL and putative candidate genes for grain zinc and iron concentrations in two related wheat populations. *Theor. Appl. Genet.* 2023;136:217. DOI 10.1007/s00122-023-04467-y
- Sun Z., Yue Z., Liu H., Ma K., Li C. Microbial-assisted wheat iron biofortification using endophytic *Bacillus altitudinis* WR10. *Front. Nutr.* 2021;8:704030. DOI 10.3389/fnut.2021.704030
- Tadesse W., Sanchez-Garcia M., Assefa S.G., Amri A., Bishaw Z., Ogbonnaya F.C., Baum M. Genetic gains in wheat breeding and its role in feeding the world. *Crop Breed. Genet. Genom.* 2019;1:e190005. DOI 10.20900/cb20190005
- Tadesse W., Gataa Z.E., Rachdad F.E., Baouchi A.E., Kehel Z., Alemu A. Single- and multi-trait genomic prediction and genome-wide association analysis of grain yield and micronutrient-related traits in ICARDA wheat under drought environment. *Mol. Genet. Genomics.* 2023;298(6):1515-1526. DOI 10.1007/s00438-023-02074-6
- Tian S.Q., Chen Z.C., Wei Y.C. Measurement of colour-grained wheat nutrient compounds and the application of combination technology in dough. *J. Cereal Sci.* 2018;83:63-67. DOI 10.1016/j.jcs.2018.07.018
- Tibbs Cortes L., Zhang Z., Yu J. Status and prospects of genome-wide association studies in plants. *Plant Genome.* 2021;14(1):20077. DOI 10.1002/tpg2.20077
- Tiwari V.K., Rawat N., Chhuneja P., Neelam K., Aggarwal R., Randhawa G.S., Dhaliwal H.S., Keller B., Singh K. Mapping of quantitative trait loci for grain iron and zinc concentration in diploid A genome wheat. *J. Hered.* 2009;100(6):771-776. DOI 10.1093/jhered/esp030
- Uauy C., Distelfeld A., Fahima T., Blechl A., Dubcovsky J. A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science.* 2006;314(5803):1298-1301. DOI 10.1126/science.1133649
- Van Der Kamp J.W., Poutanen K., Seal C.J., Richardson D.P. The HEALTHGRAIN definition of “whole grain”. *Food Nutr. Res.* 2014; 58(10):22100. DOI 10.3402/fnr.v58.22100
- Velu G., Ortiz-Monasterio I., Cakmak I., Hao Y., Singh R.P. Biofortification strategies to increase grain zinc and iron concentrations in wheat. *J. Cereal Sci.* 2014;59(3):365-372. DOI 10.1016/j.jcs.2013.09.001
- Velu G., Singh R.P., Huerta J., Guzmán C. Genetic impact of *Rht* dwarfing genes on grain micronutrients concentration in wheat. *Field Crop. Res.* 2017a;214:373-377. DOI 10.1016/j.fcr.2017.09.030
- Velu G., Singh R.P., Cardenas M.E., Wu B., Guzman C., Ortiz-Monasterio I. Characterization of grain protein content gene (*GPC-B1*) introgression lines and its potential use in breeding for enhanced grain zinc and iron concentration in spring wheat. *Acta Physiol. Plant.* 2017b;39(9):212. DOI 10.1007/s11738-017-2509-3
- Velu G., Tutus Y., Gomez-Becerra H.F., Hao Y., Demir L., Kara R., Crespo-Herrera L.A., Orhan S., Yazici A., Singh R.P., Cakmak I. QTL mapping for grain zinc and iron concentrations and zinc efficiency in a tetraploid and hexaploid wheat mapping populations. *Plant Soil.* 2017c;411(1-2):81-99. DOI 10.1007/s11104-016-3025-8
- Verma S., Chakdar H., Kumar M., Varma A., Saxena A.K. Microorganisms as a sustainable alternative to traditional biofortification of iron and zinc: status and prospect to combat hidden hunger. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 2021;21(2):1700-1717. DOI 10.1007/s42729-021-00473-5
- Vincent J.B. New evidence against chromium as an essential trace element. *J. Nutr.* 2017;147(12):2212-2219. DOI 10.3945/jn.117.255901
- Wang P., Wang H., Liu Q., Tian X., Shi Y., Zhang X. QTL mapping of selenium content using a RIL population in wheat. *PLoS One.* 2017;12(9):e0184351. DOI 10.1371/journal.pone.0184351
- Wang S., Yin L., Tanaka H., Tanaka K., Tsujimoto H. Wheat-*Aegilops* chromosome addition lines showing high iron and zinc contents in grains. *Breed. Sci.* 2011;61(2):189-195. DOI 10.1270/jsbbs.61.189
- Wang W., Guo H., Wu C., Yu H., Li X., Chen G., Tian J., Deng Z. Identification of novel genomic regions associated with nine mineral elements in Chinese winter wheat grain. *BMC Plant Biol.* 2021; 21(1):311. DOI 10.1186/s12870-021-03105-3
- Wang Y., Xu X., Hao Y., Zhang Y., Liu Y., Pu Z., Tian Y., Xu D., Xia X., He Z., Zhang Y. QTL mapping for grain zinc and iron concentrations in bread wheat. *Front. Nutr.* 2021;8:680391. DOI 10.3389/fnut.2021.680391
- Xia Q., Yang Z., Shui Y., Liu X., Chen J., Khan S., Wang J., Gao Z. Methods of selenium application differentially modulate plant growth, selenium accumulation and speciation, protein, anthocyanins and concentrations of mineral elements in purple-grained wheat. *Front. Plant Sci.* 2020;11:1114. DOI 10.3389/fpls.2020.01114
- Yadav R., Ror P., Rathore P., Ramakrishna W. Bacteria from native soil in combination with arbuscular mycorrhizal fungi augment wheat yield and biofortification. *Plant Physiol. Biochem.* 2020;150:222-233. DOI 10.1016/j.plaphy.2020.02.039
- Zeibig F., Kilian B., Frei M. The grain quality of wheat wild relatives in the evolutionary context. *Theor. Appl. Genet.* 2022;135(11):4029-4048. DOI 10.1007/s00122-021-04013-8
- Zeibig F., Kilian B., Özkan H., Pantha S., Frei M. Grain quality traits within the wheat (*Triticum* spp.) gene pool: prospects for improved nutrition through de novo domestication. *J. Sci. Food Agric.* 2024; 104(7):4400-4410. DOI 10.1002/jsfa.13328
- Zhao F.J., Su Y.H., Dunham S.J., Rakszegi M., Bedo Z., McGrath S.P., Shewry P.R. Variation in mineral micronutrient concentrations in grain of wheat lines of diverse origin. *J. Cereal Sci.* 2009;49(2):290-295. DOI 10.1016/j.jcs.2008.11.007
- Zou C.Q., Zhang Y.Q., Rashid A., Ram H., Savasli E., Arisoy R.Z., Ortiz-Monasterio I., Simunji S., Wang Z.H., Sohu V., Hassan M., Kaya Y., Onder O., Lungu O., Mujahid M.Y., Joshi A.K., Zelenkiy Y., Zhang F.S., Cakmak I. Biofortification of wheat with zinc through zinc fertilization in seven countries. *Plant Soil.* 2012; 361(1-2):119-130. DOI 10.1007/s11104-012-1369-2

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

Поступила в редакцию 26.04.2024. После доработки 23.05.2024. Принята к публикации 27.05.2024.



DOI 10.18699/vjgb-24-60

## Использование генетического потенциала родов *Thinopyrum* и *Agropyron* для защиты пшеницы от болезней и абиотических стрессов

Л.Я. Плотникова  , В.В. Кнауб 

Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, Омск, Россия

 lya.plotnikova@omgau.org

**Аннотация.** Мягкая пшеница – одна из важнейших продовольственных культур в мире. Сборы ее зерна можно увеличить, сократив потери от болезней и стрессов окружающей среды. Третичный генофонд, включая виды рода *Thinopyrum*, является ценным ресурсом для увеличения генетического разнообразия и повышения устойчивости пшеницы к грибным заболеваниям и абиотическим стрессам. Отдаленная гибридизация между пшеницей и *Thinopyrum* spp. была начата в 1920-х гг. в России и позднее продолжена в разных странах. Основные результаты получены с использованием видов *Th. ponticum* и *Th. intermedium*. Дополнительно был создан интрогрессивный материал на основе видов *Th. elongatum*, *Th. bessarabicum*, *Th. junceaforme*, *Agropyron cristatum*. В статье приведен обзор результатов применения генетического материала видов рода *Thinopyrum* для повышения устойчивости пшеницы к болезням (бурой, стеблевой и желтой ржавчине, мучнистой росе, фузариозу колоса и септориозным пятнистостям) и абиотическим стрессам (засухе, экстремальным температурам и засолению). Описаны подходы к улучшению агрономических свойств интрогрессивного селекционного материала (применение радиации, *ph*-мутантов и компенсирующих робертсоновских транслокаций). Проанализирован опыт длительной защиты пшеницы от листовой и стеблевой ржавчины в мире с помощью ряда генов третичного генофонда. Вид *Th. ponticum* является нехозяином для *Puccinia triticina* (*Ptr*) и *P. graminis* f. sp. *tritici* (*Pgt*) и подавляет развитие ржавчинных грибов на поверхности растений. Образцы пшеницы с пырейными генами *Lr19*, *Lr38*, *Sr24*, *Sr25* и *Sr26* проявляют защитные механизмы, сходные с механизмами нехозяев, что приводит к нарушению развития поверхностных инфекционных структур и гибели грибов при попытке внедрения в устьица (прегаусториальная устойчивость или устьичный иммунитет). Очевидно, изменение химических свойств поверхностных структур рас, вирулентных к *Lr19*, *Lr24*, *Sr24*, *Sr25* и *Sr26*, приводит к снижению их приспособленности к среде, что влияет на длительность устойчивости сортов к ржавчинным болезням. Чужеродные гены с аналогичным эффектом представляют интерес для селекции сортов с длительной устойчивостью к ржавчинным заболеваниям, а также конструирования культуры с помощью молекулярных технологий.

**Ключевые слова:** селекция пшеницы; третичный генофонд; *Thinopyrum*; *Agropyron*; интрогрессия; устойчивость к болезням и абиотическим стрессам; устойчивость нехозяев; длительная устойчивость.

**Для цитирования:** Плотникова Л.Я., Кнауб В.В. Использование генетического потенциала родов *Thinopyrum* и *Agropyron* для защиты пшеницы от болезней и абиотических стрессов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(5):536-553. DOI 10.18699/vjgb-24-60


**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 22-24-20067), <https://rscf.ru/project/22-24-20067>.

**Прозрачность финансовой деятельности.** Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

## Exploitation of the genetic potential of *Thinopyrum* and *Agropyron* genera to protect wheat from diseases and environmental stresses

L.Ya. Plotnikova  , V.V. Knaub 

Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Omsk, Russia

 lya.plotnikova@omgau.org

**Abstract.** Common wheat is one of the most important food crops in the world. Grain harvests can be increased by reducing losses from diseases and environmental stresses. The tertiary gene pool, including *Thinopyrum* spp., is a valuable resource for increasing genetic diversity and wheat resistance to fungal diseases and abiotic stresses. Distant hybridization between wheat and *Thinopyrum* spp. began in the 1920s in Russia, and later continued in different countries. The main results were obtained using the species *Th. ponticum* and *Th. intermedium*. Additionally, introgression



material was created based on *Th. elongatum*, *Th. bessarabicum*, *Th. junceaforme*, *Agropyron cristatum*. The results of introgression for resistance to diseases (leaf, stem, and stripe rusts; powdery mildew; *Fusarium* head blight; and *Septoria* blotch) and abiotic stresses (drought, extreme temperatures, and salinity) to wheat was reviewed. Approaches to improving the agronomic properties of introgression breeding material (the use of irradiation, *ph*-mutants and compensating Robertsonian translocations) were described. The experience of long-term use in the world of a number of genes from the tertiary gene pool in protecting wheat from leaf and stem rust was observed. *Th. ponticum* is a nonhost for *Puccinia triticina* (*Ptr*) and *P. graminis* f. sp. *tritici* (*Pgt*) and suppresses the development of rust fungi on the plant surface. Wheat samples with the tall wheatgrass genes *Lr19*, *Lr38*, *Sr24*, *Sr25* and *Sr26* showed defence mechanisms similar to nonhosts resistance. Their influence led to disruption of the development of surface infection structures and fungal death when trying to penetrate the stomata (prehaustorial resistance or stomatal immunity). Obviously, a change in the chemical properties of fungal surface structures of races virulent to *Lr19*, *Lr24*, *Sr24*, *Sr25*, and *Sr26* leads to a decrease in their adaptability to the environment. This possibly determined the durable resistance of cultivars to leaf and stem rusts in different regions. Alien genes with a similar effect are of interest for breeding cultivars with durable resistance to rust diseases and engineering crops with the help of molecular technologies.

**Key words:** wheat breeding; tertiary gene pool; *Thinopyrum*; *Agropyron*; introgression; resistance for disease and abiotic stresses; nonhost resistance; durable resistance.

**For citation:** Plotnikova L.Ya., Knaub V.V. Exploitation of the genetic potential of *Thinopyrum* and *Agropyron* genera to protect wheat from diseases and environmental stresses. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(5):536-553. DOI 10.18699/vjgb-24-60

## Введение

Виды пшеницы *Triticum aestivum* L. и *T. durum* Desf. относятся к наиболее важным культурам для питания населения мира. Предполагается, что к 2050 г. население Земли превысит 9.7 миллиарда человек. Для обеспечения питанием такого населения необходимо увеличить производство зерна до 900 миллионов тонн (Baker et al., 2020; Kumar et al., 2022). Мягкая пшеница отличается высокой пластичностью, что позволяет выращивать ее в большинстве сельскохозяйственных зон мира. В связи с этим производство зерна пшеницы оказывает наиболее значимое влияние на глобальную продовольственную безопасность по сравнению с другими зерновыми культурами (Kuzmanović et al., 2020; Kumar et al., 2022).

В ходе многовековой селекции пшеницы основное внимание уделялось повышению урожайности и качества зерна. В результате была утрачена значительная доля генов, определяющих адаптивные способности к абиотическим и биотическим факторам. Стрессовые условия окружающей среды и болезни приводят к регулярным и значительным потерям урожая зерна, которые могут достигать 20–40 % (Curtis, Halford, 2014). Увеличение урожайности пшеницы может быть достигнуто за счет расширения посевных площадей, повышения потенциальной продуктивности при активизации фотосинтеза и снижения потерь от абиотических и биотических факторов (Savari et al., 2019; FAO Report, 2021). Расширение генетического разнообразия пшеницы актуально для стабильной защиты от болезней и стрессовых факторов среды. *Thinopyrum* и родственные ему роды являются перспективными источниками для обогащения генофонда пшеницы и выведения сортов с улучшенными свойствами.

## Влияние основных болезней и абиотических стрессов на посевы пшеницы

В XX в. на различных континентах были созданы крупномасштабные монокультурные посевы пшеницы, нередко однородные по генам устойчивости к болезням. Такая ситуация способствовала ускорению коэволюции патогенов с растениями в агроценозах в последние 70 лет (Zhan J., McDonald, 2013). В результате отмечено появле-

### Сокращения

АФК – активные формы кислорода  
APR (adult plant resistance) – возрастная устойчивость растений

ASR (all stage resistance) – устойчивость на всех стадиях развития растений

### Обозначения генов устойчивости к болезням

*Bdv* – вирусу желтой карликовости ячменя

*Fhb* – фузариозу колоса

*Lr* – бурой ржавчине

*Pm* – мучнистой росе

*Sr* – стеблевой ржавчине

*Snb* – септориозу, вызываемому *P. nodorum* (= *Septoria nodorum*)

*Stb* – септориозу, вызываемому *Z. tritici* (= *Septoria tritici*)

*Wsm* – вирусу полосатой мозаики (стрика)

*Yr* – желтой ржавчине

ние новых болезней, более частое возникновение вирулентных рас в популяциях патогенов, а также более частые вспышки заболеваний (Chen X., 2005; Singh R.P. et al., 2016). В мировом масштабе в 2010–2014 гг. ущерб от болезней и вредителей пшеницы оценивался в 21.5 %, из них 18 % определяли грибные заболевания (Savari et al., 2019). Основные потери (15.1 %) были вызваны распространенными по всему миру болезнями: видами ржавчины, септориозными пятнистостями, мучнистой росой, фузариозом колоса и желтой пятнистостью. Потери зерна значительно колеблются в разных регионах мира в зависимости от климатических условий, набора патогенов, разнообразия сортов и технологий растениеводства (McDonald, Stukenbrock, 2016; Singh R.P. et al., 2016).

Пшеницу поражают бурая (листовая), стеблевая (черная) и желтая ржавчина, возбудителями которых являются ржавчинные грибы *Puccinia triticina* Eriks., *P. graminis* Pers. f. sp. *tritici* Eriks. et Henn и *P. striiformis* Westend. f. sp. *tritici* Eriks. соответственно. Характерные особенности ржавчинных грибов – способность к интенсивному

размножению, высокая изменчивость и воздушное распространение урединиоспор на большие расстояния, часто в новые регионы и даже континенты (McDonald, Stukenbrock, 2016; Savari et al., 2019). *Puccinia triticina* – наиболее пластичный среди этих видов, он регулярно поражает пшеницу во многих регионах мира (Kolmer, 2013). В последнее десятилетие поражение посевов бурой ржавчиной усилилось в основных регионах выращивания пшеницы в Китае и Индии (Gao et al., 2019; Aravindh et al., 2020). Развитие стеблевой ржавчины пшеницы было значительно подавлено во второй половине XX в. благодаря широкому использованию сортов, несущих ген *Sr31* от ржи посевной *Secale cereale* L. (Singh R.P. et al., 2015). Однако в 1998 г. в Уганде возникла раса Ug99 (ТТКСК), преодолевшая ген *Sr31*, а позже появились дополнительные расы, не связанные с Ug99 (Дигалу и сицилийская). За два десятилетия усилилось поражение посевов стеблевой ржавчиной в Африке, на Ближнем Востоке и в Западной Европе (Singh R.P. et al., 2015; Patroux et al., 2022).

Желтая ржавчина ранее преимущественно поражала посевы пшеницы в зонах с прохладным и влажным климатом. Но после появления клонов *P. striiformis* f. sp. *tritici*, адаптированных к высоким температурам, произошло быстрое распространение патогена в новые регионы. С 2000-х гг. желтая ржавчина стала серьезной угрозой для производства зерна во многих странах. В настоящее время регулярные вспышки отмечены в Северной и Южной Америке, Африке, Северо-Западной Европе, Индии, Китае и России (Ali S. et al., 2017; Gulyaeva et al., 2022). По данным FAO, ржавчины являются наиболее разрушительными трансграничными болезнями пшеницы (FAO Report, 2021), что делает их серьезной угрозой продовольственной безопасности во всем мире (Singh R.P. et al., 2016).

Другое серьезное заболевание пшеницы – мучнистая роса, вызываемая *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (DC.) Speer. Ранее мучнистая роса преобладала в регионах с влажным и прохладным климатом. Но в последние десятилетия интенсивность болезни выросла в более теплых регионах, особенно при использовании интенсивных технологий с высокими дозами азотных удобрений (Zhang R.Q. et al., 2020; Yang G. et al., 2023). Наибольшие потери урожая отмечены в Китае, Северо-Западной Европе и Индии (Savari et al., 2019).

Септориозные болезни вызывает комплекс грибов, из них наиболее распространенными являются *Zymoseptoria tritici* (Roberge ex Desm.) Quaedvl. & Crous. (= *Septoria tritici* Desm.) и *Parastagonospora nodorum* (Berk.) Quaedvl. (= *Septoria nodorum* (Berk.)). Значительное усиление вредоносности комплекса септориозных болезней в посевах пшеницы отмечено с 1980-х гг. Сначала развитие *Z. tritici* приводило к поражению листового аппарата и высоким потерям зерна во влажных прибрежных регионах Европы и Северной Америки (O'Driscoll et al., 2014; Fones, Gurr, 2015). В последние годы отмечено усиление поражения пшеницы *Z. tritici* в засушливых регионах Африки, Северного Казахстана и Западной Сибири (Babkenova et al., 2020; Tadesse et al., 2020; Plotnikova et al., 2023b). На территории России септориозные болезни листа и колоса пшеницы преимущественно вызывают два вида – *Z. tritici*

и *P. nodorum*, причем соотношение патогенов существенно меняется в зависимости от региона (Торопова и др., 2020).

Фузариоз колоса, вызываемый *Fusarium graminearum* Schwabe [телеоморфа *Gibberella zeae* (Schwein.)]. При поражении колосьев фузариозом происходит снижение урожая пшеницы, ухудшение качества зерна и загрязнение его микотоксинами, что вредит здоровью людей и животных (Alisaac, Mahlein, 2023). С 1990-х гг. частые эпифитотии фузариоза колоса отмечены в Северной и Южной Америке, а также в Китае (Zhu et al., 2019; Alisaac, Mahlein, 2023). Желтую пятнистость пшеницы (пиренофороз) вызывает некротрофный гриб *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Dreches [анаморфа *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoemaker]. Первые эпифитотии были зарегистрированы в 1970-х гг. в Северной Америке, Австралии и Южной Африке. Позже болезнь распространилась по всему миру (Carmona et al., 2006; Phuke et al., 2020).

Изменения климата представляют угрозу устойчивому развитию растениеводства. Согласно отчету FAO, число стихийных бедствий в год (климатологических, гидрологических, биологических и геофизических) выросло с 90 в 1970-х гг. до 360 в 2010-х гг. (FAO Report, 2021). Самый большой прирост отмечен для событий, вызванных погодными условиями, включая засухи, штормы и экстремальные температуры. Сельское хозяйство, по сравнению с другими отраслями экономики, особенно уязвимо к действию экстремальных погодных условий и изменению климата. Ущерб продукции сельского хозяйства за 2008–2018 гг. оценивался в 63 % (FAO Report, 2021). Среди абиотических стрессов наибольшее негативное влияние на производство зерна пшеницы оказывают засуха, экстремальные температуры и засоление почв (Kosová et al., 2014; Ali N., Mujeeb-Kazi, 2021). Около трети пригодных для сельского хозяйства территорий, расположенных в теплых регионах, становятся засушливыми (Гончаров, 2021). Потери сборов зерна в мире, связанные с недостатком осадков и экстремальными температурами, могут достигать 28 % (Kumar et al., 2022). Озимые сорта дают высокие урожаи по сравнению с яровыми, но для их продвижения в зоны рискованного земледелия необходимо повысить зимостойкость растений (Фисенко, Кузьмина, 2020). Площадь выращивания пшеницы можно также увеличить за счет засоленных земель. Однако для этого требуется выведение сортов пшеницы с высокой солеустойчивостью (Yang Z. et al., 2022). Использование широкого спектра новых генов в селекции является основой для надежной защиты мягкой и твердой пшеницы от стрессов (Ceoloni et al., 2014).

### Расширение генетического разнообразия пшеницы за счет чужеродных генофондов

Генетическая защита сортов считается наиболее экономически эффективным и экологически безопасным способом борьбы с болезнями (Singh R.P. et al., 2016; Gulyaeva et al., 2022). Дикие и культурные виды злаков являются основными резервуарами ценных генов для селекции пшеницы (Ceoloni et al., 2014; Kumar et al., 2022). В. Friebe предложил разделить виды злаков по доступности для селекции пшеницы на первичный, вторичный и третичный генофонды (Friebe et al., 1996). Виды первичного генофонда имеют гено-

мы, гомологичные субгеномам *T. aestivum* (AABBDD), а виды вторичного генофонда несут по крайней мере один субгеном, гомологичный пшеничному. Генетический материал первичного и вторичного генофондов может быть относительно легко перенесен в геном пшеницы в форме небольших фрагментов за счет рекомбинации гомологичных хромосом.

Виды третичного генофонда имеют геномы, которые отличаются от субгеномов мягкой пшеницы (гомеологичные). Интрогрессия генетического материала от видов третичного генофонда в пшеницу затруднена из-за различий в структуре гомеологичных хромосом и требует специальных приемов работы (Friebe et al., 1996; Li H., Wang, 2009). Третичный генофонд включает роды *Aegilops* L. (виды с геномами U, C, M, T, X), *Secale* L., *Hordeum* L., *Thinopyrum* Á. Löve, *Agropyron* Gaertn., *Leymus* Hochst., *Haynaldia* L. (= *Dasyphyrum*) и *Pseudoroegneria* (Nevski) Á. Löve (Friebe et al., 1996; Kroupin et al., 2019; Kumar et al., 2022). В XX в. наибольшее внимание ученые уделяли исследованиям видов рода *Thinopyrum*. Многолетние виды *Thinopyrum* являются компонентами природных экосистем и пастбищ в различных регионах Евразии (Tsvelev, 1984; Li H., Wang, 2009). В связи с этим они хорошо адаптированы к контрастным климатическим условиям и обладают широким спектром генов устойчивости к абиотическим и биотическим стрессам (Lammer et al., 2005; Li X. et al., 2017).

Научные исследования генетического потенциала *Thinopyrum* и родственных родов и внедрение полученных результатов в практику продолжают уже более столетия (табл. 1). Первая успешная работа по отдаленной гибридизации между пшеницей и видами рода *Thinopyrum* (ранее *Agropyron*) была проведена академиком Н.В. Цициным в России в 1920–1930 гг. (Цицин, 1979). При этом был протестирован набор видов, из которых два оказались наиболее перспективными для дальнейшей работы, а именно пырей промежуточный *Thinopyrum intermedium* Barkworth & D.R. Dewey и пырей удлиненный *Th. ponticum* (Podp.) Z.-W. Liu & R.-C. Wang. Следует отметить, что классификация данных видов неоднократно менялась и до сих пор находится в стадии формирования. В связи с этим в публикациях разных лет встречаются разные названия этих видов: *Th. intermedium* (= *Agropyron intermedium* (Host) Beauv., *Ag. glaucum*) и *Th. ponticum* (= *Th. ponticum* (Podp.) Barkworth et D.R. Dewey, *Ag. elongatum* (Host) Beauv., *Lophopyrum ponticum* (Popd.) Á. Löve, *Elytrigia pontica* (Popd.) Holub.). Вначале оба вида были отобраны по признакам многолетнего образа жизни и устойчивости к абиотическим стрессам (морозостойкости, зимостойкости и засухоустойчивости). Позже виды рода *Thinopyrum* были признаны ценными источниками генов устойчивости к болезням, и большинство исследований было посвящено этой проблеме (Friebe et al., 1996; Li H., Wang, 2009). На первом этапе были созданы межродовые амфилоиды, которые затем были скрещены с *T. aestivum*. Затем получены частичные амфилоиды с различными наборами пырейных хромосом – пшенично-пырейные гибриды (ППГ). Среди них были отобраны стабильные формы, которые послужили основой для создания коммерческих сортов отрастающих и многолетних ППГ (Цицин, 1979).

Позже с использованием ППГ были выведены зимостойкие сорта пшеницы для европейской части России (Упелниек и др., 2012). В настоящее время наследие Н.В. Цицина поддерживается в виде коллекции частичных октоплоидных амфилоидов ( $2n = 56$ , включая 42 хромосомы *T. aestivum* и 14 хромосом из разных субгеномов видов *Thinopyrum*) (Главный ботанический сад Российской академии наук, Москва, Россия) (Упелниек и др., 2012; Kroupin et al., 2019).

Работы по интрогрессии генетического материала видов *Thinopyrum* в генофонд пшеницы были продолжены в России в 1980–2010-х гг. Селекционный материал на основе амфилоида Аврокум был создан в Национальном центре зерна им. П.П. Лукьяненко (г. Краснодар). Аврокум получен путем гибридизации тетраплоидной формы тетра-Аврора (мягкая пшеница сорта Аврора без генома D) с *Th. intermedium* (Давоян и др., 2015). Кроме того, получены амфилоиды с использованием *Th. intermedium*, а позднее – линии мягкой пшеницы с 6D хромосомами, замещенными одной из гомеологичных хромосом 6Ag1 (6Ag1 или 6Ag12). Позже были выведены сорта яровой мягкой пшеницы с чужеродными хромосомами 6Ag1 для Поволжья (Самарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. Н.М. Тулайкова, г. Самара, и Федеральный центр сельскохозяйственных исследований Юго-Восточного региона, г. Саратов) (Salina et al., 2015; Сибикеев и др., 2017). В Омском государственном аграрном университете на основе *Th. ponticum* были выведены новые интрогрессивные линии яровой мягкой пшеницы, устойчивые к ржавчинным болезням и септориозу (Плотникова и др., 2014, 2021; Plotnikova et al., 2023b).

Интрогрессию генетического материала видов *Thinopyrum* проводили независимо в разных странах мира (см. табл. 1). В 1930–1940 гг. W.J. Sando в США провел гибридизацию *T. aestivum* с *Th. intermedium* и *Th. ponticum*, в результате чего была получена коллекция частичных амфилоидов (коллекция Sando, USDA, National Small Grains Germplasm Research Facility, Абердин, Айдахо, США) (Hang et al., 2005). Аналогичные работы проведены в Германии и Канаде (Peto, 1936; Smith D.C., 1943). Большое внимание было уделено переносу генетического материала рода *Thinopyrum* в геном пшеницы в Китае в 1950-х гг. и позднее. S.C. Sun получил частичные амфилоиды с *Th. intermedium* (серия Zhong). Позже на их основе были выведены сорта мягкой пшеницы (Sun, 1981). Z.S. Li создал набор частичных амфилоидов на основе *Th. ponticum*, устойчивых к бурой и желтой ржавчине (серия Xiaoyan, включая Xiaoyan 68, Xiaoyan 693, Xiaoyan 7430, Xiaoyan 7631 и Xiaoyan 784) (Li Z.S. et al., 2008). Со временем в разных странах были получены другие серии частичных амфилоидов: Agrotana (Chen Q. et al., 1995), PMV (Fedak et al., 2000), SS (Oliver et al., 2006), BE-1 (Sepsi et al., 2008), SN (He F. et al., 2017). Частичные амфилоиды послужили исходным материалом для многочисленных дополненных, замещенных линий и линий с транслокациями различного размера.

Международная классификация видов рода *Thinopyrum* находится в стадии формирования и уточняется с помощью методов молекулярной цитогенетики. Согласно современным представлениям, род *Thinopyrum* включает



**Таблица 1.** Основные этапы интрогрессии генетического материала *Thinopyrum* и родственных родов в генофонд пшеницы

Период, годы	Страна	Научный результат	Практический результат	Литературный источник
1920–1970	Россия	Изучение рода <i>Thinopyrum</i> . Определение перспективных видов. Создание амфиплоидов на основе <i>Th. ponticum</i> и <i>Th. intermedium</i> , частичных амфиплоидов – ППГ Коллекция ППГ ( $2n = 56$ )	Сорта фуражных отрастающих и многолетних ППГ. Зимостойкие сорта мягкой пшеницы	Цицин, 1979; Упелник и др., 2012; Kroupin et al., 2019
1930–1940	США	Амфиплоиды на основе <i>Th. ponticum</i> и <i>Th. intermedium</i> . Частичные амфиплоиды – коллекция Sando	–	Hang et al., 2005
	ФРГ	Амфиплоиды на основе <i>Th. ponticum</i> и <i>Th. intermedium</i> . Коллекция частичных амфиплоидов	–	Peto, 1936
	Канада	Амфиплоиды на основе <i>Th. ponticum</i> и <i>Th. intermedium</i> . Коллекция частичных амфиплоидов	–	Smith D.C., 1943
1950–1970	Китай	Частичные амфиплоиды на основе <i>Th. intermedium</i> , серия Zhong. Частичные амфиплоиды на основе <i>Th. ponticum</i> , серия Xiaoyan	Сорта мягкой пшеницы	Sun, 1981; Li Z.S. et al., 2008
1950–1980	США	Разработка методов эффективной интрогрессии с использованием $\gamma$ -радиации, <i>ph</i> -мутантов, Робертсоновских транслокаций. Интрогрессивные линии. Перенос генов <i>Lr19/Sr25</i> , <i>Sr24/Lr24</i> , <i>Sr26</i>	Сорта мягкой пшеницы	Sears, 1956, 1976; Knott, 1968; Smith E.L. et al., 1968; Friebe et al., 1994, 1996, 2000
1980–2010	США, Китай, ФРГ, Франция	Амфиплоиды на основе <i>Th. ponticum</i> и <i>Th. intermedium</i> . Коллекции частичных амфиплоидов Agrotana, PMV, SS, BE-1, SN	Селекционный материал	Chen Q. et al., 1995; Fedak et al., 2000; Oliver et al., 2006; Sepsi et al., 2008; He F. et al., 2017
1990–2010	США, Китай	Перенос генов <i>Lr38</i> , <i>Sr43</i> , <i>Sr44</i> , <i>Pm40</i> , <i>Pm43</i> , <i>Bdv2</i> , <i>Bdv3</i>	Сорта мягкой пшеницы	McIntosh et al., 1995, 2018
1980–2010	Россия	Частичные амфиплоиды на основе <i>Th. intermedium</i> , линии с замещенными 6D-6Ag1 хромосомами. Частичные амфиплоиды на основе <i>Th. ponticum</i> , интрогрессивные линии	Сорта мягкой пшеницы. Селекционный материал	Давоян и др., 2015; Salina et al., 2015; Сибикеев и др., 2017; Plotnikova et al., 2023b, c
1990–2010	США, Китай	Изучение геномного состава видов <i>Thinopyrum</i> и родственных родов. Линии с дополненными, замещенными хромосомами и различными транслокациями	Сорта мягкой пшеницы. Селекционный материал	McIntosh et al., 1995, 2018; Zhang X. et al., 1996; Chen Q. et al., 1998; Chen S. et al., 2013; Mo et al., 2017; Guo X. et al., 2023
1990–2010	США, Китай	Интрогрессия генетического материала из видов <i>Th. bessarabicum</i> , <i>Th. elongatum</i> , <i>Th. junceaiforme</i> , <i>Th. distichum</i> , <i>A. cristatum</i>	Селекционный материал	Qi et al., 2010; Chen S. et al., 2013; Zhang Z. et al., 2017; Jiang et al., 2018; Li W. et al., 2019
1980–2010	США, Россия	Одомашнивание <i>Th. intermedium</i>	Фуражные сорта пырея промежуточного	Pugliese et al., 2019; Bajgain et al., 2020; Потоцкая и др., 2022
2010–2020-е	США, Китай, ФРГ	Секвенирование геномов. Клонирование генов <i>Sr26</i> , <i>Sr61</i> , <i>Fbh7</i>	Селекционный материал	Arora et al., 2019; Wang H. et al., 2020; Frailie, Innes, 2021; Zhang J. et al., 2021

Примечание. ППГ – пшенично-пырейные гибриды.

виды с различным сочетанием геномов и плоидностью (от диплоидов  $2n$  до декаплоидов  $10n$ ). Диплоидные образцы ( $2n = 2x = 14$ ) были идентифицированы у видов *Th. elongatum* D.R. Dewey и *Th. bessarabicum* (Savul & Rayss) Á. Löve. Тетраплоиды определены у *Th. junceaiforme* Á. Löve ( $2n = 4x = 28$ ), а гексаплоиды – у *Th. interme-*

*dium* и *Th. junceaum* ( $2n = 6x = 42$ ). Декаплоиды выявлены среди образцов *Th. ponticum* (Chen S. et al., 2013; Mo et al., 2017). На основе цитогенетических и молекулярно-генетических исследований геномный состав гексаплоидного *Th. intermedium* был определен как JJJ<sup>\*</sup>J<sup>\*</sup>StSt (Chen Q. et al., 1998) или EEE<sup>\*</sup>E<sup>\*</sup>StSt (Wang R.R.-C., 2011). Декаплоидный



вид *Th. ponticum* имеет геномный состав JJJJ<sup>s</sup>J<sup>s</sup>J<sup>s</sup>J<sup>s</sup>J<sup>s</sup> (Chen Q. et al., 1998) или EEE<sup>b</sup>E<sup>b</sup>E<sup>b</sup>E<sup>b</sup>E<sup>b</sup>StStStSt (Zhang X. et al., 1996). Наиболее часто употребляется классификация геномов, предложенная R.R.-C. Wang (2011), но в ряде статей используют обозначение геномов J. Субгеномы J или J<sup>s</sup> в высокой степени гомологичны геномам E<sup>c</sup> и E<sup>b</sup> видов *Th. elongatum* и *Th. bessarabicum* соответственно. Субгеном St родственен геному *Pseudoroegneria strigosa* (Chen Q. et al., 1998; Wang L. et al., 2017). Виды рода *Agropyron* имеют разное число геномов P (от двух до шести) (Wang R.R.-C., 2011).

### Разработка методов эффективной интрогрессии чужеродного генетического материала и улучшения свойств селекционного материала

При переносе генетического материала от видов третичного генофонда в пшеницу возникают препятствия на разных этапах работы. Общими являются сложности при межродовом скрещивании, стерильность гибридов F<sub>1</sub> и отсутствие конъюгации гомеологичных хромосом. Из-за нарушения конъюгации между гомеологичными хромосомами в линии обычно переносят крупные чужеродные фрагменты: целые хромосомы, хромосомные плечи или большие концевые транслокации (Liu J. et al., 2013; Леонова, 2018). Как правило, материал, полученный путем отдаленной гибридизации, значительно уступает по хозяйственным свойствам коммерческим сортам (Friebe et al., 1996; Li H., Wang, 2009). Основными причинами ухудшения свойств интрогрессивного материала являются тесное сцепление между целевыми и нежелательными генами (linkage drag) или недостаточная генетическая комплементация между чужеродным фрагментом и геномом пшеницы (Wulff, Moscou, 2014; Hao et al., 2020). Во многих случаях ухудшение свойств происходит из-за того, что большой чужеродный фрагмент не компенсирует потерю важного генетического материала пшеницы (Friebe et al., 2005).

В 1950–1970-х гг. были разработаны методы, которые повысили эффективность интрогрессии от родственных видов в пшеницу. Впервые процедура была реализована при переносе генетического материала от *Ae. umbellulata* (UU) в геном *T. aestivum* (Sears, 1956). На первом этапе был создан межвидовой гибрид, затем его хромосомы были удвоены с помощью колхицина. Этот амфидиплоид был включен в серию возвратных скрещиваний с мягкой пшеницей. Затем была получена дополненная линия с хромосомой из генома U, которую использовали в качестве генетического мостика для передачи пшенице признака устойчивости к бурой ржавчине. Для облегчения переноса генетического материала пыльцу замещенной линии подвергли рентгеновскому облучению, что вызвало множественные разрывы хромосом с последующей рекомбинацией фрагментов. В результате работы был создан сорт Трансфер, несущий ген устойчивости к бурой ржавчине *Lr9* (Sears, 1956).

Позже, после изучения генетического контроля мейоза пшеницы, было установлено, что хромосома пшеницы 5B несет ген *Ph*, который подавляет гомеологичную конъюгацию хромосом. Мутантный ген *ph1b* (и аналогичные *ph2a* и *ph2b*) облегчает обмен локусами между гомеологичными

хромосомами (Sears, 1976). Для индукции конъюгации между гомеологичными хромосомами использовали скрещивание между интрогрессивными линиями и анеуплоидами по хромосоме 5B, а также с мутантами с генами *ph*. Аналогичные эффекты могут оказывать хромосома 5P *A. cristatum* (PPPP) и некоторые образцы *Ae. speltooides* (SS) (Friebe et al., 2000; Han et al., 2023).

Гексаплоид *Th. intermedium* относительно легко скрещивается с мягкой пшеницей (средняя завязываемость семян около 24 %), и амфилоиды могут быть получены прямым скрещиванием (Mo et al., 2017). Для переноса генетического материала от декаплоидного *Th. ponticum* необходимо создать амфилоиды с тетраплоидной пшеницей *T. turgidum* (AABB) (Цицин, 1979). Частичные амфилоиды с комбинациями хромосом из различных субгеномов видов *Thinopyrum* были получены после беккроссов с мягкой пшеницей (Friebe et al., 2000; Li H., Wang, 2009). В редких случаях перенос гомеологичного фрагмента происходит путем спонтанной транслокации (Knott, 1968). Но для переноса небольших локусов в геном пшеницы более эффективна стимуляция транслокаций с помощью облучения или индуцированной мутантами *ph1b* гомеологической рекомбинации (Sears, 1978). С использованием этих методов был осуществлен перенос по меньшей мере 134 локусов от *Th. ponticum* в геном мягкой пшеницы (Baker et al., 2020). В результате было создано большое количество линий с пырейными интрогрессиями различного размера (Mo et al., 2017; Kroupin et al., 2019).

В ходе интрогрессии возможен перенос множественных чужеродных фрагментов и локализация их в различных хромосомах или плечах (табл. 2). Например, при создании линий на основе *Th. intermedium* ген *Lr38* был локализован в четырех хромосомах пшеницы (2A, 5A, 3D и 6D) (Friebe et al., 1996). Транслокации с генами *Sr24/Lr24* от *Th. ponticum* идентифицированы в двух хромосомах (1B и 3D). Локусы с генами *Lr19/Sr25* выявлены в разных плечах хромосомы 7D (McIntosh et al., 1995; Friebe et al., 1996). При создании устойчивых к болезням сортов были отобраны интрогрессивные линии с лучшими хозяйственно ценными свойствами.

Улучшение свойств некоторых интрогрессивных линий было достигнуто за счет уменьшения размера чужеродных фрагментов. Ограниченное применение локуса с генами *Lr19/Sr25* в селекции было связано с его сцеплением с геном *Y*, определяющим желтый цвет муки. Гены *Lr19/Sr25* и *Y* были разделены с использованием делеционной по *Ph1* линии (Zhang W. et al., 2005). Ценный пырейный ген *Fhb7*, придающий устойчивость к фузариозу колоса и к корневой гнили, тесно связан с геном *PSY-E2*, определяющим желтый цвет муки. Благодаря включению в скрещивания мутанта *ph1b* были получены линии с укороченной транслокацией, лишенной гена *PSY-E2* (Li M.Z. et al., 2022). С помощью *ph1*-индуцированной гомеологической рекомбинации осуществлен межвидовой перенос генов от *T. durum* к *T. aestivum*. Три локуса с чужеродными генами *Lr19/Sr25* и *Pm13* (исходно от *Th. ponticum* и *Ae. longissima* соответственно) и *Gli-D1/Glu-D3* (влияющий на свойства клейковины) были перенесены из хромосом 7D, 1D и 3B мягкой пшеницы в плечи 7AL, 3BS и 1AS твердой пшеницы (Kuzmanović et al., 2020).

**Таблица 2.** Результаты интрогрессии генетического материала рода *Thinopyrum* и родственных видов в генофонд пшеницы

Вид-донор	Ген, признак	Транслокация, замещенная хромосома	Сорт, линия	Литературный источник
<i>Th. ponticum</i>	<i>Lr19/Sr25</i>	7DL-7Ae#1L	Agatha	Knott, 1968
		7D-7Ag no.1	Линии Sears	Sears, 1978
	<i>Sr24/Lr24</i>	3DL-3Ae#1L	Agent	Smith E.L. et al., 1968
		3D-3Ag#1	Sears transfer	Sears, 1978
		T1BL-1BS-3Ae#1L	Amigo	McIntosh et al., 1995
	<i>Sr26</i>	T6AS.6AL-6Ae#1L	<i>Sr26/9*LMPG</i>	Friebe et al., 1994; McIntosh et al., 1995
		6A-6Ae#1L	Thatcher	McIntosh et al., 1995
	<i>Sr</i> неизвестный	T5DS-5DL	WTT34	Yang G. et al., 2021
	<i>Yr69</i>	2AS	CH7086	Hou et al., 2016
	<i>YrTp1, YrTp2</i>	2BS, 7BS	A-3	Yin et al., 2006
	<i>Yr</i> неизвестный APR	5A-St	ES-7	Mo et al., 2017
	<i>Yr</i> неизвестный	1B-1J <sup>s</sup>	SN19647	Wang Y.Z. et al., 2020
	<i>Pm51</i>	2BL	CH7086	Zhan H.X. et al., 2014; Hou et al., 2016
	<i>Pm</i> неизвестный	T5DL-5AgS	11-20-1	Li X. et al., 2017
	<i>Pm</i> неизвестный	T1BL-1RS	SN0293-7	Li M.Z. et al., 2022
	<i>Pm</i> неизвестный	1B-1J <sup>s</sup>	SN19647	Li M.Z. et al., 2021
	<i>Pm</i> неизвестный	1D-1J <sup>s</sup>	CH10A5	Wang Y.Z. et al., 2020
	<i>Pm</i> неизвестный APR	4D-4AgS	Blue 58	Yang G. et al., 2023
	<i>Fhb7</i>	7DL-7Ae#1L	SDAU1881	Ceoloni et al., 2017; Wang H. et al., 2020
<i>Stb</i> неизвестный	?	2/2015, 337/2017	Plotnikova et al., 2023b	
<i>Snb</i> неизвестный	?	6/2015, 322/2017		
<i>Th. intermedium</i>	<i>Lr38</i>	T1DS-1DL-7Ai#2L	T25	McIntosh et al., 1995
		T2AS-2AL-7Ai#2L	W49 (=T33)	
		T3DL-3DS-7Ai#2L	T4	
		T5AL-5AS-7Ai#2L	T24	
		T6DS-6DL-7Ai#2L	RL6097	
	<i>Lr6Agi</i>	6D-6Agi	Мульти 6R	Salina et al., 2015;
		6D-6Agi2	Тулайковская 5	Сибикеев и др., 2017
	<i>Sr43</i>	7D,7DS-7e <sub>1</sub> ,S,7e <sub>2</sub> L	KS10-2, KS23, KS24, KS24-2	Niu et al., 2014
	<i>Sr44</i>	T7DS-7Ai#1L-7Ai#1S	Линии 86.187, TA5657	McIntosh et al., 2018
	<i>Yr50</i>	4BL	CH233	Liu J. et al., 2013; McIntosh et al., 2018
	<i>YrYu25</i>	?	Yu25	Wang S. et al., 2022
	<i>Yr</i> неизвестный	J или J <sup>s</sup>	Z4	Huang et al., 2014
	<i>YrT14</i>	7J или 7J <sup>s</sup>	Zhongke 15, Zhongke 78	Guo X. et al., 2023
	<i>YrL693</i>	?	L693	Huang et al., 2014
	<i>YrCH-1BS</i>	T1BL-1BS-3Ai	CH-1BS	Zheng X. et al., 2020
	<i>Pm40</i>	7BS	GRY19	Luo et al., 2009b
	<i>Pm43</i>	2DL	CH5025	He R.L. et al., 2009
	<i>Pm/Yr</i> неизвестные	T6BS.6AiL	CH13-21	Zhan H. et al., 2015
	<i>Bdv2</i>	T7DS-7DL-7Ai#1L	TC14, TC5, TC6, TC8, TC9, TC7	Hohmann et al., 1996; McIntosh et al., 2018
		7DS-7Ai#1S-7Ai#1L		
		T1BS-7Ai#1S-7Ai#1L		
	<i>Bdv3</i>	7DS-7DL-7EL	P961341	Ohm et al., 2005
	<i>Wsm1</i>	T4DL-4Ai#2S	CI 17884	Wells et al., 1982
T4AL-4Ai#2S		KS93WGRC27	Gill et al., 1995	
A29-1-13-2		CI 17766	McIntosh et al., 2018	
<i>Th. bessarabicum</i>	Солеустойчивость	T2JS-2BS-2BL	TJ04	Qi et al., 2010
<i>Th. elongatum</i>	<i>Fhb-7EL</i>	?	DS7E	Chen S. et al., 2013
	<i>Pm</i>	?	?	
<i>Th. junceiforme</i>	Солеустойчивость	?	Интрогрессивные линии	Li W. et al., 2019; Singh D. et al., 2019
	<i>Fhb</i> неизвестный			
	<i>Wsm</i> неизвестный			

В некоторых случаях в интрогрессивном материале происходит образование некомпенсированных транслокаций в геноме пшеницы. Это связано с участием в мейозе гомеологичных плеч хромосом, которые различаются наборами генов и их порядком. Некомпенсированные транслокации провоцируют геномные дубликации или дефекты, что приводит к генетической нестабильности линий и препятствует использованию ценных генов в селекции (Friebe et al., 1996). Компенсирующие робертсоновские транслокации (RobT) используются для функциональной замены утраченных фрагментов и коррекции генотипов пшеницы (Friebe et al., 2005). С помощью этого метода были улучшены свойства линии с геном *Sr44* от *Th. intermedium*. После скрещивания с робертсоновской компенсирующей линией была получена линия с компенсирующей RobT рекомбинацией T7DL×7J#1S, состоящей из пшеничного плеча 7DL, транслоцированного в пырейное плечо 7J#1S (Liu W. et al., 2013). Аналогичные работы проведены при улучшении линий с генами *Sr51*, *Sr52* и *Sr53* (от *Ae. searsii* Feldman & Kislev ex Hammer и *Ae. geniculata* Roth соответственно) (Liu W. et al., 2011a, b).

В очень редких случаях замена пшеничных хромосом чужеродными не снижает агрономических свойств растений. Это проявилось в сортах яровой мягкой пшеницы с хромосомой 6D, замещенной на 6Ai или 6Ai2 (гомологичные) из субгенома J(=E) *Th. intermedium*. В Поволжье был выведен ряд сортов с этими хромосомами (Мульти 6R, Белянка, Воевода, Лебедушка, Тулайковская 5, Тулайковская 100, Тулайковская Золотистая и др.). Данные сорта показали устойчивость широкого спектра к бурой и стеблевой ржавчине, высокую урожайность, засухоустойчивость и хорошее качество зерна (Salina et al., 2015; Сибикеев и др., 2017). В Китае большим достижением селекции стало выведение сорта Хяоуан 6 с двойными транслокациями на хромосомах 2A и 7D от *Th. ponticum*. Хяоуан 6 обладал устойчивостью к набору грибных болезней, высокой урожайностью и экологической пластичностью, а также хорошим качеством зерна. Этот сорт культивировали на больших площадях в 1980–1990-х гг., а также использовали в качестве родительской формы при создании более 60 сортов пшеницы (Zhang X. et al., 2011).

### Использование *Th. ponticum* и *Th. intermedium* в качестве источников полезных генов

При интрогрессии генетического материала видов *Thinopyrum* основные усилия были направлены на борьбу с усиливающимися или вновь возникающими болезнями, и в последние десятилетия внимание к этим исследованиям возросло. В течение 1960–2020 гг. от *Th. ponticum* к *T. aestivum* был перенесен набор идентифицированных генов устойчивости к бурой, стеблевой и желтой ржавчине. Часть генов тесно сцеплены и присутствуют в сложных транслокациях (*Lr19/Sr25*, *Sr24/Lr24*), а в других локусах выявлены одиночные гены (*Lr29*, *Sr26*, *Sr43*, *Sr61* (= *SrB*), *Yr69*) (см. табл. 2) (McIntosh et al., 1995, 2018).

После резкого усиления вредоносности стеблевой и желтой ржавчины в 2000-х гг. был проведен скрининг коллекций видов злаков и амфилоидов на устойчивость к болезням. Изучение пяти видов *Thinopyrum* (242 образ-

ца) показало, что *Th. ponticum* и *Th. intermedium* обладают высокой устойчивостью к расе Ug99 (Zheng Q. et al., 2014a, b). Частичные амфилоиды, созданные в Китае в 1950-х гг. (Хяоуан 68, Хяоуан 7430, Хяоуан 784), продемонстрировали высокую устойчивость к расам группы Ug99 (Zheng Q. et al., 2014b). На основе амфилоида Хяоуан 784 была создана линия ES-7 с 5A-St замещенными хромосомами, проявляющая возрастную устойчивость (adult plant resistance, APR) к желтой ржавчине (Mo et al., 2017). Ген *Yr69* был перенесен из амфилоида Хяоуан 7430 в плечо 2AS хромосомы пшеницы (Hou et al., 2016). Интрогрессивная линия WTT34 несет по меньшей мере один новый ген *Sr* в транслокации T5DS·5DL (Yang G. et al., 2021). В линии А-3 выявлены два предположительно новых гена устойчивости к желтой ржавчине – *YrTp1* и *YrTp2* в плечах хромосом 2BS и 7BS соответственно (Yin et al., 2006). Дополнительные гены устойчивости к ржавчинным болезням определены в других интрогрессивных линиях (Zheng Q. et al., 2014a; Wang Y.Z. et al., 2020).

Потенциал рода *Thinopyrum* мало использован для защиты пшеницы от мучнистой росы. Из 65 идентифицированных генов только *Pm51* был перенесен из *Th. ponticum* (McIntosh et al., 2018). *Pm51* придает устойчивость к мучнистой росе широкого спектра на всех стадиях развития растений (all stage resistance, ASR) (Zhan H.X. et al., 2014). Новые неидентифицированные гены *Pm* были выявлены в линиях SN19647 и CH10A5, в которых хромосомы 1B и 1D были замещены хромосомами 1J<sup>s</sup> (Wang Y.Z. et al., 2020; Li M.Z. et al., 2021). Линии 11-20-1 (с транслокацией T5DL·5AgS) и SN0293-2 показали устойчивость ASR-типа к набору рас (Li X. et al., 2017; Li M.Z. et al., 2022). Линия синезерной пшеницы Blue 58 сохраняет устойчивость к мучнистой росе более сорока лет. В этой линии пшеничная хромосома 4D была замещена на пырейную 4Ag. В коротком плече хромосомы 4Ag присутствуют гены, определяющие высокоэффективную устойчивость APR-типа к болезни (Yang G. et al., 2023).

Помимо ржавчин и мучнистой росы, отмечено усиление вредоносности гембиотрофных, некротрофных и вирусных патогенов. Септориозные болезни пшеницы приводят к значительным потерям урожая в различных регионах мира, при этом генетическая защита сортов реализована слабо (Fones, Gurr, 2015). В настоящее время среди идентифицированных нет генов устойчивости к септориозным болезням, перенесенных из видов *Thinopyrum*. У межвидового гибрида, созданного скрещиванием *Th. ponticum* и *Th. intermedium*, определена устойчивость к септориозу, вызываемому *P. nodorum* (= *S. nodorum*), фузариозу колоса и желтой пятнистости (Oliver et al., 2006). Среди интрогрессивных линий, созданных на основе *Th. ponticum* в Западной Сибири, выявлены высокоустойчивые к поражению листа и колоса линии с неизвестными генами *Stb* и *Snb* (Plotnikova et al., 2023b). Кроме того, от *Th. ponticum* переданы некоторые гены устойчивости к фузариозу колоса (*Fhb7*), корневой гнили, вирусу желтой карликовости ячменя (*Bdv*) и вирусу полосатой мозаики пшеницы (*Wsm*) (Ceoloni et al., 2017; Kumar et al., 2022).

Пырей удлинненный также является источником таких ценных для селекции пшеницы признаков, как устойчи-



вость к прорастанию зерна в колосе (Kocheshkova et al., 2017), синий алейроновый слой (Liu L.Q. et al., 2018), морозоустойчивость, зимостойкость (Упелник и др., 2012) и толерантность к засухе (Kuzmanović et al., 2016; Plotnikova et al., 2023c).

*Thinopyrum intermedium* послужил источником генов устойчивости к ржавчинным болезням и мучнистой росе, включая *Lr38*, *Sr43*, *Sr44*, *Yr50*, *Pm40* и *Pm43* (McIntosh et al., 1995, 2018; Friebe et al., 1996; He R.L. et al., 2009; Luo et al., 2009a, b; Liu J. et al., 2013; Niu et al., 2014). Дополнительные гены устойчивости к бурой и стеблевой ржавчине *Lr6Agi* и *Sr6Agi* были идентифицированы в замещенных хромосомах 6Agi и 6Agi2 (Salina et al., 2015; Сибикеев и др., 2017). Линии с геном устойчивости к желтой ржавчине *YrYu25* получены на основе амфилоида ТА17047 (Luo et al., 2009a). Четыре гена устойчивости к желтой ржавчине определены в субгеноме St *Th. intermedium* (хромосомы 1St, 2St, 3St и 7St) (Wang S. et al., 2022) и один ген – в субгеноме J или J<sup>s</sup> (в коротком плече замещенной хромосомы линии Z4) (Lang et al., 2018). В Китае созданы линии Zhongke 78 и Zhongke 15 с геном *YrT14* в транслокации из чужеродной хромосомы 7J или 7J<sup>s</sup> (Guo X. et al., 2023). Ген *YrL693* установлен в интрогрессивной линии L693 (Huang et al., 2014). Потенциально новые гены устойчивости к желтой ржавчине (*YrCH-1BS*) и мучнистой росе выявлены в линиях с транслокациями T1BL.1BS-3Ai и T6BS.6AiL (Zhan H. et al., 2015; Zheng X. et al., 2020). *Th. intermedium* послужил также источником генов устойчивости к вирусу желтой карликовости ячменя (*Bdv2*, *Bdv3*) и полосатой мозаики пшеницы (*Wsm1*) (Wells et al., 1982; Gill et al., 1995; Hohmann et al., 1996; Ohm et al., 2005; Li H., Wang, 2009; McIntosh et al., 2018).

*Thinopyrum intermedium* может быть использован не только как резервуар генов для улучшения пищевой ценности мягкой пшеницы, но и как пастбищная и кормовая культура. В 1980-х гг. были начаты работы по одомашниванию пырея промежуточного (Bajgain et al., 2020; Потоцкая и др., 2022). Для кормовых культур ценны такие признаки, как многолетний образ жизни, быстрое отрастание после скашивания или выпаса скота, хорошие кормовые свойства, морозостойкость и устойчивость к болезням, а также улучшенное качество кормов (Hassani et al., 2000; Lammer et al., 2005). В результате длительной работы были выведены многолетние сорта пырея промежуточного (Kernza, MN-Clearwater, Sova) для получения фуражного зерна или двойного назначения (на зерно и сено) (Hassani et al., 2000; Bajgain et al., 2020; Потоцкая и др., 2022). Эти сорта представляют интерес в качестве резервуара генов для различных направлений селекции пшеницы.

### Интрогрессия генетического материала диплоидных и тетраплоидных видов родов *Thinopyrum* и *Agropyron* в геном пшеницы

Несмотря на большие достижения в области отдаленной гибридизации, интрогрессия материала от полиплоидных гетерогеномных видов остается сложной проблемой. В связи с этим в качестве дополнительных резервуаров ценных генов были использованы диплоидные и тетраплоидные виды с геномами, сходными с субгеномами

*Th. intermedium* и *Th. ponticum*: *Th. bessarabicum*, *Th. elongatum*, *Th. junceiforme*.

Вид *Th. bessarabicum* (JJ или E<sup>b</sup>E<sup>b</sup>) отличается высокой толерантностью к засолению почвы (Gorham et al., 1986). Для облегчения переноса генов из *Th. bessarabicum* были созданы гекса- и октоплоидные амфилоиды ( $2n = 4x = 42$ , AABBJJ = AABBE<sup>b</sup>E<sup>b</sup>, или  $2n = 8x = 56$ , AABBDDJJ) (Qi et al., 2010). На их основе получены линии с хромосомами 5A и 5D, замененными на 5J. Позже была создана улучшенная линия с транслокацией T2JS-2BS-2BL от *Th. bessarabicum* (см. табл. 2) (Guo J. et al., 2016).

Геномный состав вида *Th. elongatum* в настоящее время уточняется. С использованием методов молекулярной цитогенетики в нем выявлены ди-, тетра-, гекса- и декаплоидные формы (Colmer et al., 2006; Chen S. et al., 2013; Chen C. et al., 2023; Shi et al., 2023). Однако при исследовании декаплоидов с помощью дифференцирующей субгеномы GISH с меченой ДНК *Pseudoroegneria* (St) у них выявлены два St-подобных и три E-подобных субгенома (Wang L. et al., 2017; Baker et al., 2020). В связи с этим декаплоидные формы, вероятно, относятся к пырею понтийскому. Вид *Th. elongatum* обладает устойчивостью к болезням, засолению, засухе, подтоплению и экстремальным температурам (Li Z.S. et al., 2008; Ceoloni et al., 2014; Li X. et al., 2017; Yang Z. et al., 2022). В гибридизацию были включены ди- и тетраплоидные образцы. На их основе получены линии с дополненными, замещенными хромосомами и транслокациями разного размера. Линии с коротким плечом хромосомы 4Ag *Th. elongatum* несут locus с геном/генами *Pm*, отвечающим за устойчивость широкого спектра к мучнистой росе (Yang G. et al., 2023).

Тетраплоидный вид *Th. junceiforme* ( $2n = 4x = 28$ , J<sub>1</sub>J<sub>1</sub>J<sub>2</sub>J<sub>2</sub>) распространен в морских прибрежных зонах и адаптирован к заболачиванию, засолению, низкому содержанию азота и тепловому стрессу (Singh D., 2019). Для переноса генетического материала *Th. junceiforme* был получен амфилоид, а затем созданы дополненные и интрогрессивные линии с транслокациями разной величины. Эти линии, наряду с устойчивостью к абиотическим факторам, проявили высокую устойчивость к фузариозу колоса и вирусу полосатой мозаики пшеницы (Singh D., 2019).

Помимо видов рода *Thinopyrum*, были проведены работы по отдаленной гибридизации с родом *Agropyron*. Вид *A. cristatum* ( $2n = 4x = 28$ , PPPP) устойчив к мучнистой росе, бурой и желтой ржавчине. На основе *A. cristatum* получены интрогрессивные линии с ценными генами в транслокациях из хромосом 2P, 5P, 6P и 7P (Zhang Z. et al., 2017; Jiang et al., 2018). Локусы хромосом 2P и 6P контролируют компактный тип растения с большим колосом и крупным зерном (Zhang Z. et al., 2017; Xu S. et al., 2023). Фрагмент хромосомы 5P индуцирует множественные структурные перестройки, включая транслокации между хромосомами различных субгеномов. Этот фрагмент потенциально может быть новым инструментом для усиления рекомбинации гомеологичных хромосом (Li W. et al., 2019).

В последние годы накапливается информация о наличии у видов с родственными субгеномами одинаковых или



сходных генов. В частности, диплоидный вид *Th. elongatum* был источником гена устойчивости к фузариозу колоса *Fhb-7EL*, аналогичного идентифицированному гену *Fhb7*, перенесенному из *Th. ponticum* (образец el2). В обоих видах гены *Fhb* были сцеплены с известным геном *Lr19* (Ceoloni et al., 2017; Ma et al., 2018; Kuzmanović et al., 2020). Эти факты подчеркивают необходимость тщательного изучения и сравнения интрогрессивного материала, полученного на основе видов *Thinopyrum*, для идентификации новых генов устойчивости к различным стрессам.

### Опыт долгосрочного использования генов третичного генофонда для защиты пшеницы от болезней

В настоящее время идентифицировано более 100 генов устойчивости к каждому из видов ржавчины и мучнистой росы пшеницы, включая идентифицированные, неизвестные новые гены и локусы количественных признаков (QTL) (McIntosh et al., 2018). Значительная часть генов устойчивости была достаточно быстро преодолена в результате эволюционных процессов в популяциях патогенов (Kolmer, 2013; Patpour et al., 2022). Использование генетических ресурсов третичного генофонда в селекции пшеницы началось в 1960-х гг., когда были созданы подходящие донорные линии. Несмотря на большой набор интрогрессивных линий, малое число чужеродных генов интенсивно применяли в селекционных программах в мире. Такие результаты были обусловлены тем, что одни гены обладали слабым защитным эффектом, а другие значительно снижали хозяйственно ценные свойства растений (Friebe et al., 2000). В частности, некоторые из известных генов, перенесенных из видов *Thinopyrum* (*Lr29*, *Lr38*, *Sr43*), практически не вовлекались в селекцию из-за негативного влияния на агрономические признаки (Zhang W. et al., 2005).

Опыт интенсивного использования чужеродных генов на протяжении нескольких десятилетий дает представление об их эффективности и воздействии на популяции патогенов. R. Johnson (1983), основываясь на анализе опыта растениеводства, предложил концепцию «длительной устойчивости», т. е. устойчивости, которая остается эффективной в течение длительного периода выращивания сорта на обширной территории в условиях, благоприятных для развития заболевания. Одним из наиболее значимых достижений в применении третичного генофонда была селекция сортов с транслокацией 1BL/1RS от ржи посевной сорта *Petkus*, несущей гены устойчивости к набору ржавчинных болезней и мучнистой росе (*Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*). Широкое распространение сортов, защищенных геном *Sr31*, привело к подавлению популяций *P. graminis* f. sp. *tritici* по всему миру в течение нескольких десятилетий, вплоть до появления расы Ug99 в Уганде в 1998 г. (Singh R.P. et al., 2015). В результате распространения рас группы Ug99 ген *Sr31* стал неэффективным в Африке и на Ближнем Востоке (Singh R.P. et al., 2015; Patpour et al., 2022), но остается эффективным в США, Канаде, Индии, Китае и России (Brag et al., 2019; Сколотнева и др., 2020; Wu et al., 2023). История использования сортов

с геном *Sr31* показывает, что он обеспечивал длительную устойчивость пшеницы к стеблевой ржавчине.

Опыт возделывания сортов, созданных в СИММУТ, в различных регионах мира показал, что наиболее ценными для защиты от прогрессирующей стеблевой ржавчины были 12 генов. Из них три гена были получены из мягкой пшеницы (*Sr2*, *Sr23*, *SrTmp*), а два – перенесены из первичного генофонда (*Sr33* и *Sr45*). Остальные *Sr* гены были перенесены из третичного и вторичного генофондов преимущественно в составе сложных локусов: из *Th. ponticum* (*Sr24/Lr24*, *Lr19/Sr25*), *S. cereale* (*Sr31/Lr26/Yr9/Pm8*, *Sr1RS<sup>Amigo</sup>/Pm17* и *Sr50*), *T. timopheevii* (*Sr36/Pm6*), *Ae. ventricosa* (*Sr38/Lr37/Yr17*) (Singh R.P. et al., 2015). Принимая во внимание высокий риск распространения рас группы Ug99, большое внимание было уделено эффективности против нее известных *Sr* генов. В настоящее время эффективны против расы группы Ug99 гены *Sr25*, *Sr26*, *Sr43*, *Sr61* из *Th. ponticum*, а также *Sr44* из *Th. intermedium* (Zhang J. et al., 2021; Pathotype Tracker, 2023). До появления расы Ug99 вирулентность к *Sr24* была редкой в популяциях *P. graminis* f. sp. *tritici* во всем мире, однако к 2006 г. вирулентность появилась у пяти рас группы Ug99 в Африке (Jin et al., 2008; Bhavani et al., 2019). В Австралии ген *Sr24* был эффективен около 20 лет, а *Sr26* остается эффективным уже несколько десятилетий, что можно рассматривать как длительную устойчивость к стеблевой ржавчине (Park et al., 2015; Zhang J. et al., 2021).

В период 1983–2012 гг. в мире было создано около 12.5 тысячи сортов и линий мягкой пшеницы. Генетический материал видов *Thinopyrum*, преимущественно *Th. ponticum* (93 %), активно использовали для защиты сортов (Martynov et al., 2016). Распределение пырейных генов в сортах значительно варьирует в зависимости от региона. Это может быть обусловлено адаптацией сортов к климату, технологическими требованиями к качеству продукции и популяциями патогенов. Более половины североамериканских сортов имели интрогрессии от *Th. ponticum*, реже они присутствовали в сортах Австралии (12.6 %), Азии (14.8 %) и Южной Америки (8.5 %) (Martynov et al., 2016). В США большинство озимых сортов были защищены генами *Lr24/Sr24* (Kolmer et al., 2007), а *Lr19/Sr25* присутствовали у 12 % сортов. В Австралии для защиты пшеницы от ржавчины в основном использовали *Lr24/Sr24* (82 %), реже – *Lr19/Sr25* и *Sr26*. В Южной Африке и Египте около 5 % сортов несли гены *Lr24/Sr24*. В России и Китае преимущественно включали в сорта гены *Lr19/Sr25* (Martynov et al., 2016; Xu X. et al., 2018; Gulyaeva et al., 2021). Со временем в некоторых регионах устойчивость сортов с пырейными генами была преодолена ржавчинными грибами. Так, ген *Lr19* был преодолен в Мексике и Индии (Huerta-Espino, Singh, 1994; Bhardwaj et al., 2005). Расы *P. triticulturae*, вирулентные к *Lr24*, появились в Северной и Южной Америке, а также в Южной Африке, где транслокацию с генами *Lr24/Sr24* применяли в течение длительного времени (Park et al., 2002; Kolmer et al., 2007; Li H., Wang, 2009). На примерах популяций *P. triticulturae* в США показано, что доли вирулентных к *Lr19* и *Lr24* аллелей были выше в регионах, где преимущественно культивировали сорта с комплементарными генами, но

снижались в других зонах (Kolmer et al., 2007; Kolmer, 2013). В других регионах мира, где сорта с транслокацией *Sr24/Lr24* были мало распространены, гены *Sr24* и *Lr24* остаются эффективными (Xu X. et al., 2018; Gulyaeva et al., 2021).

Посевы мягкой пшеницы в России представляют собой интересную модель для оценки действия генов устойчивости к листовой и стеблевой ржавчине. Основные посевы расположены в европейской (Северо-Кавказский, Центрально-Черноземный, Центральный и Поволжский регионы) и азиатской (Южный Урал и Западная Сибирь) частях страны. На посевах существуют различающиеся европейские и азиатские популяции *P. graminis* f. sp. *tritici* и *P. triticina* (Сколотнева и др., 2020; Gulyaeva et al., 2021). Поволжье и Южный Урал являются зонами контакта между популяциями благодаря переносу спор патогенов воздушными потоками (Gulyaeva et al., 2021).

В 1970–2020 гг. в регионах России были созданы сорта, защищенные различными генами *Lr* и *Sr* из третичного генофонда. Поволжские сорта (в разные годы от 15 до 30 %) несли транслокации *Lr19/Sr25* и *Lr6Agi/Sr6Agi* (Сибикеев и др., 2017; Gulyaeva et al., 2021). В южноуральские сорта были введены гены *Lr9* и *LrSp* от *Ae. umbellulata* и *Ae. speltoides* соответственно, а в западносибирские – *Lr9*. Гены *Lr26/Sr31* и комбинации менее эффективных генов *Lr* и *Sr* присутствовали в сортах всех регионов, а *Sr24/Lr24* были редки (менее 1 % сортов) (Gulyaeva et al., 2021; Baranova et al., 2023). Долговременное изучение популяций *P. triticina* показало, что вирулентность к *Lr19* преобладала в поволжской популяции до 2010 г., но по мере расширения спектра генов устойчивости частота аллелей вирулентности к *Lr19* снизилась. Аллели вирулентности к *Lr19* и *Lr9* не накапливались в популяциях *P. triticina*, если в регионах отсутствовали (или были мало распространены) сорта с комплементарными генами. Так, в Центральном и Северо-Западном регионах, близких к Поволжью, аллели вирулентности к *Lr19* и *Lr9* были редкими в 2001–2010 гг., а позже исчезли из популяций (Gulyaeva et al., 2023). В Южно-Уральском и Западно-Сибирском регионах ген *Lr9* был преодолен в 2008 г. (Мешкова и др., 2012), но *Lr19* остается эффективным (Gulyaeva et al., 2021). Во всех популяциях вирулентность к *Lr24* была чрезвычайно редкой, а вирулентность к *Lr6Agi* и *LrSp* полностью отсутствовала. Также не обнаружено патотипов, вирулентных к комбинациям *Lr19 + Lr26* и *Lr9 + Lr26* (Gulyaeva et al., 2021).

Стеблевая ржавчина в течение длительного времени существенно не поражала посевы пшеницы в большинстве регионов России. Первые сильные вспышки болезни были отмечены в Поволжье в 2013 и 2014 гг., а также в Западной Сибири и соседнем Северном Казахстане в 2015 г. (Сибикеев и др., 2016; Shamanin et al., 2016). Сорта с геном *Sr31* были поражены в обоих регионах (Сибикеев и др., 2016; Plotnikova et al., 2022), но новые патотипы не принадлежали к расе Ug99 (Patpour et al., 2022). В следующие годы вирулентные патотипы исчезли из популяций, и ген *Sr31* остается эффективным в России (Сколотнева и др., 2020; Baranova et al., 2023). К концу эписитотии стеблевой ржавчины в Западной Сибири в 2015 г. сорта и линии с генами *Sr24*, *Sr25* и *Sr26* были умеренно поражены, однако затем

их устойчивость восстановилась (Plotnikova et al., 2023a). В Поволжье линии с генами *Sr25* проявили восприимчивость к стеблевой ржавчине в 2022 г., но гены *Sr24* и *Sr26* остались высокоэффективными (Baranova et al., 2023).

После преодоления отдельных генов устойчивости к ржавчинным болезням сорта начали защищать с комбинациями генов. Комбинации пырейных генов (*Sr24/Lr24* или *Lr19/Sr25*) с ржаными *Lr26/Sr31* или *Sr36/Pm6* от *T. timopheevii*, а также *Lr9 + Lr26/Sr31* были высокоэффективны против ржавчины в разных регионах мира (Park et al., 2002; Martynov et al., 2016; Gulyaeva et al., 2021). В Поволжье также были эффективны комбинации *Lr19/Sr25 + Lr6Agi/Sr6Agi* или *Lr19/Sr25 + Sr22* (от *T. monococcum*) (Сибикеев и др., 2017, 2021). Высокую устойчивость к бурой и стеблевой ржавчине показали сорта с комбинациями пырейных генов *Lr19/Sr25* или *Sr24/Lr24* с любым из APR генов, представленных в сложных локусах: *Lr34/Sr57/Yr18/Pm38*, *Sr2/Lr27/Yr30*, *Lr46/Sr58/Yr29*, *Lr67/Sr55/Yr46* (Aravindh et al., 2020).

### Цена вирулентности к генам третичного генофонда и проявление механизмов устойчивости видов-нехозяев в интрогрессивных образцах пшеницы

В агроэкосистемах постоянно происходит сопряженная эволюция патогенов с растениями, направленная на преодоление устойчивости сортов. На примере *P. triticina* было показано, что в популяциях регулярно появляются новые патотипы, но более половины из них встречаются однократно, а затем исчезают (Gulyaeva et al., 2023). Для закрепления в популяции новая форма должна приобрести набор признаков, усиливающих ее приспособленность. Приспособленность (fitness) определяют как относительную способность генотипа существовать во времени и вносить вклад в генофонд популяции. Приспособленность зависит как от жизнеспособности генотипа, так и от интенсивности его размножения (Park et al., 2002). Новые гены вирулентности позволяют расширять круг пораженных растений, но могут иметь разное влияние (цену) на приспособленность патогенов (virulence cost, fitness penalty). При благоприятных условиях среды новый патотип может накапливать гены-модификаторы, повышающие его адаптивные свойства. Однако в стрессовых условиях новые гены могут снизить жизнеспособность и размножение, что проявляется в снижении приспособленности паразита, а в некоторых случаях приводит к летальному эффекту и быстрому исчезновению новой формы из популяции (Antonovics, Alexander, 1989; Zhan J., McDonald, 2013).

Растения играют роль среды обитания для паразитических грибов, поэтому генотипы сортов и разнообразие культур оказывают большое влияние на популяции патогенов. Цена вирулентности может отрицательно коррелировать с длительностью устойчивости сортов к болезням. Наблюдавшееся в 1960–1990 гг. подавление популяций *P. graminis* f. sp. *tritici* в большинстве регионов мира после распространения сортов пшеницы с геном *Sr31*, а также исчезновение вирулентных к *Sr31* клонов из российских популяций в 2020-х гг. показывают, что цена вирулентности к этому гену велика, что резко снижает при-

способленность патогена. В то же время появление расы Ug99 продемонстрировало возможность повышения приспособленности в условиях Африки при адаптации к сортам с геном *Sr31*. Отмечено увеличение частоты вирулентных рас в регионах со значительной долей сортов с *Lr19*, *Lr24*, *Sr24* и *Sr25*, но снижение их частоты в регионах с другим набором сортов (Kolmer, 2013; Gultyaeva et al., 2021; Varanova et al., 2023). Это свидетельствует о том, что вирулентные к пырейным генам патотипы получили некоторое конкурентное преимущество на соответствующих сортах, но их приспособленность снизилась в других зонах. О высокой цене вирулентности к генам *Lr28* и *LrSp* от *Ae. speltoides* (вплоть до летальности) свидетельствует то, что вирулентные патотипы в российских популяциях *P. triticina* не выявлены в течение десятилетий (Gultyaeva et al., 2021). В Западной Сибири в 2015 г. отмечено резкое повышение частоты вирулентности к *Lr47* (от *Ae. speltoides*) – до 70 %, но в следующие годы вирулентные клоны исчезли из популяции (Плотникова и др., 2018). Вероятно, вирулентность к гену *Lr47* значительно снижает приспособленность гриба.

Патогенные грибы не способны существовать на видах, к которым они не были специализированы, так называемых нехозяевах. Устойчивость видов-нехозяев редко преодолевается, поэтому ее генетический контроль и защитные механизмы представляют большой интерес (Niks, 2014). Для создания сортов с длительной устойчивостью к болезням считается перспективным перенос защитных механизмов видов-нехозяев в культурные растения. Согласно сформулированной в 2010-х гг. гипотезе, устойчивость к патогенам нехозяев и хозяев контролируется различными генетическими системами (PTI и ETI соответственно) (Peng et al., 2018).

При изучении взаимодействия *P. graminis* f. sp. *tritici* с видами-нехозяевами *S. cereale* и *Th. ponticum* было установлено, что развитие патогена прекращалось на ранних стадиях развития, до внедрения в ткани (прегаусториальная устойчивость). Нарушение взаимодействия проявлялось в нарушении ориентации инфекционных структур на поверхности растений и подавлении образования аппрессориев, обеспечивающих проникновение в устьица (Plotnikova et al., 2022, 2023a). При заражении *P. graminis* f. sp. *tritici* линий и сортов пшеницы с ржаными и пырейными генами (*Sr31*, *Sr24*, *Sr25* и *Sr26*) были выявлены сходные признаки нарушения развития на поверхности растений. Кроме того, в растениях с этими генами установлена генерация активных форм кислорода (АФК) защитными клетками устьиц при контакте с аппрессориями. Генерация АФК приводила к гибели ржавчинного гриба до проникновения в ткани растений (Plotnikova et al., 2022, 2023a). Очевидно, гены пырея и ржи распознают разные компоненты клеточных стенок патогена.

Сходные защитные механизмы были определены при взаимодействии *P. triticina* с видами-нехозяевами и линиями пшеницы с пырейными генами *Lr19* и *Lr38* (Плотникова, 2008, 2009). Аналогичная генерация АФК защитными клетками устьиц, названная устьичным иммунитетом, была обнаружена при инфицировании модельного вида *Arabidopsis thaliana* непатогенными бактериями *Escherichia coli* и *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Zeng, He,

2010; Melotto et al., 2017). Это указывает на то, что отдельные гены третичного генофонда могут обеспечивать сходные с нехозяйскими защитные механизмы, которые подавляют развитие гриба на ранних стадиях и предотвращают проникновение в ткани. При возникновении вирулентности химический состав и иммунологические свойства клеточной стенки гриба могут изменяться. Вероятно, такие изменения влияют на жизнеспособность и приспособленность мутантных клонов, что приводит к исчезновению их из популяций. Можно предположить, что появление у патогенов вирулентности к двум генам (*Sr24* + *Sr31* или *Lr19* + *Lr26* и т. д.) вызывает потерю/изменение набора важных компонентов клеток, что вредно или летально для патотипов. Это объясняет высокую устойчивость сортов с сочетаниями транслокаций от пырея и ржи к стеблевой и бурой ржавчине в разных регионах мира.

Благодаря прогрессу в области молекулярной генетики появилась возможность переноса в сорта набора генов устойчивости в форме кассет (до пяти генов). Для конструирования сортов с длительной устойчивостью к биотрофным патогенам особый интерес представляют гены, контролирующие устойчивость РТИ-типа (нехозяев) (Liu X. et al., 2021). В связи с этим гены *Thinopyrum* и родственных родов, обеспечивающие защиту, сходную с нехозяйской, перспективны для создания эффективных генных кассет.

## Заключение

Увеличение производства зерна пшеницы является стратегической задачей для обеспечения продовольствием растущего населения мира. Расширение генетического разнообразия сортов необходимо для организации устойчивого зернового производства. Виды вторичного и третичного генофондов с гомеологичными геномами, включая род *Thinopyrum*, признаны важными источниками генов устойчивости к болезням и абиотическим факторам. Наиболее ценны для селекции полиплоидные виды *Th. ponticum* и *Th. intermedium*. Исследования, проведенные в последние десятилетия, показали, что родственные виды *Th. elongatum*, *Th. bessarabicum*, *Th. junceiforme* и *A. cristatum* также могут быть донорами полезных признаков для улучшения свойств пшеницы. В настоящее время создано большое число интрогрессивных линий пшеницы, устойчивых к заболеваниям (включая виды ржавчины, мучнистую росу, септориозы, фузариоз колоса, желтую пятнистость и вирусные болезни) и толерантных к абиотическим факторам (засухе, экстремальным температурам, засолению и т. д.). Однако в селекции использовали небольшое число интрогрессий, что связано с негативным воздействием остальных чужеродных фрагментов на агрономические признаки пшеницы. Для улучшения свойств интрогрессивных линий были проведены работы по уменьшению размеров локусов или использованию компенсирующих Робертсоновских транслокаций (RobTs), восстанавливающих утраченные функции пшеничной хромосомы.

Опыт длительного культивирования сортов с генами, интрогрессированными от *S. cereale* и *Th. ponticum*, показал, что они существенно влияют на популяции *P. graminis* f. sp. *tritici* и *P. triticina*. Вероятно, аллели вирулент-



ности к ржаным и пырейным генам снижают приспособленность ржавчинных грибов, что приводит к частичному или полному устранению новых патотипов из популяций грибов. Сорты с комбинациями транслокаций от пырея удлиненного и ржи сохраняют высокую устойчивость к стеблевой и бурой ржавчине в различных регионах мира. Виды *Th. ponticum* и *S. cereale* являются видами-нехозяевами для *P. graminis* f. sp. *tritici* и *P. triticina*, и их защитные механизмы обеспечивают подавление развития патогенов на поверхности растений или при попытке внедрения в устьица. Гены устойчивости, интрогрессированные от *Th. ponticum* и *S. cereale* (*Sr24*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr31*, *Lr19*, *Lr38*), контролируют проявления устойчивости, сходные с защитными механизмами нехозяев. Такие особенности делают эти гены (и гены с аналогичным действием) перспективными для создания сортов с длительной устойчивостью, что может быть ускорено с помощью молекулярных технологий.

## Список литературы / References

Гончаров Н.П. Научное обеспечение селекции и семеноводства Сибири в XXI в. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(4):448-459. DOI 10.18699/VJ21.050

[Goncharov N.P. Scientific support to plant breeding and seed production in Siberia in the XXI century. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(4):448-459. DOI 10.18699/VJ21.050]

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., Zinchenco A.N., Zubanova Y.S., Mikov D.S. Introgression of common wheat lines with genetic material of *Agropyron glaucum*. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2016;6(1):54-61. DOI 10.1134/S2079059716010056]

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 Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(3):321-328. DOI 10.18699/VJ18.367 (in Russian)]

Мешкова Л.В., Россеева Л.П., Кореньюк Е.А., Белан И.А. Динамика распространения патотипа возбудителя бурой ржавчины, вирулентного к сортам пшеницы с геном *Lr9* в Омской области. *Микология и фитопатология*. 2012;46(6):397-400

[Meshkova L.V., Rosseeva L.P., Korenyuk E.A., Belan I.A. Dynamics of distribution of the wheat leaf rust pathotypes virulent to the cultivars with *Lr9* gene in Omsk region. *Mikologiya i Fitopatologiya* = *Mycology and Phytopathology*. 2012;46(6):397-400 (in Russian)]

Плотникова Л.Я. Влияние свойств поверхности и физиологических реакций растений-нехозяев на развитие клеточных структур ржавчинных грибов. *Цитология*. 2008;50(5):439-446

[Plotnikova L.Ya. Influence of the surface features and physiological reactions of non-host species on the development of cellular structures of rust fungi. *Tsitologiya* = *Cytology*. 2008;50(5):439-446 (in Russian)]

Плотникова Л.Я. Участие активных форм кислорода в защите линий пшеницы с генами устойчивости видов рода *Agropyron* от бурой ржавчины. *Физиология растений*. 2009;56(2):181-189

[Plotnikova L.Ya. The involvement of reactive oxygen species in defense of wheat lines with the genes introgressed from *Agropy-*

*ron* species contributing the resistance against brown rust. *Russ. J. Plant Physiol.* 2009;56(2):181-189. DOI 10.1134/S102144370902006X]

Плотникова Л.Я., Айдосова А.Т., Рыспекова А.Н., Мясников А.Ю. Интрогрессивные линии мягкой пшеницы с генами пырея *Agropyron elongatum*, устойчивые к листовым болезням, на юге Западной Сибири. *Вестн. ОмГАУ*. 2014;4(16):3-7

[Plotnikova L.Ya., Aidosova A.T., Rispekova A.N., Myasnikov A.Yu. Introgressive lines of common wheat with genes of wheat grass *Agropyron elongatum* resistant to leaf diseases in the South West Siberia. *Vestnik OmGAU* = *OmskSAU Bull.* 2014;4(16):3-7 (in Russian)]

Плотникова Л.Я., Мешкова Л.В., Гультяева Е.И., Митрофанова О.П., Лапочкина И.Ф. Тенденция преодоления устойчивости к бурой ржавчине интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *Aegilops speltoides* Tausch. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(5):560-567. DOI 10.18699/VJ18.395

[Plotnikova L.Ya., Meshkova L.V., Gulytyaeva E.I., Mitrofanova O.P., Lapochkina I.F. A tendency towards leaf rust resistance decrease in common wheat introgression lines with genetic material from *Aegilops speltoides* Tausch. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(5):560-567. DOI 10.18699/VJ18.395 (in Russian)]

Плотникова Л.Я., Сагендыкова А.Т., Игнатъева Е.Ю. Защита мягкой пшеницы с помощью генов пырея удлиненного при ускорении физиологической специализации возбудителя стеблевой ржавчины. *Вестн. ОмГАУ*. 2021;4:35-44. DOI 10.48136/2222-0364\_2021\_4\_35

[Plotnikova L.Ya., Sagendykova A.T., Ignatyeva E.Y. Defence of bread wheat with the tall wheatgrass genes while accelerating the physiological specialization of the causative agent of stem rust. *Vestnik OmGAU* = *OmskSAU Bull.* 2021;4:35-44. DOI 10.48136/2222-0364\_2021\_4\_35 (in Russian)]

Потоцкая И.В., Шаманин В.П., Айдаров А.Н., Моргунцов А.И. Использование пырея среднего (*Thinopyrum intermedium*) в селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(5):413-421. DOI 10.18699/VJGB-22-51

[Pototskaya I.V., Shamanin V.P., Aydarov A.N., Morgounov A.I. The use of wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*) in breeding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(5):413-421. DOI 10.18699/VJGB-22-51 (in Russian)]

Сибикеев С.Н., Марклова Т.С., Баукунова Е.А., Дружин А.Е. Вероятная угроза распространения расы Ug99 *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* пшеницы на Юго-Востоке России. *Рос. с.-х. наука*. 2016;1:18-20

[Sibikeev S.N., Markelova T.S., Baukenova E.A., Druzhin A.E. Likely threat of the spread of race Ug99 of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* on wheat in Southeastern Russia. *Russ. Agric. Sci.* 2016;42(2):145-148. DOI 10.3103/S1068367416020154]

Сибикеев С.Н., Бадаева Е.Д., Гультяева Е.И., Дружин А.Е., Шишкина А.А., Драгович А.Ю., Крупин П.Ю., Карлов Г.И., Кхуат Т.М., Дивашук М.Г. Сравнительный анализ хромосом 6Ag<sup>1</sup> и 6Ag<sup>2</sup> *Agropyron intermedium* (Host) Beauv в сортах мягкой пшеницы и линиях с пшенично-пырейными замещениями. *Генетика*. 2017;53(3):298-309. DOI 10.7868/S0016675817030110

[Sibikeev S.N., Badaeva E.D., Gulytyaeva E.I., Druzhin A.E., Shishkina A.A., Dragovich A.Y., Kroupin P.Y., Karlov G.I., Khuat T.M., Divashuk M.G. Comparative analysis of *Agropyron intermedium* (Host) Beauv 6Ag<sup>1</sup> and 6Ag<sup>2</sup> chromosomes in bread wheat cultivars and lines with wheat-pyrene grass substitutions. *Russ. J. Genet.* 2017;53(3):314-324. DOI 10.1134/S1022795417030115]

Сибикеев С.Н., Баранова О.А., Дружин А.Е. Пребридинговое изучение интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы, несущих комбинации *Sr22+Sr25* и *Sr35+Sr25* генов устойчивости к стеблевой ржавчине. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(7):713-722. DOI 10.18699/VJ21.081



- [Sibikeev S.N., Baranova O.A., Druzhin A.E. A prebreeding study of introgression spring bread wheat lines carrying combinations of stem rust resistance genes, *Sr22+Sr25* and *Sr35+Sr25*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(7):713-722. DOI 10.18699/VJ21.081]
- Сколотнева Е.С., Кельбин В.Н., Моргунов А.И., Бойко Н.И., Шаманин В.П., Салина Е.А. Расовый состав Новосибирской популяции *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Микология и фитопатология*. 2020;54(1):49-58. DOI 10.31857/s0026364820010092
- [Skolotneva E.S., Kelbin V.N., Morgunov A.I., Boiko N.I., Shamanin V.P., Salina E.A. Races composition of the Novosibirsk population of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Biol. Bull. Rev.* 2023;13(1):S114-S122. DOI 10.1134/S2079086423070125]
- Торопова Е.Ю., Казакова О.А., Пискарев В.В. Эпифитотический процесс септориоза на сортах яровой пшеницы. *Вавилровский журнал генетики и селекции*. 2020;24(2):139-148. DOI 10.18699/VJ20.609
- [Торопова Е.Ю., Казакова О.А., Пискарев В.В. *Septoria* blotch epidemic process on spring wheat varieties. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020; 24(2):139-148. DOI 10.18699/VJ20.609]
- Упельник В.П., Белов В.И., Иванова Л.П., Долгова С.П., Демидов А.С. Наследие академика Н.В. Цицина – современное состояние и перспективы использования коллекции промежуточных пшенично-пырейных гибридов. *Вавилровский журнал селекции и генетики*. 2012;16(3):667-674
- [Upel'nik V.P., Belov V.I., Ivanova L.P., Dolgova S.P., Demidov A.S. Heritage of academician N.V. Tsitsin: state-of-the-art and potential of the collection of intermediate wheat × couch grass hybrids. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2012;16(3):667-674 (in Russian)]
- Фисенко А.В., Кузмина Н.П. Отдаленная гибридизация в селекции озимой пшеницы на зимостойкость. *Аграр. Россия*. 2020;5:3-8. DOI 10.30906/1999-5636-2020-5-3-8
- [Fisenko A.V., Kuzmina N.P. Remote hybridization of wheat in winter hardiness selection. *Agrarnaya Rossiya = Agricultural Russia*. 2020;5:3-8. DOI 10.30906/1999-5636-2020-5-3-8 (in Russian)]
- Цицин Н.В. Проблемы отдаленной гибридизации. В: Проблемы отдаленной гибридизации. М.: Колос, 1979;5-20
- [Tsitsin N.V. Issues of remote hybridization. In: Issues of Remote Hybridization. Moscow: Kolos Publ., 1979;5-20 (in Russian)]
- Ali N., Mujeeb-Kazi A. Food production: global challenges to mitigate climate change. In: Physiological, Molecular, and Genetic Perspectives of Wheat Improvement. 2021;1-13. DOI 10.1007/978-3-030-59577-7\_1
- Ali S., Rodriguez-Algaba J., Thach T., Sørensen C.K., Hansen J.G., Lassen P., Nazari K., Hodson D.P., Justesen A.F., Hovmøller M.S. Yellow rust epidemics worldwide were caused by pathogen races from divergent genetic lineages. *Front. Plant Sci.* 2017;8:1057. DOI 10.3389/fpls.2017.01057
- Alisaac E., Mahlein A.-K. *Fusarium* head blight on wheat: biology, modern detection and diagnosis and integrated disease management. *Toxins*. 2023;15(3):192. DOI 10.3390/toxins15030192
- Antonovics J., Alexander H.M. The concept of fitness in plant-fungal pathogen systems. In: Leonard K.J., Fry W.E. (Eds.) *Plant Disease Epidemiology*. New York: McGraw-Hill, 1989;2:185-214
- Aravindh R., Sivasamy M., Ganesamurthy K., Jayaprakash P., Gopalakrishnan C., Geetha M., Nisha R., Shajitha P., Peter J., Sindhu P.A., Vikas V.K. Marker assisted stacking/pyramiding of stem rust, leaf rust and powdery mildew disease resistance genes (*Sr2/Lr27/Yr30*, *Sr24/Lr24* and *Sr36/Pm6*) for durable resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Electron. J. Plant Breed.* 2020;11(3):907-991. DOI 10.37992/2020.1103.148
- Arora S., Steuernagel B., Gaurav K., Chandramohan S., Long Y., Matny O., Johnson R., Enk J., Periyannan S., Singh N., ... Bentley A.R., Ayliffe M., Olson E., Xu S.S., Steffenson B.J., Lagudah E., Wulff B.B.H. Resistance gene cloning from a wild crop relative by sequence capture and association genetics. *Nat. Biotechnol.* 2019; 37(2):139-143. DOI 10.1038/s41587-018-0007-9
- Babkenova S.A., Babkenov A.T., Pakholkova E.V., Kanafin B.K. Pathogenic complexity of *Septoria* spot disease of wheat in northern Kazakhstan. *Plant Sci. Today*. 2020;7(4):601-606. DOI 10.14719/pst.2020.7.4.798
- Bajgain P., Zhang X., Jungers J.M., DeHaan L.R., Heim B., Sheaffer C.C., Wyse D.L., Anderson J.A. 'MN-Clearwater', the first food-grade intermediate wheatgrass (*Kernza* perennial grain) cultivar. *J. Plant Regist.* 2020;14(3):288-297. DOI 10.1002/plr.2.20042
- Baker L., Grewal S., Yang C., Hubbart-Edwards S., Scholefield D., Ashling S., Burridge A., Przewieslik-Allen A., Wilkinson P., King I., 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
- Baranova O., Solyanikova V., Kyrova E., Konkova E., Gaponov S., Sergeev V., Shevchenko S., Mal'chikov P., Dolzhenko D., Bepalova L., Ablova I., Tarhov A., Vasilova N., Askhadullin D., Askhadullin D., Sibikeev S.N. Evaluation of resistance to stem rust and identification of *Sr* genes in Russian spring and winter wheat cultivars in the Volga region. *Agriculture*. 2023;13(3):635. DOI 10.3390/agriculture13030635
- Bhardwaj S.C., Prashar M., Kumar M., Jain S.K., Datta D. *Lr19* resistance in wheat becomes susceptible to *Puccinia triticina* in India. *Plant Dis.* 2005;89(12):1360. DOI 10.1094/PD-89-1360A
- Bhavani S., Hodson D.P., Huerta-Espino J., Randhawa M.S., Singh R.P. Progress in breeding for resistance to Ug99 and other races of the stem rust fungus in CIMMYT wheat germplasm. *Front. Agric. Sci. Eng.* 2019;6(3):210-224. DOI 10.15302/J-FASE-2019268
- Brar G.S., Fetch T., McCallum B.D., Hucl P.J., Kutcher H.R. Virulence dynamics and breeding for resistance to stripe, stem, and leaf rust in Canada since 2000. *Plant Dis.* 2019;103(12):2981-2995. DOI 10.1094/PDIS-04-19-0866-FE
- Carmona M.A., Ferrazini M., Barreto D.E. Tan spot of wheat caused by *Drechslera tritici-repentis*: detection, transmission, and control in wheat seed. *Cereal Res. Commun.* 2006;34(2-3):1043-1049. DOI 10.1556/CRC.34.2006.2-3.236
- Ceoloni C., Kuzmanović L., Forte P., Gennaro A., Bitti A. Targeted exploitation of gene pools of alien *Triticeae* species for sustainable and multi-faceted improvement of the durum wheat crop. *Crop Pasture Sci.* 2014;65(1):96-111. DOI 10.1071/CP13335
- Ceoloni C., Forte P., Kuzmanović L., Tundo S., Moscetti I., De Vita P., Virili M.E., D'Ovidio R. Cytogenetic mapping of a major locus for resistance to *Fusarium headblight* and crown rot of wheat on *Thinopyrum elongatum* 7EL and its pyramiding with valuable genes from a *Th. ponticum* homoeologous arm onto bread wheat 7DL. *Theor. Appl. Genet.* 2017;130(10):2005-2024. DOI 10.1007/s00122-017-2939-8
- 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 Q., Conner R.L., Laroche A. Identification of the parental chromosomes of the wheat-alien amphiploid agrotana by genomic in situ hybridization. *Genome*. 1995;38(6):1163-1169. DOI 10.1139/g95-154
- Chen Q., Conner R.L., Laroche A., Thomas J.B. Genome analysis of *Thinopyrum intermedium* and *Thinopyrum ponticum* using genomic in situ hybridization. *Genome*. 1998;41(4):580-586. DOI 10.1139/g98-055
- Chen S., Huang Z., Dai Y., Qin Y., Zhang L., Gao Y., Chen J. The development of 7E chromosome-specific molecular markers for *Thinopyrum elongatum* based on SLAF-seq technology. *PLoS One*. 2013;8(6):e65122. DOI 10.1371/journal.pone.0065122
- Chen X.M. Epidemiology and control of stripe rust [*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*] on wheat. *Can. J. Plant Pathol.* 2005;27:314-337. DOI 10.1080/07060660509507230

- Colmer T.D., Flowers T.J., Munns R. Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *J. Exp. Bot.* 2006;57(5):1059-1078. DOI 10.1093/jxb/erj124
- Curtis T., Halford N.G. The challenge of increasing wheat yield and the importance of not compromising food safety. *Ann. Appl. Biol.* 2014;164(3):354-372. DOI 10.1111/aab.12108
- FAO Report. The impact of disasters and crises on agriculture and food security. Rome: FAO, 2021. DOI 10.4060/cb3673en
- Fedak G., Chen Q., Conner R.L., Laroche A., Petroski R., Armstrong K.W. Characterization of wheat-*Thinopyrum* partial amphiploids by meiotic analysis and genomic in situ hybridization. *Genome*. 2000;43(4):712-719. DOI 10.1139/g00-027
- Fones H., Gurr S. The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: an EU perspective. *Fungal Genet. Biol.* 2015;79:3-7. DOI 10.1016/j.fgb.2015.04.004
- Frailie T.B., Innes R.W. Engineering healthy crops: molecular strategies for enhancing the plant immune system. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2021;70:151-157. DOI 10.1016/j.copbio.2021.04.006
- Friebe B., Jiang J., Knott D.R., Gill B.S. Compensation indices of radiation-induced wheat-*Agropyron elongatum* translocations conferring resistance to leaf rust and stem rust. *Crop Sci.* 1994;34(2):400-404. DOI 10.2135/cropsci1994.0011183X003400020018x
- Friebe B., Jiang J., Raupp W.J., McIntosh R.A., Gill B.S. Characterization of wheat-alien translocations resistance to diseases and pest: current status. *Euphytica*. 1996;91:59-87. DOI 10.1007/BF00035277
- Friebe B., Raupp W.J., Gill B.S. Wheat alien translocation lines. *Ann. Wheat Newslett.* 2000;46:198-202
- Friebe B., Zhang P., Linc G., Gill B.S. Robertsonian translocations in wheat arise by centric misdivision of univalents at anaphase I and rejoining of broken centromeres during interkinesis of meiosis II. *Cytogenet. Genome Res.* 2005;109(1-3):293-297. DOI 10.1159/000082412
- Gao P., Zhou Y., Gebrewahid T.W., Zhang P., Yan X., Li X., Yao Z., Li Z., Liu D. Identification of known leaf rust resistance genes in common wheat cultivars from Sichuan province in China. *Crop Protect.* 2019;115:122-129. DOI 10.1016/j.cropro.2018.09.012
- Gill B.S., Friebe B., Wilson D.L., Cox T.S. Registration of KS93WGRC27 wheat streak mosaic virus-resistant T4DL-4Ai#2S wheat germplasm. *Crop Sci.* 1995;35(4):1236-1237. DOI 10.2135/cropsci1995.0011183X003500040100x
- Gorham J., Forster B.P., Budrewicz E., Wyn J.R.G., Miller T.E., Law C.N. Salt tolerance in the Triticeae: solute accumulation and distribution in an amphidiploid derived from *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring and *Thinopyrum bessarabicum*. *J. Exp. Bot.* 1986;37(10):1435-1449. DOI 10.1093/jxb/37.10.1435
- Gulyaeva E., Shaydayuk E., Gannibal P. Leaf rust resistance genes in wheat cultivars registered in Russia and their influence on adaptation processes in pathogen populations. *Agriculture*. 2021;11(4):319. DOI 10.3390/agriculture11040319
- Gulyaeva E., Shaydayuk E., Kosman E. Virulence diversity of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in common wheat in Russian regions in 2019–2021. *Agriculture*. 2022;12(11):1957. DOI 10.3390/agriculture12111957
- Gulyaeva E., Gannibal P., Shaydayuk E. Long-term studies of wheat leaf rust in the north-western region of Russia. *Agriculture*. 2023;13(2):255. DOI 10.3390/agriculture13020255
- Guo J., Yu X., Yin H., Liu G., Li A., Wang H., Kong L. Phylogenetic relationships of *Thinopyrum* and *Triticum* species revealed by SCoT and CDDP markers. *Plant Syst. Evol.* 2016;302:1301-1309. DOI 10.1007/s00606-016-1332-4
- Guo X., Huang Y., Wang J., Fu S., Wang C., Wang M., Zhou C., Hu X., Wang T., Yang W., Han F. Development and cytological characterization of wheat-*Thinopyrum intermedium* translocation lines with novel stripe rust resistance gene. *Front. Plant Sci.* 2023;14:1135321. DOI 10.3389/fpls.2023.1135321
- Han H., Ma X., Wang Z., Qi K., Yang W., Liu W., Zhang J., Zhou S., Lu Y., Yang X., Li X., Li L. Chromosome 5P of *Agropyron cristatum* induces chromosomal translocation by disturbing homologous chromosome pairing in a common wheat background. *Crop J.* 2023;11(1):228-237. DOI 10.1016/j.cj.2022.06.002
- Hang A., Bockelman H.E., Burton C.S. Cytological and seed morphological investigation of 250 accessions from the W.J. Sando collection. Agronomy Society of America, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America meeting, November 6–10, 2005. Salt Lake City, Utah, 2005
- Hao M., Zhang L., Ning S., Huang L., Yuan Z., Wu B., Yan Z., Dai S., Jiang B., Zheng Y., Liu D. The resurgence of introgression breeding, as exemplified in wheat improvement. *Front. Plant Sci.* 2020;11:252. DOI 10.3389/fpls.2020.00252
- Hassani H.S., King I.P., Reader S.M., Caligari P.D.S., Miller T.E. Can tritipyrum, a new salt tolerant potential amphiploid, be a successful cereal like triticae? *J. Agric. Sci. Technol.* 2000;2(3):177-195
- He F., Wang Y.H., Bao Y.G., Ma Y.X., Wang X., Li X.F., Wang X. Chromosomal constitutions of five wheat-*Elytrigia elongata* partial amphiploids as revealed by GISH, multicolor GISH and FISH. *Comp. Cytogen.* 2017;11(3):525-540. DOI 10.3897/CompCytogen.v11i3.11883
- He R.L., Chang Z.J., Yang Z.J., Yuan Z.Y., Zhan H.X., Zhang X.J., Liu J.X. Inheritance and mapping of powdery mildew resistance gene *Pm43* introgressed from *Thinopyrum intermedium* into wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2009;118(6):1173-1180. DOI 10.1007/s00122-009-0971-z
- Hohmann U., Badaeva K., Busch W., Friebe B., Gill B.S. Molecular cytogenetic analysis of *Agropyron chromatin* specifying resistance to barley yellow dwarf virus in wheat. *Genome*. 1996;39(2):336-347. DOI 10.1139/g96-044
- Hou L., Jia J., Zhang X., Li X., Yang Z., Ma J., Guo H., Zhan H., Qiao L., Chang Z. Molecular mapping of the stripe rust resistance gene *Yr69* on wheat chromosome 2AS. *Plant Dis.* 2016;100(8):1717-1724. DOI 10.1094/PDIS-05-15-0555-RE
- Huang Q., Li X., Chen W., Xiang Z., Zhong S., Chang Z., Zhang M., Zhang H.Y., Tan F.Q., Ren Z.L., Luo P.G. Genetic mapping of a putative *Thinopyrum intermedium*-derived stripe rust resistance gene on wheat chromosome 1B. *Theor. Appl. Genet.* 2014;127(4):843-853. DOI 10.1007/s00122-014-2261-7
- Huerta-Espino J., Singh R.P. First report on virulence in wheat with leaf rust resistance gene *Lr19* in Mexico. *Plant Dis.* 1994;78:640. DOI 10.1094/PD-78-0640C
- Jiang B., Liu T., Li H., Han H., Li L., Zhang J., Yang X., Zhou S., Li X., Liu W. Physical mapping of a novel locus conferring leaf rust resistance on the long arm of *Agropyron cristatum* chromosome 2P. *Front. Plant Sci.* 2018;9:817. DOI 10.3389/fpls.2018.00817
- Jin Y., Szabo L.J., Pretorius Z.A., Singh R.P., Ward R., Fetch T., Jr. Detection of virulence to resistance gene *Sr24* with in race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Dis.* 2008;92(6):923-926. DOI 10.1094/PDIS-92-6-0923
- Johnson R. Genetic background of durable resistance. In: Lamberti F., Waller J.M., Vander Graaff N.A. (Eds.) Durable Resistance in Crops. New York: Plenum Press, 1983;152-163
- Knott D.R. Translocations involving *Triticum* chromosomes and *Agropyron* chromosomes carrying rust resistance. *Can. J. Genet. Cytol.* 1968;10(3):695-696. DOI 10.1139/g68-087
- Kocheshkova A.A., Kroupin P.Y., Bazhenov M.S., Karlov G.I., Pochtovy A.A., Upelnik V.P., Belov V.I., Divashuk M.G. Pre-harvest sprouting resistance and haplotype variation of ThVp-1 gene in the collection of wheat-wheatgrass hybrids. *PLoS One.* 2017;12(11):e0188049. DOI 10.1371/journal.pone.0188049
- Kolmer J. Leaf rust of wheat: pathogen biology, variation and host resistance. *Forests.* 2013;4(1):70-84. DOI 10.3390/f4010070
- Kolmer J.A., Jin Y., Long D.L. Wheat leaf and stem rust in the United States. *Aust. J. Agric. Res.* 2007;58(6):631-638. DOI 10.1071/AR07057
- Kosová K., Vítámvás P., Urban M.O., Kholová J., Prášil I.T. Breeding for enhanced drought resistance in barley and wheat – drought-associated traits, genetic resources and their potential utilization in

- breeding programmes. *Czech J. Gen. Pl. Breed.* 2014;50(4):247-261. DOI 10.17221/118/2014-CJGPB
- 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.* 2019;13(3):231-243. DOI 10.3897/CompCytogen.v13i3.36112
- Kumar A., Choudhary A., Kaur H., Mehta S. A walk towards wild grasses to unlock the clandestine of gene pools for wheat improvement: a review. *Plant Stress.* 2022;3:100048. DOI 10.1016/j.stress.2021.100048
- Kuzmanović L., Ruggeri R., Virili M.E., Rossini F., Ceoloni C. Effects of *Thinopyrum ponticum* chromosome segments transferred into durum wheat on yield components and related morpho-physiological traits in Mediterranean rain-fed conditions. *Field Crops Res.* 2016; 186:86-98. DOI 10.1016/j.fcr.2015.11.007
- Kuzmanović L., Rossini F., Ruggeri R., Pagnotta M.A., Ceoloni C. Engineered durum wheat germplasm with multiple alien introgressions: agronomic and quality performance agronomy. *Agronomy.* 2020;10(4):486. DOI 10.3390/agronomy10040486
- Lammer D., Cai X.W., Li H., Arterburn M., Chatelain J., Greco A., Lyon S., Gollnick M., Murrar T.D., Jones S.S. Utilization of *Thynopyrum* spp. in breeding winter wheat for disease resistance, stress tolerance, and perennial habit. In: Increasing Wheat Production in Central Asia through Science and International Cooperation. Proc. 1st Central Asian Wheat Conf. Almaty, Kazakhstan, 10–13 June, 2003. Almaty, 2005;147-151
- Lang T., La S., Li B., Yu Z., Chen Q., Li J., Yang E., Li G., Yang Z. Precise identification of wheat-*Thinopyrum intermedium* translocation chromosomes carrying resistance to wheat stripe rust in line Z4 and its derived progenies. *Genome.* 2018;61(3):177-185. DOI 10.1139/gen-2017-0229
- Li H., Wang X. *Thinopyrum ponticum* and *Th. intermedium*: the promising source of resistance to fungal and viral diseases of wheat. *J. Genet. Genomics.* 2009;36(9):557-565. DOI 10.1016/S1673-8527(08)60147-2
- Li H., Boshoff W.H.P., Pretorius Z.A., Zheng Q., Li B., Li Z. Establishment of wheat-*Thinopyrum ponticum* translocation lines with resistance to *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* Ug99. *J. Genet. Genom.* 2019;46(8):405-407. DOI 10.1016/j.jgg.2019.07.005
- Li M.Z., Wang Y.Z., Liu X.J., Li X.F., Wang H.G., Bao Y.G. Molecular cytogenetic identification of a novel wheat-*Th. ponticum* 1Js (1B) substitution line resistant to powdery mildew and leaf rust. *Front. Plant Sci.* 2021;12:727734. DOI 10.3389/fpls.2021.727734
- Li M.Z., Yuan Y.Y., Ni F., Li X.F., Wang H.G., Bao Y.G. Characterization of two wheat-*Thinopyrum ponticum* introgression lines with pyramiding resistance to powdery mildew. *Front. Plant Sci.* 2022; 13:943669. DOI 10.3389/fpls.2022.943669
- Li W., Zhang Q., Wang S., Langham M.A., Singh D., Bowden R.L., Xu S.S. Development and characterization of wheat-sea wheatgrass (*Thinopyrum junceiforme*) amphiploids for biotic stress resistance and abiotic stress tolerance. *Theor. Appl. Gen.* 2019;132(1):163-175. DOI 10.1007/s00122-018-3205-4
- Li X., Jiang X., Chen X., Song J., Ren C., Xiao Y., Gao X., Ru Z. Molecular cytogenetic identification of a novel wheat-*Agropyron elongatum* chromosome translocation line with powdery mildew resistance. *PLoS One.* 2017;12(9):e0184462. DOI 10.1371/journal.pone.0184462
- Li Z.S., Li B., Tong Y.P. The contribution of distant hybridization with decaploid *Agropyron elongatum* to wheat improvement in China. *J. Genet. Genomics.* 2008;35(8):451-456. DOI 10.1016/S1673-8527(08)60062-4
- Liu J., Chang Z., Zhang X., Yang Z., Li X., Jia J., Zhan H., Guo H., Wang J. Putative *Thinopyrum intermedium*-derived stripe rust resistance gene *Yr50* maps on wheat chromosome arm 4BL. *Theor. Appl. Genet.* 2013;126(1):265-274. DOI 10.1007/s00122-012-1979-3
- Liu L.Q., Luo Q.L., Li H.W., Li B., Li Z.S., Zheng Q. Physical mapping of the blue-grained gene from *Thinopyrum ponticum* chromosome 4Ag and development of blue-grain-related molecular markers and a FISH probe based on SLAF-seq technology. *Theor. Appl. Genet.* 2018;131(11):2359-2370. DOI 10.1007/s00122-018-3158-7
- Liu W., Jin Y., Rouse M., Friebe B., Gill B., Pumphrey M.O. Development and characterization of wheat-*Ae. searsii* Robertsonian translocations and a recombinant chromosome conferring resistance to stem rust. *Theor. Appl. Genet.* 2011a;122(8):1537-1545. DOI 10.1007/s00122-011-1553-4
- Liu W., Rouse M., Friebe B., Jin Y., Gill B., Pumphrey M.O. Discovery and molecular mapping of a new gene conferring resistance to stem rust, *Sr53*, derived from *Aegilops geniculata* and characterization of spontaneous translocation stocks with reduced alien chromatin. *Chromosome Res.* 2011b;19(5):669-682. DOI 10.1007/s10577-011-9226-3
- Liu W., Danilova T.V., Rouse M.N., Bowden R.L., Friebe B., Gill B.S., Pumphrey M.O. Development and characterization of a compensating wheat-*Thinopyrum intermedium* Robertsonian translocation with *Sr44* resistance to stem rust (Ug99). *Theor. Appl. Genet.* 2013;126(5):1167-1177. DOI 10.1007/s00122-013-2044-6
- Liu X., Ao K., Yao J., Zhang Y., Li X. Engineering plant disease resistance against biotrophic pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2021;60: 101987. DOI 10.1016/j.pbi.2020.101987
- Luo P., Hu X., Chang Z., Zhang M., Zhang H., Ren Z. A new stripe rust resistance gene transferred from *Thinopyrum intermedium* to hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). *Phytoprotection.* 2009a;90(2): 57-63. DOI 10.7202/044023ar
- 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.* 2009b;118(6):1059-1064. DOI 10.1007/s00122-009-0962-0
- Ma F.F., Xu Y.F., Ma Z.Q., Li L.H., An D.G. Genome-wide association and validation of key loci for yield-related traits in wheat founder parent Xiaoyan 6. *Mol. Breed.* 2018;38:91. DOI 10.1007/s11032-018-0837-7 158
- Martynov S.P., Dobrotvorskaya T.V., Krupnov V.A. Genealogical analysis of the use of two wheatgrass (*Agropyron*) species in common wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding for disease resistance. *Russ. J. Genet.* 2016;52(2):154-163. DOI 10.1134/S1022795416020071
- McDonald B.A., Stukenbrock E.H. Rapid emergence of pathogens in agro-ecosystems: global threats to agricultural sustainability and food security. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2016; 371(1709):20160026. DOI 10.1098/rstb.2016.0026
- McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F. (Eds.) Wheat Rusts. An Atlas of Resistance Genes. Springer Dordrecht, 1995. DOI 10.1071/9780643101463
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Xia X.C., Raupp W.J. Catalogue of gene symbols for wheat: 2018 Supplement. *Ann. Wheat Newsllett.* 2018;64:73-93
- Melotto M., Zhang L., Oblessuc P.R., He S.Y. Stomatal defense a decade later. *Plant Physiol.* 2017;174(2):561-571. DOI 10.1104/pp.16.01853
- Mo Q., Wang C.Y., Chen C.H., Wang Y.J., Zhang H., Liu X.L., Ji W.Q. Molecular cytogenetic identification of a wheat *Thinopyrum ponticum* substitution line with stripe rust resistance. *Cereal Res. Commun.* 2017;45(4):564-573. DOI 10.1556/0806.45.2017.037
- Niks R.E. How specific is non-hypersensitive host and nonhost resistance of barley to rust and mildew fungi? *J. Integr. Agric.* 2014; 13(2):244-254. DOI 10.1016/S2095-3119(13)60648-6
- Niu Z., Klindworth D.L., Yu G., Friessen T.L., Chao S., Jin Y., Cai X., Ohm J.-B., Rasmussen J.B., Xu S.S. Development and characterization of wheat lines carrying stem rust resistance gene *Sr43* derived from *Thinopyrum ponticum*. *Theor. Appl. Genet.* 2014;127(4):969-980. DOI 10.1007/s00122-014-2272-4
- O'Driscoll A., Kildea S., Doohan F., Spink J., Mullins E. The wheat-*Septoria* conflict: a new front opening up? *Trends Plant Sci.* 2014; 19(9):602-610. DOI 10.1016/j.tplants.2014.04.011



- Ohm H.W., Anderson J.M., Sharma H.C., Ayala L., Thompson N., Uphaus J.J. Registration of yellow dwarf viruses resistant wheat germplasm line P961341. *Crop Sci.* 2005;45(2):805-806. DOI 10.2135/cropsci2005.0805
- Oliver R.E., Xu S.S., Stack R.W., Friesen T.L., Jin Y., Cai X. Molecular cytogenetic characterization of four partial wheat-*Thinopyrum ponticum* amphiploids and their reactions to *Fusarium* head blight, tan spot, and *Stagonospora nodorum* blotch. *Theor. Appl. Genet.* 2006;112(8):1473-1479. DOI 10.1007/s00122-006-0250-1
- Park R.F., Bariana H.S., Wellings C.R., Wallwork H. Detection and occurrence of a new pathotype of *Puccinia triticina* with virulence for *Lr24* in Australia. *Aust. J. Agric. Res.* 2002;53(9):1069-1076. DOI 10.1071/AR02018
- Park R.F., Golegaonkar P.G., Derevnina L., Sandhu K.S., Karaoglu H., Elmansour H.M., Dracatos P.M., Singh D. Leaf rust of cultivated barley: pathology and control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2015;53:565-589. DOI 10.1146/annurev-phyto-080614-120324
- Pathotype Tracker – Where is Ug99? 2023. [Available at: [https://rusttracker.cimmyt.org/?page\\_id=22](https://rusttracker.cimmyt.org/?page_id=22)]
- Patpour M., Hovmöller M.S., Rodriguez-Algaba J., Randazzo B., Villegas D., Shamanin V.P., Berlin A., Flath K., Czembor P., Hanzalova A., Sliková S., Skolotneva E.S., Jin Y., Szabo L., Meyer K.J.G., Valade R., Thach T., Hansen J.G., Justesen A.F. Wheat stem rust back in Europe: diversity, prevalence and impact on host resistance. *Front. Plant Sci.* 2022;13:882440. DOI 10.3389/fpls.2022.882440
- Peng Y., Wersch R., Zhang Y. Convergent and divergent signaling in pamp-triggered immunity and effector-triggered immunity. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2018;31(4):403-409. DOI 10.1094/MPMI-06-17-0145-CR
- Peto F.H. Hybridization of *Triticum* and *Agropyron*. II. Cytology of the male parents and F<sub>1</sub> generation. *Can. J. Res.* 1936;14(5):203-214. DOI 10.1139/cjr36c-017
- Phuke R.M., He X., Juliana P., Bishnoi S.K., Singh G.P., Kabir M.R., Roy K.K., Joshi A.K., Singh R.P., Singh P.K. Association mapping of seedling resistance to tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis* Race 1) in CIMMYT and South Asian wheat germplasm. *Front. Plant Sci.* 2020;11:1309. DOI 10.3389/fpls.2020.01309
- Plotnikova L.Ya., Pozherukova V., Knaub V., Kashuba Y. What was the reason for the durable effect of *Sr31* against wheat stem rust? *Agriculture.* 2022;12(12):2116. DOI 10.3390/agriculture12122116
- Plotnikova L.Ya., Knaub V., Pozherukova V. Nonhost resistance of *Thinopyrum ponticum* to *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* and the effects of the *Sr24*, *Sr25*, and *Sr26* genes introgressed to wheat. *Int. J. Plant Biol.* 2023a;14(2):435-457. DOI 10.3390/ijpb14020034
- Plotnikova L.Ya., Sagendykova A., Pozherukova V. The use of genetic material of tall wheatgrass to protect common wheat from *Septoria* blotch in Western Siberia. *Agriculture.* 2023b;13(1):203. DOI 10.3390/agriculture13010203
- Plotnikova L.Ya., Sagendykova A.T., Kuzmina S.P. Drought resistance of introgressive spring common wheat lines with genetic material of tall wheatgrass. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding.* 2023c;184(2):38-50. DOI 10.30901/2227-8834-2023-2-38-50
- Pugliese J.Y., Culman S.W., Sprunger C.D. Harvesting forage of the perennial grain crop Kernza (*Thinopyrum intermedium*) increases root biomass and soil nitrogen cycling. *Plant Soil.* 2019;437(2):241-254. DOI 10.1007/s11104-019-03974-6
- Qi Z.J., Du P., Qian B.L., Zhuang L., Chen H., Chen T., Shen J., Guo J., Feng Y., Pei Z. Characterization of a wheat-*Thinopyrum bessarabicum* (T2JS-2BS-2BL) translocation line. *Theor. Appl. Genet.* 2010;121(3):589-597. DOI 10.1007/s00122-010-1332-7
- Salina E.A., Adonina I.G., Badaeva E.D., Kroupin P.Yu., 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 gene conferring resistance to fungal diseases. *Euphytica.* 2015;204:91-101. DOI 10.1007/s10681-014-1344-5
- Savari S., Willocquet L., Pethybridge S.J., Esker P., McRoberts N., Nelson A. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nat. Ecol. Evol.* 2019;3(3):430-439. DOI 10.1038/s41559-018-0793-y
- Sears E.R. The transfer of leaf rust resistance from *Aegilops umbellulata* to wheat. *Brookhaven Sympos. Biol.* 1956;9:1-21
- Sears E.R. Genetic control of chromosome pairing in wheat. *Annu. Rev. Genet.* 1976;10:31-51. DOI 10.1146/annurev.ge.10.120176.000335
- Sears E.R. Analysis of wheat-*Agropyron* recombinant chromosomes. In: Proceedings of the 8th Eucarpia Congress, Madrid, Spain, 23–25 May 1977. 1978;63-72
- Sepsi A., Molnar I., Szalay D., Molnar-Lang M. Characterization of a leaf rust resistant wheat-*Thinopyrum ponticum* partial amphiploid BE-1, using sequential multicolor GISH and FISH. *Theor. Appl. Genet.* 2008;116(6):825-834. DOI 10.1007/s00122-008-0716-4
- Shamanin V.P., Salina E., Wanyera R., Zelenskiy Y., Olivera P., Morgunov A. Genetic diversity of spring wheat from Kazakhstan and Russia for resistance to stem rust Ug99. *Euphytica.* 2016;212:287-296. DOI 10.1007/s10681-016-1769-0
- Shi Q., Guo X., Su H., Zhang Y., Hu Z., Zhang J., Han F. Autopolloid origin and rapid diploidization of the tetraploid *Thinopyrum elongatum* revealed by genome differentiation and chromosome pairing in meiosis. *Plant J.* 2023;113(3):536-545. DOI 10.1111/tpj.16066
- Singh D. Development and Characterization of Wheat-*Thinopyrum Junceaiforme* chromosome addition lines. Thesis. South Dakota State Univ., 2019 [<https://openprairie.sdstate.edu/etd/3368>]
- Singh R.P., Hodson D.P., Jin Y., Ldaaguh E.S., Ayliffe M.A., Bhavani S., Rouse M.N., Pretorius Z.A., Szabo L.J., Huerta-Espino J., Basnet B.R., Lan C., Hovmöller M.S. Emergence and spread of new races of wheat stem rust fungus: continued threat to food security and prospects of genetic control. *Phytopathology.* 2015;105(7):872-884. DOI 10.1094/PHYTO-01-15-0030-FI
- Singh R.P., Singh P.K., Rutkoski J., Hodson D.P., He X., Jørgensen L.N., Hovmöller M.S., Huerta-Espino J. Disease impact on wheat yield potential and prospects of genetic control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2016;54:303-322. DOI 10.1146/annurev-phyto-080615-095835
- Smith D.C. Intergeneric hybridization of *Triticum* and other grasses, principally *Agropyron*. *J. Hered.* 1943;34(7):219-224. DOI 10.1093/oxfordjournals.jhered.a105291
- Smith E.L., Schlehner A.M., Young H.C., Edwards L.H. Registration of Agent wheat. (Reg. No. 471). *Crop Sci.* 1968;8(4):511-512. DOI 10.2135/cropsci1968.0011183X000800040039x
- Sun S.C. The approach and methods of breeding new varieties and new species from *Agrotriticum* hybrids. *Acta Agron. Sin.* 1981;7(1):51-58
- Tadesse Y., Chala A., Kassa B. Yield loss due to *Septoria tritici blotch* (*Septoria tritici*) of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) in the central highlands of Ethiopia. *J. Biol. Agric. Healthc.* 2020;10(10):1-7. DOI 10.7176/JBAH/10-10-01
- Tsvelev N.N. Grasses of the Soviet Union (Russian translations series, 8). Abingdon, UK: Routledge, 1984
- Wang H.W., Sun S.L., Ge W.Y., Zhao L.F., Hou B.Q., Wang K., Lyu Z.F., Chen L.Y., Xu S.S., Guo J., ... Li A.F., Xu S.S., Bai G.H., Nevo E., Gao C.X., Ohm H., Kong L.R. Horizontal gene transfer of *Fhb7* from fungus underlies *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Science.* 2020;368(6493):eaba5435. DOI 10.1126/science.aba5435
- Wang L., Shi Q., Su H., Wang Y., Sha L., Fan X., Kang H., Zhang H., Zhou Y. St<sub>2</sub>-80: a new FISH marker for St genome and genome analysis in Triticeae. *Genome.* 2017;60(7):553-563. DOI 10.1139/gen-2016-0228
- Wang R.R.-C. *Agropyron* and *Psathyrostachys*. In: Kole C. (Ed.) Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011;77-108. DOI 10.1007/978-3-642-14228-4\_2
- Wang S., Wang C., Feng X., Zhao J., Deng P., Wang Y., Zhang H., Liu X., Li T., Chen C., Wang B., Ji W. Molecular cytogenetics and development of St-chromosome-specific molecular markers of novel stripe rust resistant wheat-*Thinopyrum intermedium* and wheat-

- Thinopyrum ponticum* substitution lines. *BMC Plant Biol.* 2022; 22(1):111. DOI 10.1186/s12870-022-03496-x
- Wang Y.Z., Cao Q., Zhang J.J., Wang S.W., Chen C.H., Wang C.Y., Zhang H., Wang Y., Ji W. Cytogenetic analysis and molecular marker development for a new wheat–*Thinopyrum ponticum* 1J<sup>s</sup> (1D) disomic substitution line with resistance to stripe rust and powdery mildew. *Front. Plant Sci.* 2020;11:1282. DOI 10.3389/fpls.2020.01282
- Wells D.G., Kota R.S., Sandhu H.S., Gardner W.A.S., Finney K.F. Registration of one disomic substitution line and five translocation lines of winter wheat germ plasm resistant to wheat streak mosaic virus. *Crop Sci.* 1982;22(6):1277-1278. DOI 10.2135/cropsci1982.0011183X002200060083x
- Wu X., Zang C., Zhang Y., Xu Y., Wang S., Li T., Gao L. Characterization of wheat monogenic lines with known *Sr* genes and wheat cultivars for resistance to three new races of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in China. *J. Integr. Agric.* 2023;22(6):1740-1749. DOI 10.1016/j.jia.2022.08.125
- Wulff B.B.H., Moscou M.J. Strategies for transferring resistance into wheat: from wide crosses to GM cassettes. *Front Plant Sci.* 2014;5:692. DOI 10.3389/fpls.2014.00692
- Xu S., Jiang B., Han H., Ji X., Zhang J., Zhou S., Yang X., Li X., Li L., Liu W. Genetic effects of *Agropyron cristatum* 2P chromosome translocation fragments in a wheat background. *J. Integr. Agr.* 2023; 22(1):52-62. DOI 10.1016/j.jia.2022.08.094
- Xu X., Yuan D., Li D., Gao Y., Wang Z., Liu Y., Wang S., Xuan Y., Zhao H., Li T., Wu Y. Identification of stem rust resistance genes in wheat cultivars in China using molecular markers. *PeerJ.* 2018;6:e4882. DOI 10.7717/peerj.4882
- Yang G., Boshoff W., Li H., Pretorius Z., Luo Q., Li B., Li Z., Zheng Q. Chromosomal composition analysis and molecular marker development for the novel Ug99-resistant wheat–*Thinopyrum ponticum* translocation line WTT34. *Theor. Appl. Genet.* 2021;134(5):1587-1599. DOI 10.1007/s00122-021-03796-0
- Yang G., Deng P., Ji W., Fu S., Li H., Li B., Li Z., Zheng Q. Physical mapping of a new powdery mildew resistance locus from *Thinopyrum ponticum* chromosome 4AgS. *Front. Plant Sci.* 2023;14:1131205. DOI 10.3389/fpls.2023.1131205
- Yang Z., Mu Y., Wang Y., He F., Shi L., Fang Z., Zhang J., Zhang Q., Geng G., Zhang S. Characterization of a novel TtLEA2 gene from *Tritipyrum* and its transformation in wheat to enhance salt tolerance. *Front. Plant Sci.* 2022;13:830848. DOI 10.3389/fpls.2022.830848
- Yin X., Shang X., Pang B., Song J., Cao S., Li J., Zhang X. Molecular mapping of two novel stripe rust resistant genes *YrTp1* and *YrTp2* in A-3 derived from *Triticum aestivum* × *Thinopyrum ponticum*. *Agric. Sci. China.* 2006;5(7):483-490. DOI 10.1016/S1671-2927(06)60081-3
- Zeng W., He S.Y. A prominent role of the flagellin receptor FLAGELLIN-SENSING2 in mediating stomatal response to *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2010;153(3):1188-1198. DOI 10.1104/pp.110.157016
- Zhan H.X., Li G.R., Zhang X.J., Li X., Guo H.J., Gong W.P., Jia J., Qiao L., Ren Y., Yang Z., Chang Z. Chromosomal location and comparative genomics analysis of powdery mildew resistance gene *Pm51* in a putative wheat–*Thinopyrum ponticum* introgression line. *PLoS One.* 2014;9:e113455. DOI 10.1371/journal.pone.0113455
- Zhan H., Zhang X., Li G., Pan Z., Hu J., Li X., Qiao L., Jia J., Guo H., Chang Z., Yang Z. Molecular characterization of a new wheat–*Thinopyrum intermedium* translocation line with resistance to powdery mildew and stripe rust. *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16(1):2162-2173. DOI 10.3390/ijms16012162
- Zhan J., McDonald B.A. Experimental measures of pathogen competition and relative fitness. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2013;51:131-153. DOI 10.1146/annurev-phyto-082712-102302
- Zhang J., Hewitt T.C., Boshoff W.H.P., Dundas I., Upadhyaya N., Li J., Patpour M., Chandramohan S., Pretorius Z.A., Hovmöller M., Schnippenkoetter W., Park R.F., Mago R., Periyannan S., Bhatt D., Hoxha S., Chakraborty S., Luo M., Dodds P., Steuernagel B., Wulff B.B.H., Ayliffe M., McIntosh R.A., Zhang P., Lagudah E.S. A recombined *Sr26* and *Sr61* disease resistance gene stack in wheat encodes unrelated NLR genes. *Nat. Commun.* 2021;12:3378. DOI 10.1038/s41467-021-23738-0
- Zhang R.Q., Xiong C.X., Mu H.Q., Yao R.N., Meng X.R., Kong L.N., Xing L., Wu J., Feng Y., Cao A. *Pm67*, a new powdery mildew resistance gene transferred from *Dasyphyrum villosum* chromosome IV to common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Crop J.* 2020;9(4):882-888. DOI 10.1016/j.cj.2020.09.012
- 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
- Zhang X., Dong Y., Wang R.R.C. Characterization of genomes and chromosomes in partial amphiploids of the hybrid *Triticum aestivum* × *Thinopyrum ponticum* by in situ hybridization, isozyme analysis, and RAPD. *Genome.* 1996;39(6):1062-1071. DOI 10.1139/g96-133
- Zhang X., Shen X., Hao Y., Cai J., Ohm H.W., Kong L. A genetic map of *Lophopyrum ponticum* chromosome 7E, harboring resistance genes to *Fusarium* head blight and leaf rust. *Theor. Appl. Genet.* 2011;122(2):263-270. DOI 10.1007/s00122-010-1441-3
- Zhang Z., Song L., Han H., Zhou S., Zhang J., Yang X., Li X., Liu W., Li L. Physical localization of a locus from *Agropyron cristatum* conferring resistance to stripe rust in common wheat. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(11):2403. DOI 10.3390/ijms18112403
- Zheng Q., Klindworth D.L., Friesen T.L., Liu A., Li Z., Zhong S., Jin Y., Xu S.S. Characterization of *Thinopyrum* species for wheat stem rust resistance and ploidy level. *Crop Sci.* 2014a;54(6):2663-2672. DOI 10.2135/CROPCSCI2014.02.0093
- Zheng Q., Lv Z., Niu Z., Li B., Li H., Xu S.S., Han F., Li Z. Molecular cytogenetic characterization and stem rust resistance of five wheat–*Thinopyrum ponticum* partial amphiploids. *J. Genet. Genomics.* 2014b;41(11):591-599. DOI 10.1016/j.jgg.2014.06.003
- Zheng X., Tang C., Han R., Zhao J., Qiao L., Zhang S., Qiao L., Ge C., Zheng J., Liu C. Identification, characterization, and evaluation of novel stripe rust resistant wheat–*Thinopyrum intermedium* chromosome translocation lines. *Plant Dis. Publ.* 2020;104(3):875-881. DOI 10.1094/PDIS-01-19-0001-RE
- Zhu Z., Hao Y., Mergoum M., Bai G., Humphreys G., Cloutier S., Xia X., He Z. Breeding wheat for resistance to *Fusarium* head blight in the global north: China, USA, and Canada. *Crop J.* 2019;7(6):730-738. DOI 10.1016/j.cj.2019.06.003

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

Поступила в редакцию 14.02.2024. После доработки 22.03.2024. Принята к публикации 26.03.2024.

DOI 10.18699/vjgb-24-61

## Распространенность и видовой состав вирусов картофеля в Новосибирской области

В.С. Масленникова<sup>1,2</sup>, М.Б. Пыхтина<sup>1</sup> ✉, К.А. Табанюхов<sup>1,2</sup>, Е.В. Шелихова<sup>1,2</sup>, К.И. Мосалев<sup>1</sup>, А.В. Катохин<sup>1</sup>,  
А.А. Бондарь<sup>3</sup>, А.Б. Беклемишев<sup>1</sup>, М.И. Воевода<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Федеральное исследовательское учреждение фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ pykhtina\_maria@mail.ru

**Аннотация.** Среди множества болезней, поражающих растения картофеля, именно вирусные инфекции являются наиболее распространенными и наносят значительный ущерб хозяйствам, влияя как на урожайность, так и на качество картофеля. В связи с этим важное условие сохранения семенного фонда картофеля в России – систематический мониторинг и раннее высокоспецифичное обнаружение вирусных инфекций картофеля. Целью работы было исследование образцов сортов картофеля, собранных на территории Новосибирской области (НСО), на наличие вирусных инфекций методом ОТ-ПЦР. Изучено 130 растений картофеля из четырех районов Новосибирской области. В результате мониторинга обнаружены следующие вирусы: PVY (potato virus Y), PVS (potato virus S), PVM (potato virus M) и PVX (potato virus X). Ни в одном из анализируемых образцов не найден карантинный объект – вириод веретеновидности клубней картофеля (potato spindle tuber viroid – PSTVd). Максимальная частота встречаемости в районах области была отмечена для трех вирусов – PVY, PVM и PVS. Смешанные вирусные инфекции составили заметную долю образцов: встречаемость комбинации инфекции PVY + PVM в растениях составляла 25.0 %, PVY + PVS – 22.6 %. Для отработки методов выяснения штаммовой принадлежности изучаемых образцов проведено секвенирование нуклеотидных последовательностей капсидных белков 10 изолятов Y-вируса. С просеквенированными последовательностями был осуществлен филогенетический анализ совместно с набором последовательностей референсных штаммов 261-4, Eu-N, N:O, NE-11, NTNa, NTNb, N-Wi, O, O5, SYR\_I, SYR\_II, SYR\_III, взятых в GenBank. В результате филогенетического анализа установлено, что образцы из НСО распределились в две группы штаммов: группа 1, включающая также изоляты референсных штаммов 261-4/SYR\_III, и группа 2 – NTNa. Полученные результаты штаммовой принадлежности образцов из НСО закладывают основу для разработки ДНК- и иммунодиагностических систем для выявления PVY, циркулирующих в НСО, а также для выяснения источника и путей проникновения конкретных штаммов вируса.

**Ключевые слова:** *Solanum tuberosum*; вирусные инфекции; ОТ-ПЦР; Y-вирус картофеля; филогенетический анализ.

**Для цитирования:** Масленникова В.С., Пыхтина М.Б., Табанюхов К.А., Шелихова Е.В., Мосалев К.И., Катохин А.В., Бондарь А.А., Беклемишев А.Б., Воевода М.И. Распространенность и видовой состав вирусов картофеля в Новосибирской области. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(5):554-562. DOI 10.18699/vjgb-24-61

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках темы НИР: № 1022072600029-5-1.6.2;1.6.8 и бюджетного проекта № 122032200236-1 с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ», поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

## Distribution and species composition of potato viruses in the Novosibirsk region

V.S. Maslennikova<sup>1,2</sup>, M.B. Pykhtina<sup>1</sup> ✉, K.A. Tabanyukhov<sup>1,2</sup>, E.V. Shelikhova<sup>1,2</sup>, K.I. Mosalev<sup>1</sup>, A.V. Katokhin<sup>1</sup>,  
A.A. Bondar<sup>3</sup>, A.B. Beklemishev<sup>1</sup>, M.I. Voevoda<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

✉ pykhtina\_maria@mail.ru

**Abstract.** Among the many diseases that affect potato plants, viral infections are the most common and cause significant damage to farms, affecting both the yield and quality of potatoes. In this regard, an important condition for preserving the potato seed fund in Russia is systematic monitoring and early highly specific detection of potato viral infections. The purpose of the work is to study samples of potato varieties collected in the Novosibirsk region for the presence of viral infections using RT-PCR. 130 potato plants from three districts of the Novosibirsk region (NR) were studied. As a result of monitoring, the following viruses were identified: PVY (potato virus Y), PVS (potato virus S), PVM (potato



virus M) and PVX (potato virus X). The quarantine pathogen potato spindle tuber viroid (PSTVd) was not detected in any of the samples analyzed. The maximum frequency of occurrence in the region was noted for three viruses: PVY, PVM and PVS. A significant proportion of the samples were mixed viral infections: the occurrence of the combination of infection PVY + PVM in plants was 25.0 %, and PVY + PVS, 22.6 %. To develop methods for determining the strain affiliation of the studied samples, the nucleotide sequences of the capsid protein genes of 10 Y-virus isolates were sequenced. Phylogenetic analysis of the studied sequences of NR isolates was carried out with a set of sequences of reference strains 261-4, Eu-N, N:O, NE-11, NTNa, NTNb, N-Wi, O, O5, SYR\_I, SYR\_II and SYR\_III retrieved from GenBank. As a result of phylogenetic analysis, it was established that NR viral samples fell into two groups of strains: group 1, which also includes isolates of the reference strains 261-4/SYR\_III, and group 2, NTNa. The obtained results of the strain affiliation of NR samples lay the basis for the development of DNA and immunodiagnostic systems for identifying PVY circulating in NR, as well as for elucidating the source and routes of entry of specific virus strains.

**Key words:** *Solanum tuberosum*; viral infections; RT-PCR; potato Y virus; phylogenetic analysis.

**For citation:** Maslennikova V.S., Pykhtina M.B., Tabanyukhov K.A., Shelikhova E.V., Mosalev K.I., Katokhin A.V., Bondar A.A., Beklemishev A.B., Voevoda M.I. Distribution and species composition of potato viruses in the Novosibirsk region. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii*=*Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(5):554-562. DOI 10.18699/vjgb-24-61

## Введение

Новосибирская область – благоприятный регион для возделывания картофеля (Батов, Гуреева, 2023). Площади его выращивания в промышленном секторе картофелеводства (данные по сельхозорганизациям и крестьянско-фермерским хозяйствам, без учета хозяйств населения) Новосибирской области в 2023 г. составляли 3.8 тыс. га, что на 6.2 % (на 0.2 тыс. га) больше, чем в 2022 г. При этом валовые сборы картофеля в промышленном секторе картофелеводства Новосибирской области составили 74.9 тыс. т, что на 12.9 % (на 8.5 тыс. т) больше, чем в 2022 г. В состав 10 первых районов по размеру убранной площади картофеля в Новосибирской области в 2023 г. вошли: Новосибирский (36.8 % от общей площади), Ордынский (25.6 %), Мошковский (18.6 %), Карасукский (5.2 %), Тогучинский (4.4 %), Черепановский (3.3 %), Сузунский (1.8 %), Искитимский (1.7 %), Коченёвский (1.3 %), Баганский (0.4 %). На долю остальных районов суммарно было 1.0 % (<https://ab-centre.ru/news/typok-kartofelya-novosibirskoy-oblasti---klyuchevye-tendencii>).

По данным федеральной службы государственной статистики, средняя урожайность картофеля в России составляет около 16 т/га ([https://rosstat.gov.ru/enterprise\\_есопому](https://rosstat.gov.ru/enterprise_есопому)), в Новосибирской области – 22.5 т/га (Батов, Гуреева, 2023), в то время как максимальная продуктивность этой культуры на отдельных сортах может достигать 400 т/га (Государственный реестр селекционных достижений..., <https://gossortrf.ru/>). Снижение урожайности во многом обусловлено влиянием различных внешних факторов, в том числе и распространённостью большого количества вирусных патогенов.

В настоящее время 40 фитопатогенных вирусов картофеля идентифицировано в различных странах и регионах (Nameed et al., 2014; Onditi et al., 2021). Наиболее важными из них, получившими повсеместное распространение везде, где возделывается картофель, являются вирус скручивания листьев картофеля (БСЛК, potato leaf roll virus – PLRV), Y-вирус картофеля (YBK, potato virus Y – PVY), X-вирус картофеля (ХВК, potato virus X – PVX), S-вирус картофеля (SBK, potato virus S – PVS), M-вирус картофеля (МВК, potato virus M – PVM). Каждый из этих патогенов способен привести к потере от 10 до 60 % урожая, а при

смешанной вирусной инфекции потери могут быть еще выше (Byarugaba et al., 2020).

Вирус PVY занимает пятое место в десятке самых важных вирусов растений в мире (Scholthof et al., 2011) и приносит наибольший экономический ущерб при выращивании картофеля. Кроме того, этот вирус приводит к поражению других распространенных сельскохозяйственных культур, таких как томаты, перец, табак (Kerlan, Moury, 2008; Lacomme et al., 2017). Геном PVY обладает высокой степенью генетической изменчивости, а также подвержен рекомбинации. Вирус PVY существует в виде комплекса штаммов, которые можно определить на основе реакций гиперчувствительности к трем известным N-генам картофеля (Jones, 1990; Chikh-Ali et al., 2014) или на основе последовательностей генома и паттернов рекомбинации (Karasev, Gray, 2013; Green et al., 2017). В настоящее время идентифицировано 14 штаммов PVY (Karasev, Gray, 2013; Green et al., 2017), в том числе пять нерекомбинантных (PVYO, PVYEu-N, PVYNA-N, PVYC и PVYO-O5) и девять рекомбинантных штаммов (PVY-N:O, PVY-N-Wi, PVY-NTNa, PVY-NTNb, PVY-NE11, PVY-E, PVY-SYR-I, -II и -III) (Chikh-Ali et al., 2016a, b; Green et al., 2017). Также сообщается о 14 дополнительных рекомбинантах и вариантах генома (Green et al., 2018).

Поскольку заболевания, вызываемые вирусами картофеля, в полевых условиях неизлечимы, раннее обнаружение данных возбудителей и определение их видового состава – актуальная задача сельского хозяйства, входит в подпрограмму «Развитие селекции и семеноводства картофеля в Российской Федерации» федеральной научно-технической программы развития сельского хозяйства на 2017–2025 гг.

В настоящее время существует три основных метода диагностики вируса в клубнях картофеля: ОТ-ПЦР в реальном времени, иммуоферментный и иммунохроматографический анализы.

Ранее в некоторых регионах Российской Федерации были проведены исследования вирусной нагрузки на агроценозы картофеля. В 2016 г. в Астраханской области на всех посадках раннего репродукционного картофеля, за исключением сорта Крона, была зафиксирована высокая пораженность Y-вирусом, особенно на сортах Импала

(65–95 %), Ред Скарлетт (85 %) и Кураж (60 %). В 2017 г. на сорте Импала при сохранении высокой пораженности PVY (60 % растений) наблюдалось значительное поражение этого сорта (50 % растений) PVS и PVM (Фоминихи и др., 2017). Частота встречаемости PVS и PVM по Республике Башкортостан составила 87 и 78 %, PVX – 12 %, PVY – 28 %; до 61.6 % клубней были инфицированы двумя вирусами (PVS+PVY, PVS+PVX и PVM+PVY) и 2.8 % образцов – сочетанием трех вирусов. Только 6.9 % изученных образцов не содержали вирусов (Хайруллин и др., 2021).

С учетом высокой зараженности вирусными инфекциями растений картофеля по различным областям России крайне важна ранняя и точная диагностика вирусных инфекций с исследованием генетического полиморфизма отдельных штаммов наиболее встречаемых видов вирусов. После внедрения методов ПЦР-диагностики стали поступать многочисленные данные о генетическом разнообразии штаммов PVY и появилась возможность проводить более детальные исследования, направленные на выяснение источников и путей распространения вирусов картофеля. Например, по результатам мониторинга с помощью метода ОТ-ПЦР встречаемости вирусов в образцах четырех сортов картофеля (Ред Скарлетт, Сильвана, Лабелла, Невский) было обнаружено, что 100 % растений заражены X-вирусом и 26.3 % – Y-вирусом (Григорян, Ткаченко, 2019), а зараженность картофеля Y-вирусом в Пермском крае в 2019 г. составила 100 % (Печенкина, Боронникова, 2020).

В исследованиях А.М. Малько с коллегами (2017) показана высокая встречаемость PVY в Самарской, Тверской и Ленинградской областях (33.3, 29.2 и 25.7 % соответственно), PVS – в Самарской и Иркутской областях (66.7 и 30.5 % соответственно), PVM – в Тверской, Самарской и Нижегородской областях (25.0, 22.2 и 19.4 % соответственно). Диагностика вирусных заболеваний картофеля методом ПЦР в реальном времени, проведенная в 2019 г. в Саратовской области, обнаружила PVY у двух сортов картофеля при отсутствии визуальных поражений растений.

Федеральным исследовательским центром картофеля им. А.Г. Лорха с 2015 г. проводится изучение серологи-

ческих и фитопатологических характеристик изолятов PVY из различных регионов Российской Федерации, в том числе Новосибирской области. Из семи идентифицированных изолятов с моноинфекцией PVY в материале из Новосибирской области пять изолятов проявляли серологические и фитопатологические свойства PVY<sup>O/C</sup> (обыкновенный штамм и штамм акропетального некроза) (Uskov et al., 2022).

Целью настоящей работы стало изучение с помощью молекулярно-генетических методов видового состава вирусов картофеля разных сортов и категорий и пораженности ими растений в хозяйствах Новосибирской области для определения распространенности их в семенных клубнях, а также исследование штаммового состава отдельных изолятов PVY.

### Материалы и методы

Работа была выполнена в 2023 г. Исследования проводились на 130 растениях картофеля *Solanum tuberosum* из Искитимского (сорта Гала (PC1), Ред Скарлетт (Э), Розара (PC1)), Ордынского (сорта Гала (PC1), Леди Клэр (PC1), Розара (PC1)), Коченёвского (сорта Златка (СЭ), Розара (PC1)) и Новосибирского (сорта Гала (PC1), Ред Скарлетт (PC1)) районов Новосибирской области (табл. 1).

Образцы поставляли хозяйства из указанных областей по договору с ФГБУ «Россельхозцентр» по Новосибирской области, они были отобраны в соответствии с ГОСТ 33996-2016. Анализировали 10 образцов. В образцах Искитимского района насчитывалось по 20 клубней, в образцах Ордынского, Коченёвского и Новосибирского районов – по 10 клубней. Клубни картофеля каждого сорта культивировали в пластиковых горшках (объемом 0.7 л) в боксах при температуре +24 °C ± 1 °C, фотопериоде 16/8 ч: свет/темнота. Пробы листьев для определения вирусной нагрузки отбирали на четвертую неделю после посадки с верхнего, среднего и нижнего ярусов растений. Среди исследованных сортов четыре, Розара, Леди Клэр, Гала, Ред Скарлетт, являются сортами зарубежной селекции, а один сорт (Златка) – отечественной селекции. Выделение вирусной РНК из собранных листьев картофеля проводили с использованием набора «ФитоСорб» производ-

**Таблица 1.** Анализируемый материал картофеля по районам Новосибирской области

Район	Сорт, срок созревания	Количество проанализированных клубней, шт.	Репродукция
Искитимский	Гала, среднеранний	20	PC1
	Ред Скарлетт, раннеспелый	20	Э
	Розара, раннеспелый	20	PC1
Новосибирский	Гала, среднеранний	10	PC1
	Ред Скарлетт, раннеспелый	10	PC1
Коченёвский	Златка, среднеспелый	10	СЭ
	Розара, раннеспелый	10	PC1
Ордынский	Гала, среднеранний	10	PC1
	Леди Клэр, раннеспелый	10	PC1
	Розара, раннеспелый	10	PC1

ства компании «СИНТОЛ» (Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Анализ РНК выполняли на амплификаторе Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия). Наличие вирусов в образцах листьев картофеля определяли с использованием набора реагентов (НПК «СИНТОЛ») PV-005: PVX, PVY, PVM, PLRV, PVA, PVS и PSTVd.

**Подготовка образцов к секвенированию ДНК.** Отдельные Y-позитивные изоляты (10 шт.) были отобраны для получения кДНК с целью последующего секвенирования области гена капсидного белка. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора реактивов ОТ M-MuLV-RH («Биолабмикс», Россия), согласно протоколу производителя: на реакцию брали 2–5 мкг суммарной РНК и вносили праймеры (473-F: 5'-CAAATGACACAATCGATGCA-3'; 474-R: 5'-CATGTTCTTGACTCCAAGTAGAGTATG-3'), предназначенные для синтеза первой и затем второй цепи кДНК на участке геномной РНК PVY, кодирующем капсидный белок вируса. Подбор праймеров выполняли на основе сравнения нуклеотидных последовательностей гена белка оболочки известных изолятов Y-вируса, представленных в GenBank.

Синтезированные ДНК использовали далее для амплификации методом ПЦР кодирующей области гена капсидного белка PVY исследуемых изолятов вируса. ПЦР осуществляли в реакционной смеси, содержащей названные выше праймеры 473-F и 474-R. Смесь нагревали в течение 5 мин при 70 °С и переносили в ледяную баню на 2 мин, затем вносили смесь остальных реагентов (РНК-зависимую ДНК-полимеразу, ОТ-буфер, дезоксинуклеотидтрифосфаты) инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре; затем переносили в термостат на 42 °С на 2 ч; по окончании реакцию останавливали прогреванием в течение 15 мин при 70 °С. Количественную ПЦР с детекцией в реальном времени проводили с использованием «БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue(2x)» компании «Биолабмикс». ПЦР выполняли в амплификаторе CFX96 Touch (2014, Bio-Rad Laboratories, США) в соответствии со следующей программой амплификации: денатурация ДНК при 95 °С – 1 мин, с последующими 40 циклами ПЦР (денатурация ДНК 95 °С – 20 с, отжиг праймеров при 55 °С – 15 с, элонгация цепи ДНК при 72 °С – 30 с). Продукты амплификации разделяли гель-электрофорезом в 0.8 % агарозном геле, содержащем 0.00005 % EtBr.

**Секвенирование ампликонов гена капсидного белка изолятов PVY.** Ампликоны размером ~800 н. п., кодирующие капсидный белок Y-вируса картофеля (PVY), очищали от компонентов ПЦР реакционной смеси сорбцией на магнитных частицах SpeedBead (GE Healthcare, США) в присутствии 7 % PEG-8000. После трехразовой промывки 80 % этанолом ампликоны элюировали MilliQ водой. Для реакции секвенирования по Сэнгеру использовали 0.5 пкмоль ампликона, 20 пкмоль одного из праймеров (473\_F\_coat-Y-vir или 474\_R\_coat-Y-vir), 2 мкл реагента BigDye v.3.1, 8 мкл 5X буфера для секвенирования (Ntagen, США), 8 мкл 5M бетаина и MilliQ воду до суммарного объема реакции в 40 мкл. Температурный профиль реакции Сэнгера состоял из: денатурации при 96 °С в течение 3 мин, а затем 70 циклов (плавления при 96 °С в течение 25 с; отжига при 40 °С в течение 10 с; элонгации

при 60 °С в течение 3 мин) с завершающим прогревом при 98 °С – 5 мин и хранением до очистки при 4 °С. Затем реакции Сэнгера очищали от непрореагировавшего BigDye с помощью гель-фильтрации в микролонках планшетного формата через полусухой столбик Sephadex G-50 (GE Healthcare, США) центрифугированием при 1700 g в течение 4 мин. Продукты реакции Сэнгера анализировали на автоматическом геномном анализаторе ABI 3500XL (Applied Biosystems, США) в ЦКП «Геномика» (ИХБФМ СО РАН). Нуклеотидные последовательности исследуемых ампликонов использовали для анализа с помощью выравнивания и сравнения с базой данных GenBank (NCBI, США).

**Сравнение нуклеотидных последовательностей генов капсидного белка изолятов PVY.** Для филогенетического анализа нуклеотидные последовательности гена капсидного белка изолятов PVY из Новосибирской области сравнивали с помощью сервиса MAFFT (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>) с соответствующими референсными последовательностями, представленными в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Анализ проводили в программе MEGAX (Kumar et al., 2018) с помощью алгоритма максимального правдоподобия (ML). Для филограммы на основе нуклеотидных последовательностей с применением всех позиций кодонов задействовали эволюционные модели замен, указанные модулем MEGAX>Models: TN92(G+I) (Tamura–Nei). Для филограммы на основе аминокислотных последовательностей – JTT(G+I) (Jones–Taylor–Thorton). В качестве референсных последовательностей использованы следующие: для кластера штаммов 261-4: KY848023, AM113988, JF927755; Eu-N: KY847988, KY847986, JQ969036; N:O: KY847974, KY848018, AY884985, Z70238, AJ584851; NE-11: JQ971975, HQ912867; NTN: AJ890344, M95491\_i, AJ890345, AY884982; NTNb: AJ890343; N-Wi: KY847961, AJ890350, JQ924286, JN034046, AJ890349, KY847996; O: HQ912865, FJ643479, EF026074, AJ585196, JX424837; O5: FJ643477, U09509, HM367076, HQ912909, KY848035; SYR\_I: GQ200836; SYR\_II: AJ889867; SYR\_III: AB461454. Для определения устойчивости дендрограмм применяли метод бутстрепа (500 итераций).

**Статистика.** Встречаемость вирусов была оценена по критерию  $\chi^2$  с поправкой Йейтса.

## Результаты

Максимальная частота встречаемости в районах Новосибирской области была отмечена для трех вирусов – PVY, PVM и PVS (табл. 2). Вирус PVY встречался во всех исследуемых районах и поражал все сорта картофеля, в отличие от M- и S-вирусов. Распределение вирусов по районам Новосибирской области было неравномерным (табл. 3).

Наиболее высокий уровень инфицирования PVY был установлен в Новосибирском районе, где его распространенность на сорте Гала достигала 100 %. На том же сорте был обнаружен вирус скручивания листьев картофеля (20 %). Вирус PVS встречался во всех районах области, однако наибольшее распространение (30–100 %) выявлено в Ордынском и Коченёвском районах. Вирус X картофеля встречался в Искитимском и Ордынских районах (40–50 %). Следует также отметить, что в связи с широ-



**Таблица 2.** Распространенность вирусов картофеля по районам области, %

Сорт	PVX	PVY	PVM	PLRV	PVA	PVS	PSTVd
Искитимский район							
Гала	50	30	75	–	–	55	–
Ред Скарлетт	–	90	80	–	–	–	–
Розара	–	70	–	–	–	90	–
Коченёвский район							
Златка	–	60	100	–	–	100	–
Розара	–	50	–	–	–	–	–
Новосибирский район							
Ред Скарлетт	–	60	–	–	–	30	–
Гала	–	100	100	20	–	80	–
Ордынский район							
Розара	40	60	40	–	20	100	–
Гала	–	20	–	–	–	20	–
Леди Клэр	–	60	–	–	–	–	–

**Таблица 3.** Случаи заражения вирусами картофеля в разных районах Новосибирской области

Район	Сорт	Всего растений, шт.	Зараженные растения, шт.							$\chi^2$	p
			PVX	PVY	PSTVd	PVM	PLRV	PVS	PVA		
Искитимский	Ред Скарлетт	20	0	18	0	16	0	0	0	112.067	$7.52 \cdot 10^{-22}$
	Гала	20	10	6	0	15	0	11	0		
	Розара	20	0	14	0	0	0	18	0		
	Сумма по сортам		10	38	0	31	0	29	0		
Новосибирский	Ред Скарлетт	10	0	6	0	0	0	3	0	53.2	$1.07 \cdot 10^{-9}$
	Гала	10	0	10	0	10	2	8	0		
	Сумма по сортам		0	16	0	10	2	11	0		
Коченёвский	Розара	10	0	5	0	0	0	0	0	37.94	$1.16 \cdot 10^{-6}$
	Златка	10	0	6	0	10	0	10	0		
	Сумма по сортам		0	11	0	10	0	10	0		
Ордынский	Розара	10	4	6	0	4	0	10	2	38.2	$1.03 \cdot 10^{-6}$
	Гала	10	0	2	0	0	0	2	0		
	Леди Клэр	10	0	6	0	0	0	0	0		
	Сумма по сортам		4	14	0	4	0	12	2		

Примечание. Гипотеза о преобладании определенных вирусов картофеля в районах области проверена по критерию  $\chi^2$  с поправкой Йейтса. Значения p определены как  $p = 0.000$ .

ким возделыванием в нашей области сортов зарубежной селекции высокую распространенность получил вирус M (40–100 %). Среднеранние сорта (Гала, Златка) чаще, чем раннеспелые, были поражены PVM. Наибольшая вирусная нагрузка (PVX, PVY, PVM, PVA, PVS) была отмечена на сорте Розара Ордынского района. Вириод веретеновидности клубней картофеля (карантинный объект) отсутствовал у всех протестируемых образцов.

Смешанные вирусные инфекции составили заметную долю образцов: встречаемость комбинации инфекции в растениях: PVY+PVM – 25.0 %, PVY+PVS – 22.6 %,

PVY+PVX – 3.8 % (табл. 4). При этом распространенность «моноинфекции» какого-либо вируса (PVS, PVM, PVX, PVY) составила 19.4 %, а количество растений, в которых отсутствовали вирусы, – менее 1 %. У 15.37 % образцов были выявлены три вируса в сочетании PVS+PVM+PVY, а у 1.8 % – четыре вируса (PVS+PVM+PVX+PVY).

Для выяснения штаммовой принадлежности изучаемых образцов из НСО амплифицированные фрагменты генома PVY, соответствующие зрелому пептиду капсидного белка, были просеквенированы и проанализированы филогенетическими методами с привлечением ре-

**Таблица 4.** Частота встречаемости вирусов картофеля

Сочетания вирусов	Частота встречаемости, %
Без заражения	0.88
Монозаражение:	
PVS	6.85
PVM	1.25
PVY	11.25
PVX	0
Два вируса:	
PVS+PVM	6.25
PVS+PVY	22.60
PVM+PVY	25.00
PVS+PVX	3.75
PVX+PVY	3.75
Три вируса:	
PVS+PVM+PVY	15.37
PVS+PVY+PVA	1.25
Четыре вируса:	
PVS+PVM+PVX+PVY	1.80

ференсных последовательностей из GenBank, подробно охарактеризованных в статьях (Green et al., 2017, 2018). Регистрационные номера референсных последовательностей приведены в разделе «Материалы и методы». Полученные в программе MEGAX дендрограммы на основе нуклеотидных и аминокислотных последовательностей позволили визуализировать распределение использованных референсных штаммов.

Самую компактную группу образовали штаммы кластера O5, представляющие образцы из Северной Америки с одноименным серотипом O5. Этот кластер был использован как условная «внешняя группа» при построении дендрограмм для определения примерного направления эволюции генетического разнообразия PVY. Другие штаммовые кластеры сгруппировались не столь четко. Это можно объяснить тем, что при построении монокусных дендрограмм (как в нашем случае) нет возможности отразить последствия рекомбинационных событий, которые, как известно, постоянно происходят в процессе адаптации вирусов для обеспечения преодоления защитных механизмов пораженных растений-хозяев и распространения на новые растения.

Как видно из рисунка, образцы из НСО распределились по двум группам штаммов: группа 1, включающая образцы NSO01-05 и NSO08-09, объединяется со штаммами кластеров 261-4 и SYR\_III, а группа 2, включающая образцы NSO06-07 и NSO10, объединяется со штаммами кластера NTNa.

Сравнение топологий нуклеотидной и аминокислотной дендрограмм также дает ожидаемый вывод о том, что значительная часть нуклеотидного разнообразия вирусных последовательностей не проявляется на уровне кодируемых пептидов. Видно, что образцы НСО первой

группы на аминокислотном уровне идентичны друг другу и, вероятно, будут иметь одинаковые иммунохимические свойства в случае использования эпитопов зрелого капсидного белка в качестве серологического теста. То же можно сказать и об образцах второй группы. При этом можно ожидать, что при наличии общих эпитопов часть их все-таки будут настолько различаться между представителями двух исследуемых групп, что можно будет разработать дифференциальные серологические тесты.

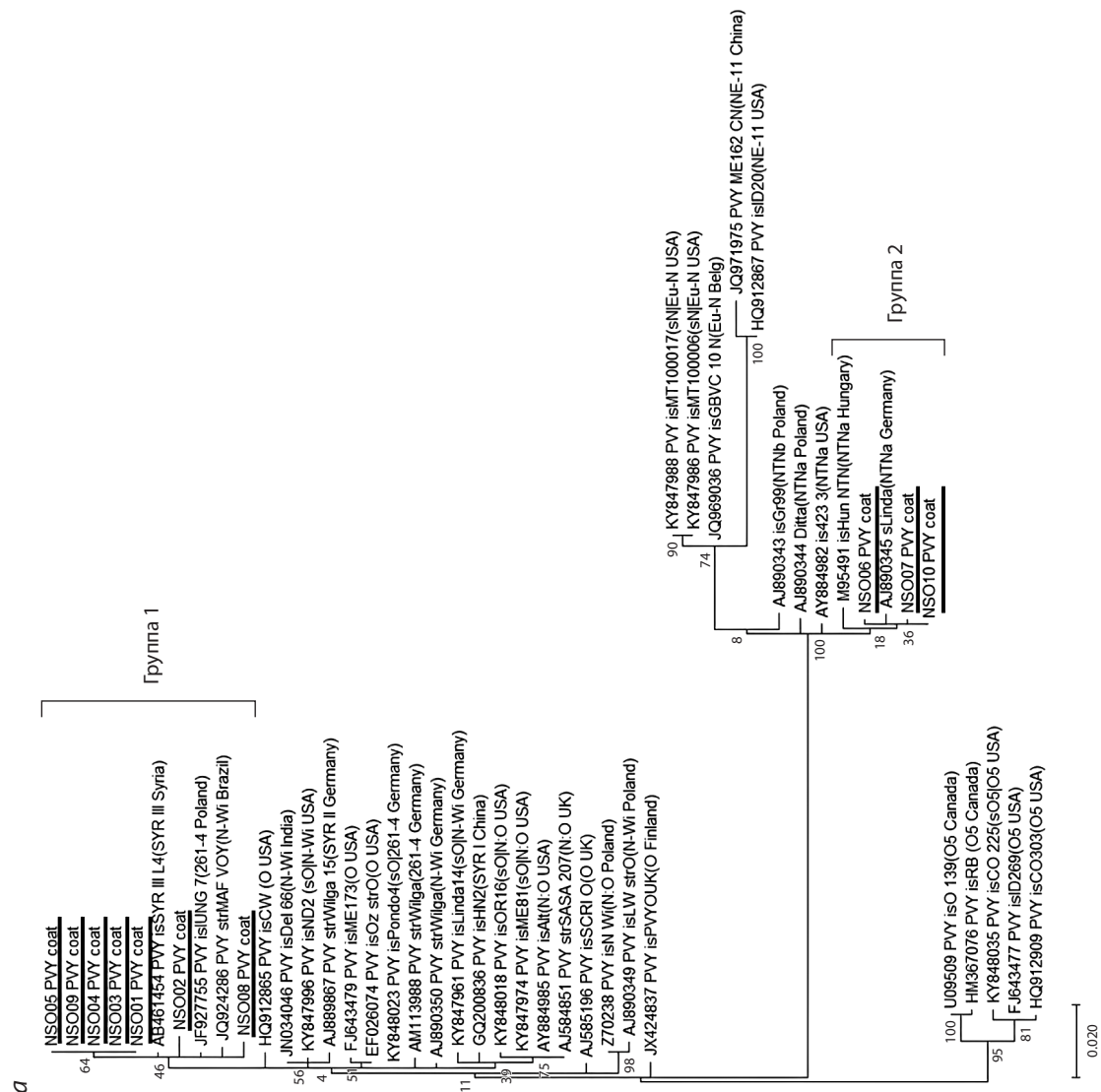
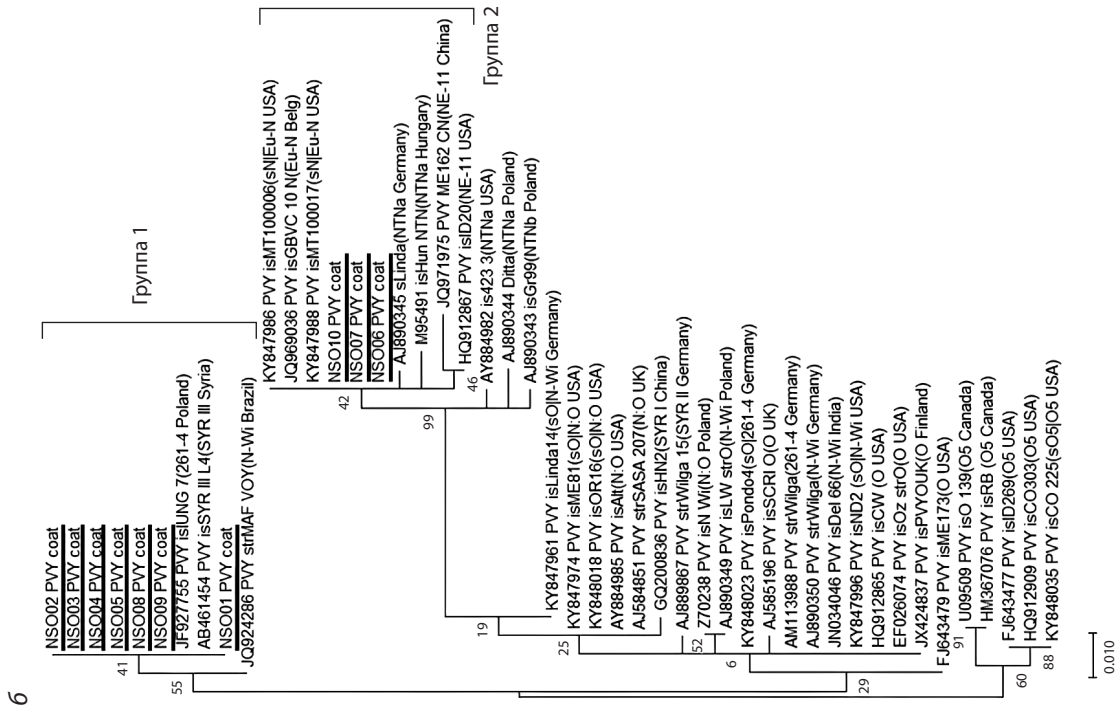
### Обсуждение

Вирусные инфекции картофеля приводят к значительному снижению его урожайности, в связи с чем мониторинг зараженности семенного материала – необходимая мера для стабильного и устойчивого производства этой культуры.

В настоящей работе методом ОТ-ПЦР проведен мониторинг вирусных инфекций семенного картофеля по Новосибирской области, который выявил высокую вирусную нагрузку. Среди проанализированных образцов не обнаружено различий в распространении вирусов, связанных с сортовой устойчивостью и/или репродукцией. По результатам анализа распространенности вирусных инфекций было установлено, что чаще всего растения инфицированы вирусами PVY, PVS и PVM, которые встречаются практически повсеместно в исследуемых районах области с частотой 30–100 %. В отличие от большинства других вирусов картофеля, PVY расширяет свое географическое распространение и наносит экономический ущерб посадкам картофеля не только в России, но во всем мире (Buyrugaba et al., 2020; Kreuze et al., 2020). Смешанная вирусная инфекция, включающая PVY, встречается чаще всего (Kerlan, Moury, 2008), поскольку большинство сортов картофеля к нему не устойчиво (Ahmadvand et al., 2012).

Характерным для растений картофеля, возделываемого в Новосибирской области, является поражение двумя вирусами (61.35 % образцов), из которых чаще всего (25.0 %) встречались вирусы PVM+PVY. Наличие трех или четырех вирусов одновременно отмечено у 16.62 и 1.8 % образцов. Растения, пораженные вирусами, были низкорослые, листовые пластинки – недоразвиты. Наблюдалось быстрое и преждевременное разрастание пазушных почек. Отмечалась морщинистость и складчатость листьев, их глубокое жилкование, хлороз, краевой некроз. Этот результат подтверждает результаты других ученых (Хайруллин и др., 2021), в которых показано, что картофель может быть одновременно заражен более чем четырьмя вирусами, включая наиболее экономически важные вирусы. Широкому распространению вирусов на картофеле способствуют большая засоренность полей многолетними сорняками-резервуарами вирусной инфекции (Szabó et al., 2020), огромное видовое разнообразие и высокая численность переносчиков (Danci et al., 2009; Fox et al., 2017).

Поскольку вирусные заболевания картофеля неизлечимы, важное значение имеют профилактические мероприятия, направленные на использование устойчивых к вирусным инфекциям сортов и неинфицированного семенного материала. Эти профилактические меры требуют систематического раннего выявления вирусных инфек-



Филогенетический анализ изолятов PVY из НСО совместно с образцами, представленными в GenBank. Обозначения кластеров штаммов и страна выявления образца указаны в скобках. Для некоторых образцов указаны серологические классы, например «sO»; перед вертикальной чертой. Образцы из НСО подчёркнуты. а – ML-дендрограмма на основе нуклеотидных последовательностей; б – ML-дендрограмма на основе аминокислотных последовательностей.



ций, отсутствие которого привело к массовому заражению фитопатогенами картофеля в России, в том числе и посевного материала. Поэтому создание высокочувствительной, ранней и пригодной в полевых условиях диагностики вирусных инфекций картофеля – актуальная задача.

Вирус PVY считается одним из наиболее значимых вирусов, поражающих как картофель, так и другие экономически важные виды пасленовых (перец, томат, табак). Поскольку этим видом вируса, по результатам наших исследований, было инфицировано наибольшее количество образцов, представляло интерес определить нуклеотидные последовательности гена капсидного белка исследуемых изолятов PVY из НСО с целью выяснения уровня консервативности этих белков для последующего создания на их основе высокоспецифичной для сибирского региона иммунохроматографической тест-системы. Филогенетический анализ полученных образцов позволил выделить среди них две группы штаммов PVY: группу, включающую штаммы 261-4/SYR\_III, и группу с NTNa. Вирус PVY получает все большее распространение по всему миру, преимущественно по причине роста заболеваемости рекомбинантными формами вируса, такими как PVYNWi и PVYNTN. Эти штаммы обладают высокой вирулентностью и малой выраженностью симптоматики, что затрудняет их выявление в семенном картофеле.

Наши результаты согласуются с данными других ученых, исследовавших штаммы изолятов Y-вируса на территории РФ. А.И. Усков с коллегами (2016) при исследовании штаммового состава Y-вируса картофеля, распространенного на территории РФ в 2015–2016 гг., на одном сортообразце идентифицировали ординарный штамм PVYO, в 19 – штамм кольцевого некроза клубней PVYNTN, в 36 – рекомбинантный штамм PVYN:O и в 53 сортообразцах – одновременно два штамма, PVYNTN и PVYN:O. А.А. Стахеев с коллегами (2023) на основании сравнительного анализа маркерной последовательности локуса 5'-нетранслируемой области NTR определили, что изоляты Y-вируса картофеля, распространенные на различных территориях РФ, относились преимущественно к некротической и рекомбинантной группам штаммов, за исключением отдельного изолята, занимающего промежуточное положение между этими двумя группами.

Определение штаммовой принадлежности PVY имеет не только важное значение в плане совершенствования стратегий борьбы с данным вирусом, но также и большое диагностическое значение. Из сравнения топологий нуклеотидной и аминокислотной дендрограмм следует вывод, что обе выявленные нами группы образцов из НСО не показывают внутригрупповых различий на аминокислотном уровне, что может означать серологическое сходство образцов в группе и перспективность разработки дифференциальной серологической диагностики для образцов из разных групп.

## Заключение

Таким образом, при разработке ДНК- и иммунодиагностических систем для выявления PVY, циркулирующих в НСО, можно использовать в первую очередь генетические вариации вируса этих штаммовых кластеров.

Полученные результаты штаммовой принадлежности образцов из НСО закладывают основу для выяснения источника и путей проникновения конкретных штаммов вируса, а также для оценки фитопатогенетических рисков для используемых в НСО сортов картофеля.

## Список литературы / References

- Батов А.С., Гуреева Ю.А. Сравнительное изучение отечественных среднеранних сортов картофеля в условиях лесостепи Новосибирского Приобья. *Изв. Оренбург. гос. аграр. ун-та*. 2023;1(99): 34-39. DOI 10.37670/2073-0853-2023-99-1-34-39  
[Batov A.S., Gureeva Yu.A. Comparative study of domestic mid-early potato varieties in the forest-steppe conditions of the Novosibirsk Ob region. *Izvestia Orenburgskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Izvestia Orenburg State Agrarian University*. 2023;1(99):34-39. DOI 10.37670/2073-0853-2023-99-1-34-39 (in Russian)]
- Государственный реестр селекционных достижений допущенных к использованию. Том 1. Сорта растений [Электронный ресурс], URL: <https://gossortrf.ru/> (Дата обращения: 15.10.2023)  
[State Register of Selection Achievements Authorized for Use for Production Purposes. Vol. 1. Plant Varieties [Web resource], URL: <https://gossortrf.ru/> (Access date: 15.10.2023) (in Russian)]
- Григорян М.А., Ткаченко О.В. Получение оздоровленного картофеля и диагностика вирусных заболеваний в условиях Энгельсского района Саратовской области. *Аграр. наука*. 2019;3:60-63. DOI 10.32634/0869-8155-2019-326-3-60-63  
[Grigoryan M.A., Tkachenko O.V. Receiving improved potatoes and diagnostics of viral diseases under the conditions of the Engels area of the Saratov region. *Agrarnaya Nauka = Agrarian Science*. 2019;3:60-63. DOI 10.32634/0869-8155-2019-326-3-60-63 (in Russian)]
- Малько А.М., Живых А.В., Никитин М.М., Французов П.А., Стацюк Н.В., Джавахия В.Г., Голиков А.Г. Мониторинг вирусных инфекций картофеля с использованием матричной ПЦР-диагностики. *Картофель и овощи*. 2017;12:26-29  
[Malko A.M., Zhivykh A.V., Nikitin M.M., Frantsuzov P.A., Statsyuk N.V., Dzhavakhiya V.G., Golikov A.G. Monitoring of potato viral diseases in different regions of Russia using real-time PCR matrix-based technology. *Kartofel' i Ovoschi = Potato and Vegetables*. 2017;12:26-29 (in Russian)]
- Печенкина В.А., Боронникова С.В. Зараженность вирусами X и Y посадочного материала сортов картофеля (*Solanum tuberosum* L.), выращиваемых в Пермском крае. *Бюлл. науки и практики*. 2020; 5:203-210  
[Pechenkina V.A., Boronnikova S.V. Infection with X and Y viruses of planting material of potato varieties (*Solanum tuberosum* L.) grown in the Perm Krai. *Bulleten' Nauki i Praktiki = Bulletin of Science and Practice*. 2020;5:203-210 (in Russian)]
- Стахеев А.А., Усков А.И., Варицев Ю.А., Галушка П.А., Ускова Л.Б., Жевора С.В., Завриев С.К. Изучение изолятов Y-вируса картофеля, распространенных на территории различных регионов Российской Федерации, с использованием новых молекулярных маркеров. *Земледелие*. 2023;6:37-40. DOI 10.24412/0044-3913-2023-6-37-40  
[Stakheev A.A., Uskov A.I., Varitsev Yu.A., Galushka P.A., Uskova L.B., Zhevora S.V., Zavriev S.K. Study of potato Y-virus isolates widespread in various regions of the Russian Federation using new molecular markers. *Zemledelie*. 2023;6:37-40. DOI 10.24412/0044-3913-2023-6-37-40 (in Russian)]
- Усков А.И., Варицев Ю.А., Бирюкова В.А., Галушка П.А., Варицева Г.П., Шмыгля И.В., Кравченко Д.В. Изучение штаммового состава Y-вируса картофеля из различных регионов Российской Федерации и Беларуси. *Земледелие*. 2016;8:36-38  
[Uskov A.I., Varitsev Yu.A., Biryukova V.A., Galushka P.A., Varitseva G.P., Shmyglya I.V., Kravchenko D.V. Study of the strain

- composition of potato virus Y from different regions of the Russian Federation and Belarus. *Zemledelie*. 2016;8:36-38 (in Russian)]
- Фоминных Т.С., Иванова Г.П., Медведева К.Д. Мониторинг вирусных болезней картофеля в Псковской и Астраханской областях России. *Вестн. защиты растений*. 2017;4(94):29-34 [Fominykh T.S., Ivanova G.P., Medvedeva K.D. Monitoring of viral diseases of potatoes in the Pskov and Astrakhan regions of Russia. *Vestnik Zashity Rasteniy = Plant Protection News*. 2017;4(94):29-34 (in Russian)]
- Хайруллин Р.М., Гарифуллина Д.В., Веселова С.В., Черепанова Е.А., Максимов И.В. Пораженность картофеля вирусами в Республике Башкортостан и активность рибонуклеаз. *Вестн. защиты растений*. 2021;104(4):196-201. DOI 10.31993/2308-6459-2021-104-4-15075 [Khairullin R.M., Garifullina D.V., Veselova S.V., Cherepanova E.A., Maksimov I.V. Potato infection with viruses in the republic of Bashkortostan and ribonuclease activity in tubers. *Vestnik Zashity Rasteniy = Plant Protection News*. 2021;104(4):196-201. DOI 10.31993/2308-6459-2021-104-4-15075 (in Russian)]
- Ahmadvand R., Takács A., Taller J., Wolf I., Polgár Z. Potato viruses and resistance genes in potato. *Acta Agron. Hungarica*. 2012;60(3): 283-298. DOI 10.1556/AAgr.60.2012.3.10
- Byarugaba A.A., Mukasa S.B., Barekye A., Rubaihayo P.R. Interactive effects of *Potato virus Y* and *Potato leafroll virus* infection on potato yields in Uganda. *Open Agric*. 2020;5(1):726-739. DOI 10.1515/opag-2020-0073
- Chikh-Ali M., Rowley J.S., Kuhl J.C., Gray S.M., Karasev A.V. Evidence of a monogenic nature of the *Nz* gene conferring resistance against *Potato virus Y* strain Z (PVY<sup>Z</sup>) in potato. *Am. J. Potato Res*. 2014;91:649-654. DOI 10.1007/s12230-014-9395-7
- Chikh-Ali M., Alruwaili H., Vander Pol D., Karasev A.V. Molecular characterization of recombinant strains of *Potato virus Y* from Saudi Arabia. *Plant Dis*. 2016a;100(2):292-297. DOI 10.1094/PDIS-05-15-0562-RE
- Chikh-Ali M., Bosque-Perez N., Vander Pol D., Sembel D., Karasev A.V. Occurrence and molecular characterization of recombinant *Potato virus Y*<sup>NTN</sup> isolates from Sulawesi, Indonesia. *Plant Dis*. 2016b;100(2):269-275. DOI 10.1094/PDIS-07-15-0817-RE
- Danci O., Ziegler A., Torrance L., Gasemi S., Daniel M. Potyviridae family – short review. *J. Hortic. For. Biotechnol*. 2009;13:410-420
- Fox A., Collins L.E., Macarthur R., Blackburn L.F., Northing P. New aphid vectors and efficiency of transmission of *Potato virus A* and strains of *Potato virus Y* in the UK. *Plant Pathol*. 2017;66(2):325-335. DOI 10.1111/ppa.12561
- Green K.J., Brown C.J., Gray S.M., Karasev A.V. Phylogenetic study of recombinant strains of *Potato virus Y*. *Virology*. 2017;507:40-52. DOI 10.1016/j.virol.2017.03.018
- Green K.J., Brown C.J., Karasev A.V. Genetic diversity of *Potato virus Y* (PVY): sequence analyses reveal ten novel PVY recombinant structures. *Arch. Virol*. 2018;163(1):23-32. DOI 10.1007/s00705-017-3568-x
- Hameed A., Iqbal Z., Asad S., Mansoor S. Detection of multiple potato viruses in the field suggests synergistic interactions among potato viruses in Pakistan. *Plant Pathol. J*. 2014;30(4):407-415. DOI 10.5423/PPJ.OA.05.2014.0039
- Jones R.A.C. Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars. *Ann. Appl. Biol*. 1990;117(1):93-105. DOI 10.1111/j.1744-7348.1990.tb04198.x
- Karasev A., Gray S. Continuous and emerging challenges of *Potato virus Y* in potato. *Annu. Rev. Phytopathol*. 2013;51:571-586. DOI 10.1146/annurev-phyto-082712-102332
- Kerlan C., Moury B. Potato virus Y. In: Mahy B.W.J., van Regenmortel M.H.V. (Eds.). *Encyclopedia of Virology*. San Diego: Academic Press, 2008;287-296. DOI 10.1016/B978-012374410-4.00737-8
- Kreuze J.F., Souza-Dias J.A.C., Jeevalatha A., Figueira A.R., Valkonen J.P.T., Jones R.A.C. Viral diseases in potato. In: Campos H., Ortiz O. (Eds.). *The Potato Crop*. Chap: Springer, 2020;389-430. DOI 10.1007/978-3-030-28683-5\_11
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol*. 2018;35(6):1547-1549. DOI 10.1093/molbev/msy096
- Lacomme C., Jacquot E. General characteristics of *Potato virus Y* (PVY) and its impact on potato production: an overview. In: Lacomme C., Glais L., Bellstedt D., Dupuis B., Karasev A., Jacquot E. (Eds.). *Potato Virus Y: Biodiversity, Pathogenicity, Epidemiology and Management*. Cham: Springer, 2017;1-19. DOI 10.1007/978-3-319-58860-5\_1
- Onditi J., Nyongesa M., van der Vlugt R. Prevalence, distribution and control of six major potato viruses in Kenya. *Trop. Plant Pathol*. 2021;46:311-323. DOI 10.1007/s40858-020-00409-x
- Scholthof K.B., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C., Foster G.D. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol*. 2011;12(9):938-954. DOI 10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x
- Szabó A.-K., Várallyay E., Demian E., Hegyi A., Galbács Z.N., Kiss J., Bálint J., Loxdale H.D., Balog A. Local aphid species infestation on invasive weeds affects virus infection of nearest crops under different management systems – A preliminary study. *Front. Plant Sci*. 2020;11:684. DOI 10.3389/fpls.2020.00684
- Uskov A.I., Varitsev Yu.A., Galushka P.A., Suslova N.V., Uskova L.B., Varitseva G.P., Zhevora S.V. Study of serological and phytopathological characteristics of potato Y-virus isolates distributed in various regions of the Russian Federation. *Dostizheniya Nauki i Tekhniki APK = Achievements of Science and Technology in Agro-industrial Complex*. 2022;36(10):18-22. DOI 10.53859/02352451\_2022\_36\_10\_18 (in Russian)

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

Поступила в редакцию 24.10.2023. После доработки 15.05.2024. Принята к публикации 15.05.2024.

DOI 10.18699/vjgb-24-62

## Earthworm (Oligochaeta, Lumbricidae) intraspecific genetic variation and polyploidy

S.V. Shekhovtsov <sup>1,2</sup> , Ye.A. Derzhinsky <sup>3</sup>, E.V. Golovanova <sup>4</sup><sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia<sup>2</sup> Institute of Biological Problems of the North of the Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Magadan, Russia<sup>3</sup> Vitebsk State University named after P.M. Masherov, Vitebsk, Belarus<sup>4</sup> Omsk State Pedagogical University, Omsk, Russia shekhovtsov@bionet.nsc.ru

**Abstract.** Earthworms are known for their intricate systematics and a diverse range of reproduction modes, including outcrossing, self-fertilization, parthenogenesis, and some other modes, which can occasionally coexist in a single species. Moreover, they exhibit considerable intraspecific karyotype diversity, with ploidy levels varying from di- to decaploid, as well as high genetic variation. In some cases, a single species may exhibit significant morphological variation, contain several races of different ploidy, and harbor multiple genetic lineages that display significant divergence in both nuclear and mitochondrial DNA. However, the relationship between ploidy races and genetic lineages in earthworms remains largely unexplored. To address this question, we conducted a comprehensive review of available data on earthworm genetic diversity and karyotypes. Our analysis revealed that in many cases, a single genetic lineage appears to encompass populations with different ploidy levels, indicating recent polyploidization. On the other hand, some other cases like *Octolasion tyraeum* and *Dendrobaena schmidtii/D. tellermanica* demonstrate pronounced genetic boundaries between ploidy races, implying that they diverged long ago. Certain cases like the *Eisenia nordenskioldi* complex represent a complex picture with ancient divergence between lineages and both ancient and recent polyploidization. The comparison of phylogenetic and cytological data suggests that some ploidy races have arisen independently multiple times, which supports the early findings by T.S. Vsevolodova-Perel and T.V. Malinina. The key to such a complex picture is probably the plasticity of reproductive modes in earthworms, which encompass diverse modes of sexual and asexual reproduction; also, it has been demonstrated that even high-ploidy forms can retain amphimixis.


**Key words:** genetic lineages; karyotypes; phylogeny; species divergence.

**For citation:** Shekhovtsov S.V., Derzhinsky Ye.A., Golovanova E.V. Earthworm (Oligochaeta, Lumbricidae) intraspecific genetic variation and polyploidy. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(5):563-570. DOI 10.18699/vjgb-24-62

**Funding.** This study was supported by the grants of the Russian Foundation for Basic Research (RFBR) No. 20-54-5603\_Iran\_t and 19-54-04006\_Bel\_mol\_a and the grant of the Iran National Science Foundation No. 99003929, as well as by the State Budget Project No. FWNR-2022-0022.

**Acknowledgements.** The authors are grateful to D.I. Berman and A.A. Makhrov for the idea of this study. DNA sequencing was performed in the SB RAS Genomics Core Facility (Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk, Russia).

## Дождевые черви (Oligochaeta, Lumbricidae): соответствие между внутривидовым генетическим разнообразием и пloidностью

С.В. Шеховцов <sup>1,2</sup> , Е.А. Держинский <sup>3</sup>, Е.В. Голованова <sup>4</sup><sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия<sup>2</sup> Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук, Магадан, Россия<sup>3</sup> Витебский государственный университет имени П.М. Машерова, Витебск, Беларусь<sup>4</sup> Омский государственный педагогический университет, Омск, Россия shekhovtsov@bionet.nsc.ru

**Аннотация.** Дождевые черви известны своей сложной систематикой и разнообразным набором типов размножения, включая амфимиксис, самооплодотворение, партеногенез и некоторые другие способы, которые иногда могут сосуществовать в пределах одного вида. Более того, они демонстрируют значительное внутривидовое разнообразие кариотипов с уровнями пloidности от ди- до декапloidных и выше, а также высокую генетическую изменчивость. В некоторых случаях один вид может сочетать большую морфологическую изменчивость, несколько рас с разной пloidностью и несколько филогенетических линий со значительными



различиями как по ядерной, так и по митохондриальной ДНК. При этом соответствие между расами различной плоидности и генетическими линиями дождевых червей остается в значительной степени неисследованным. В связи с этим мы провели всесторонний обзор имеющихся данных о генетическом разнообразии и кариотипах дождевых червей. Наш анализ показал, что во многих случаях одна генетическая линия включает в себя популяции с разными уровнями плоидности, что указывает на недавнюю полиплоидизацию. С другой стороны, в некоторых случаях, как, например, *Octolasion tyrtaeum* и *Dendrobaena schmidtii/D. tellermanica*, имеют место выраженные генетические границы между расами, что означает давнюю дивергенцию между ними. Некоторые таксоны, такие как комплекс *Eisenia nordenskioldi*, представляют собой множество давно дивергировавших филогенетических линий со сложными родственными отношениями между ними и как древней, так и недавней полиплоидией. Сопоставление филогенетических и цитологических данных позволяет предположить, что некоторые полиплоидные расы независимо возникали несколько раз, что подтверждает выводы работы Т.С. Всеволодовой-Перель и Т.В. Малининой. Причиной такой сложной картины, вероятно, служит пластичность способов репродукции, которые включают в себя разнообразные виды полового и бесполого размножения; причем даже формы с высокой плоидностью могут размножаться амфимиктически.

**Ключевые слова:** генетические линии; кариотипы; филогения; дивергенция видов.

## Introduction

Polyploidy in animals is relatively rare (Muller, 1925; Orr, 1990). However, certain groups are exceptions to this rule and exhibit a significant incidence of polyploidy (Gregory, Mable, 2005). Earthworms are among these exceptions (Muldal, 1952; Viktorov, 1997): the initial studies demonstrated that polyploidy is observed not only among groups of closely related species, but even within a single species, and often in sympatry (Omodeo, 1952, 1955). Subsequently, this phenomenon was documented in representatives of diverse genera (Vsevolodova-Perel, Bulatova, 2008; Mezhzherin et al., 2018). In addition to that, earthworms demonstrate diverse ways of reproduction (Pavliček et al., 2023). Although in animals polyploidy is generally associated with parthenogenesis, polyploid earthworms often retain the ability for amphimixis (Viktorov, 1989). While some species comprise a set of races with different ploidy levels, the prevailing view is that this alone is not a sufficient reason to classify them as distinct species (Vsevolodova-Perel, Bulatova, 2008).

Molecular studies revealed a vast genetic diversity within earthworm species (King et al., 2008; Porco et al., 2013). In most cases, several well-defined clades within a given species were identified, with 15–20 % of nucleotide substitutions between mitochondrial genes (these estimates sometimes vary, because different studies employ various distance measures, like Kimura-2-parameter, etc.). These clades are commonly referred to either as cryptic species or as the so-called genetic lineages (Marchán et al., 2018). The attempts to clarify the issue of genetic divergence on the nuclear level using various molecular methods generally confirmed the existence of significant nucleotide distances between these lineages (Martinsson, Erséus, 2017; Taheri et al., 2018), although in some instances, the data did not demonstrate signs of reproductive isolation of distinct lineages differing on the mitochondrial level (Giska et al., 2015; Martinsson et al., 2017; Martinsson, Erséus, 2018).

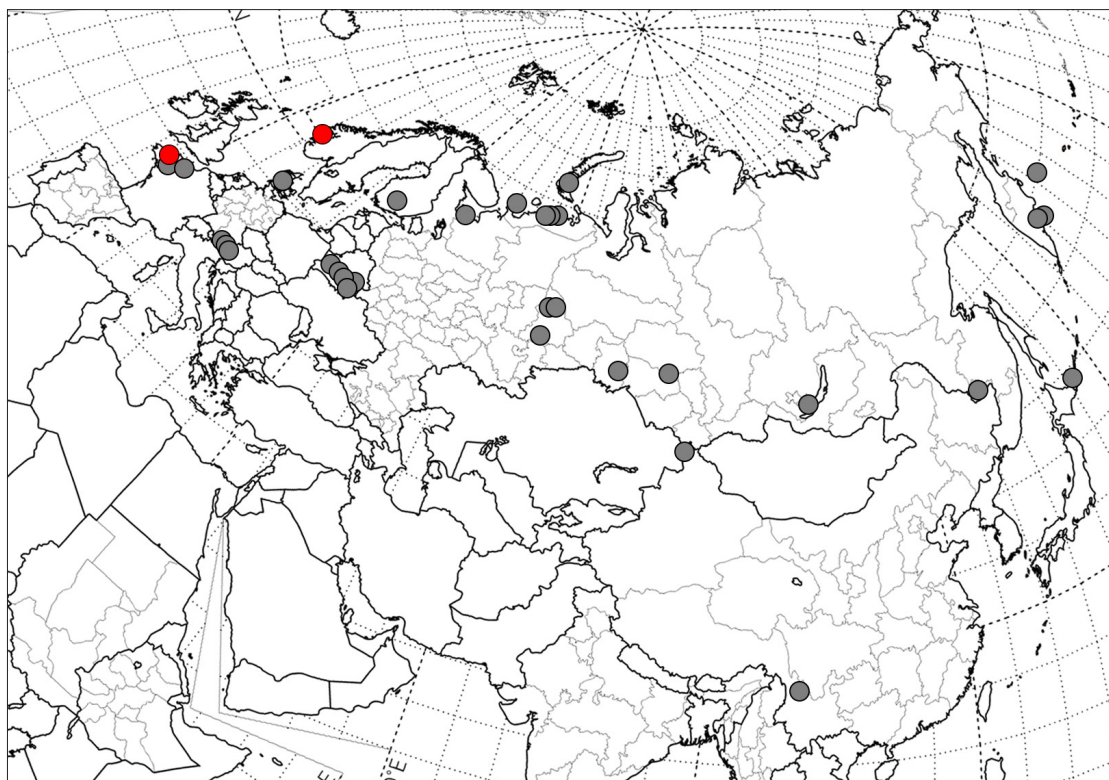
Thus, we can see that certain earthworm species have multiple races with different ploidy levels, as well as several genetic lineages with distinct mitochondrial and nuclear genomes. However, the relationship between chromosomal and DNA sequence variation remains unclear. Does each chromosomal race correspond to a particular genetic lineage, or do the boundaries between these entities lie elsewhere?

In this review, we analyzed the patterns of chromosomal and molecular variation in several earthworm species from various genera within the family Lumbricidae. The results provide insight into the relationships between these entities and outline directions for future research.

## Materials and methods

The data on the chromosome numbers of the populations of various earthworm species were taken from published materials (Muldal, 1952; Omodeo, 1952, 1955; Vedovini, 1973; Graphodatsky et al., 1982; Bulatova et al., 1984, 1987; Perel, Graphodatsky, 1984; Casellato, 1987; Viktorov, 1989, 1997; Kashmenskaya, Polyakov, 2008; Vsevolodova-Perel, Bulatova, 2008; Vlasenko et al., 2011; Mezhzherin et al., 2018). The information on the number of genetic lineages and on the assignment of particular populations to genetic lineages was extracted from scientific papers (Heethoff et al., 2004; King et al., 2008; Porco et al., 2013; Fernández et al., 2016; Shekhovtsov et al., 2014, 2020a–d; Ermolov et al., 2023), as well as the GenBank database.

For *Dendrobaena octaedra* (Savigny, 1826), we also obtained a sequence dataset for 99 specimens from 24 populations from Russia and adjacent countries (Fig. 1). Briefly, earthworms were fixed in ethanol; DNA was extracted from whole individuals or from parts of the body (ca. 100 mg) using BioSilica columns (Dia-m, Russia) according to the manufacturers' instructions. Fragments of the *cox1* gene were amplified using universal primers and sequenced as described in (Shekhovtsov et al., 2013). Sequences were deposited in GenBank under accession numbers OR366494–OR366522, KJ772497, KJ772504, KX400644, MH755642, MH755644, MH755645, MH755647, MH755649, MH755654, MH755666, MH755670, MH755672. A dataset of 157 full-length 658 bp *cox1* barcodes was taken from GenBank. Unique haplotypes were extracted from these datasets. Sequences of *D. octaedra* L2 were additionally searched in the BOLD database (<https://v4.boldsystems.org/>). Maximum likelihood trees were constructed using RAxML v. v. 8.2.12 (Stamatakis, 2014) with the GTRCAT substitution model and 1000 bootstrap replicates. Bayesian analysis was performed in MrBayes v. 3.4 (Ronquist et al., 2012). Two simultaneous independent runs were performed with 10 million generations each; 25 % of the generations were discarded as burn-in.



**Fig. 1.** Sampling locations of the sequenced *D. octaedra* individuals from Eurasia. Russia, Belarus, and Kazakhstan, our data; other countries, GenBank.

Grey dots – lineage 1; red dots – lineage 2.

## Results

### *Dendrobaena octaedra*

Among the 99 *D. octaedra* sequences obtained by us, we found 40 unique haplotypes. We also extracted 157 sequences from GenBank with 41 unique haplotypes. We combined these unique haplotypes from the two samples to construct phylogenetic trees (Fig. 2). Our analysis revealed that average genetic diversity within *D. octaedra* is very low compared to other earthworms. The majority of haplotypes belonged to a single group with lower diversity: average p-distance within the group was 2.3 %.

However, two haplotypes from GenBank, MF121744 and MF121754, differed significantly from the rest of the sample with an average p-distance of 19 %. These specimens were designated by the authors as *Dendrobaena octaedra* complex sp. L2. They were collected in the Eawy forest in Normandy (France), near the English Channel. Another three closely related sequences were found in the BOLD database, one from the vicinities of Florelandet (Norway), and the collection points of the other two specimens were undisclosed. These regions were affected by the most recent glaciation, so the local populations of *D. octaedra* were obviously introduced from another region relatively recently (ca. 10 kya). There are too few data on these specimens; since there are no associated papers with morphological descriptions, there is a chance that they might belong to another yet unknown species.

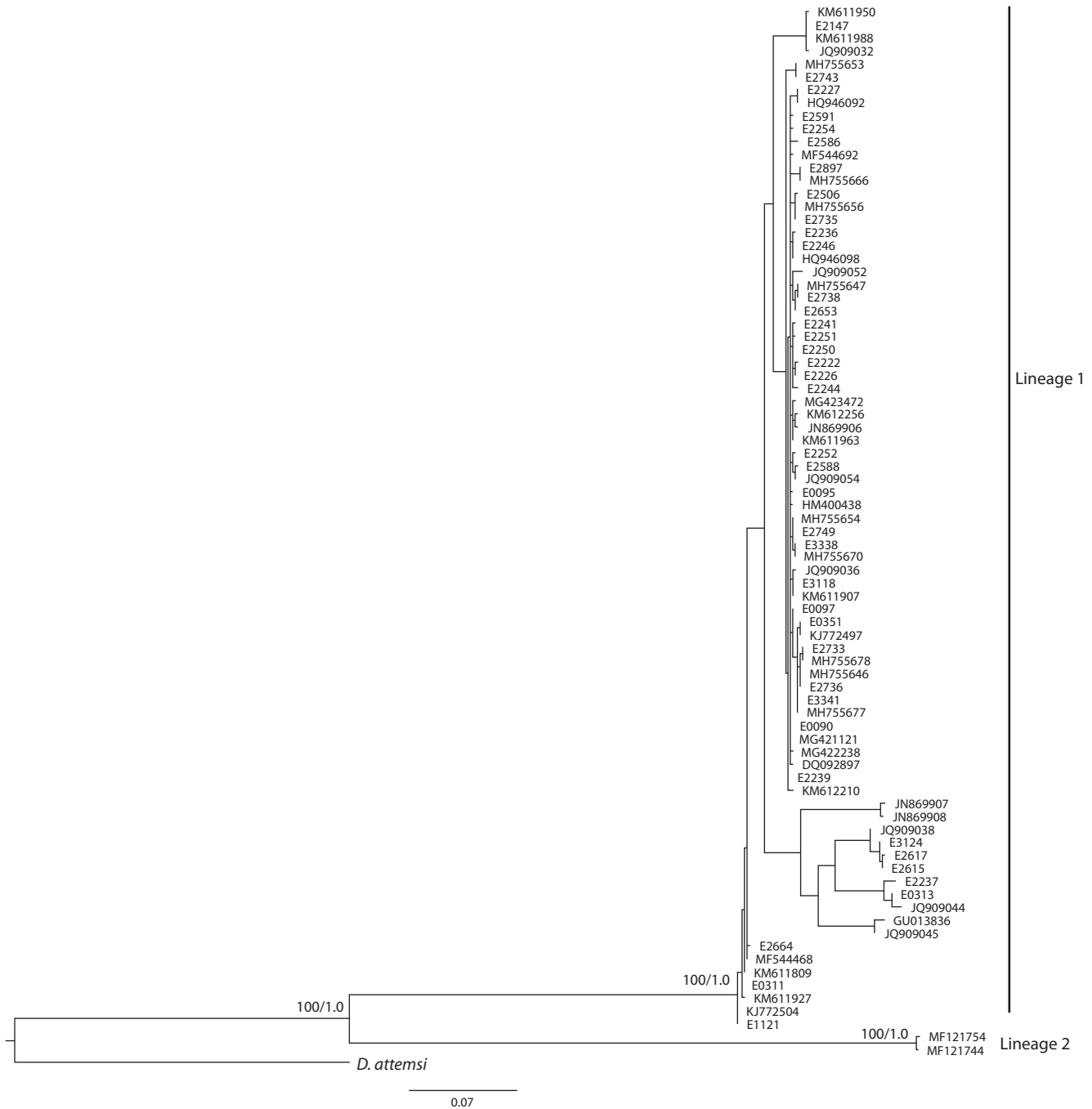
Four chromosomal races are known within *D. octaedra*,  $4n = 72$ ,  $5n = 90$ ,  $6n = 108$ , and  $8n = 144$  (Casellato, 1987;

Viktorov, 1993; Mezhzherin et al., 2018). Since the predominant majority of *D. octaedra* populations belong to a single genetic lineage, we can suggest that these three chromosomal races coexist within this lineage.

### *Aporrectodea rosea* (Savigny, 1826)

Races with  $2n = 36$ ,  $3n = 54$ ,  $4n = 72$ ,  $5n = 90$ ,  $6n = 108$ ,  $8n = 144$ , and  $10n \sim 180$  were described for *A. rosea* (Muldal, 1952; Casellato, Rodighiero, 1972; Casellato, 1987; Vsevolodova-Perel, Bulatova, 2008; Vlasenko et al., 2011). The initial barcoding studied uncovered the existence of several genetic lineages within this species: R.A. King et al. (2008) detected three lineages, whereas D. Porco et al. (2013) discovered four. R. Fernández et al. (2016) performed a detailed phylogeographic analysis of *A. rosea* in Western Europe, demonstrating that it can be divided into two major clades: the Eurosiberian and the Mediterranean. The former has a cosmopolitan distribution and includes the four lineages identified by R.A. King et al. (2008) and D. Porco et al. (2013), while the latter is confined to the Mediterranean region. Subsequently, additional genetic lineages were found in Russia and adjacent countries, all belonging to the Eurosiberian clade (Shekhovtsov et al., 2020a).

Therefore, many genetic lineages and ploidy races coexist within *A. rosea*. Detailed data on the relationships between them are currently not available. However, there is a single example that can shed light on this issue: S.V. Mezhzherin et al. (2018) reported a case of four chromosomal races ( $2n$ ,  $3n$ ,  $6n$ , and  $8n$ ) in the A.V. Fomin Botanical Garden (Kyiv).



**Fig. 2.** The phylogenetic tree built for the *D. octaedra* haplotypes using the maximum likelihood method. Numbers near branches indicate bootstrap support/Bayesian posterior probabilities.

According to phylogeographic studies (King et al., 2008; Shekhovtsov et al., 2020a), three lineages are rarely found in sympatry, and four have never been reported. Therefore, it is plausible that in this case, several chromosomal races coexist within a single lineage. Sure, this cannot be called hard evidence, but we don't have better data so far.

It is worth noting that body size does not correlate with chromosome number in *A. rosea* (Vlasenko et al., 2011). It is presumed that the races with  $2n = 36$ , as well as at least some populations with  $4n = 72$  and  $6n = 108$  are amphimictic (Vsevolodova-Perel, Bulatova, 2008).

### ***Bimastos rubidus* (Eisen, 1874)**

*B. rubidus* (formerly known as *Dendrodriilus rubidus*) is a rare species containing only a single genetic lineage (Ermolov et al., 2023) despite the fact that it has considerable intraspecific diversity and was until recently considered to contain four subspecies (Holmstrup, Simonsen, 1996; Vsevolodova-Perel, 1997; Sims, Gerard, 1999; Csuzdi et al., 2017). Chromosomal studies reported the presence of six ploidy races within the species:  $2n = 34$ ,  $3n = 51$ ,  $4n = 68$ ,  $5n = 85$ ,  $6n = 102$ , and  $8n = 136$  (Muldal, 1952; Omodeo, 1952; Vedovini, 1973; Casellato, 1987; Mezhzherin et al., 2018). Thus, similar to



*D. octaedra*, multiple ploidy races are encompassed within a single genetic lineage.

### *Octolasion tyrtaeum* (*lacteum*) (Örley, 1881)

*O. tyrtaeum* is generally believed to comprise two discrete size groups, referred to as “small” (body length 4–8 cm) and “big” (10–14 cm) (Meinhardt, 1974; Heethoff et al., 2004). Molecular studies demonstrated that mitochondrial and nuclear gene sequences of these two groups are significantly different and belong to two distinct genetic lineages (Heethoff et al., 2004; Shekhovtsov et al., 2014). These two lineages were reported to differ in ploidy: the “small” one is diploid, while the “big” one is triploid (Mezhzherin et al., 2018). Thus, in this case we can observe that a ploidy race corresponds to a single lineage. *O. tyrtaeum* is also a rare example of the dependence of body size on ploidy in earthworms (Mezhzherin et al., 2018).

It should be noted that this division of *O. tyrtaeum* into two groups is not straightforward. A third genetic lineage with body size similar to the “small” lineage but with different body proportions was found (Shekhovtsov et al., 2014, 2020b). Its ploidy is unknown. Moreover, body size may also differ between populations of different lineages (Shekhovtsov et al., 2020b).

### *Dendrobaena schmidti* (Michaelsen, 1907)

*D. schmidti* is widespread in the Caucasus and adjacent regions. It exhibits a wide range of pigmentation intensity, from unpigmented to deep purple coloration, and body size, ranging from 35 to 160 mm. Due to this variation, many subspecies were isolated from *D. schmidti*, some of them later recognized as distinct species (Perel, 1966; Kvavadze, 1985; Vsevolodova-Perel, 2003). However, not all these subspecies were widely accepted by researchers due to the lack of clear boundaries between them (Vsevolodova-Perel, 2003).

Chromosomal studies demonstrated that all the subspecies of *D. schmidti* distinguished in the book of E.S. Kvavadze (1985) exhibit the same chromosome number of  $2n = 36$  (Bakhtadze et al., 2003, 2005). On the other hand, *D. tellermanica*, originally described as *D. s. tellermanica* in 1966 (Perel, 1966) and subsequently elevated to the species rank (Vsevolodova-Perel, 2003), is tetraploid ( $4n = 72$ ) (Bakhtadze et al., 2003, 2005). *D. tellermanica* was distinguished from *D. schmidti* based on the lack of pigmentation, the start of the clitellum on the 25th segment (vs. 26th in *D. schmidti*), and wider distribution beyond the Caucasus region. Initially, it was believed to be strictly parthenogenetic, but later studies revealed the presence of populations with mature spermatozoa and spermatophores (Vsevolodova-Perel, 2003).

Recent molecular studies (Shekhovtsov et al., 2020c, 2023) showed that while *D. schmidti* and *D. tellermanica* are related, they exhibit significant differences in terms of nucleotide substitutions. This implies relatively ancient polyploidization, similar to *O. tyrtaeum*.

### *Eisenia nordenskioldi* (Eisen, 1879) complex

*E. nordenskioldi* has a vast distribution in Northern Asia and adjacent areas and is known for its high morphological diversity (Malevich, 1956; Vsevolodova-Perel, 1997). Thus it is not surprising that it was found to have extensive genetic diversity (Blakemore, 2013; Shekhovtsov et al., 2013, 2016,

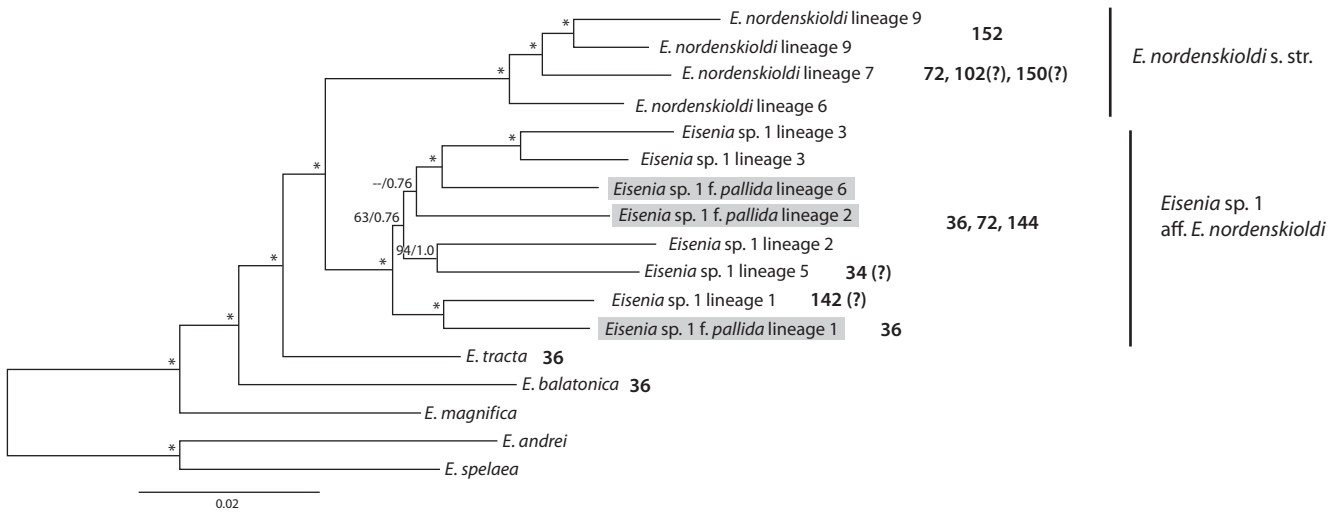
2018; Hong, Csuzdi, 2016). Molecular studies revealed that *E. nordenskioldi* consists of multiple genetic lineages divided into two large clades (Shekhovtsov et al., 2020d). These lineages strongly differ in mitochondrial and nuclear genome sequences (Shekhovtsov et al., 2020c), as well as genome size (Shekhovtsov et al., 2021). Therefore, *E. nordenskioldi* should be regarded as a species complex. Preliminary, this complex was divided into two large clades, referred to as *E. nordenskioldi* s. str. (genetic lineages 6, 7, and 9) and *Eisenia* sp. 1 aff. *E. nordenskioldi* (all other lineages) (Shekhovtsov et al., 2020d).

*E. nordenskioldi* is probably the best studied model of karyotype diversity among earthworms (Graphodatsky et al., 1982; Bulatova et al., 1984, 1987; Perel, Graphodatsky, 1984; Viktorov, 1989, 1997; Kashmenskaya, Polyakov, 2008; Vsevolodova-Perel, Bulatova, 2008). Races with  $2n = 36$ ,  $4n = 72$ ,  $6n = 96–102$ , and  $8n = 142–152$  were identified (Viktorov, 1997). However, it is not yet clear how the division into genetic lineages correlates with the different ploidy races. Although no direct studies are available, published data allow one to attribute certain populations of *E. nordenskioldi* to specific lineages and races. For example, the population from Magadan with  $8n = 152$  chromosomes (Viktorov, 1989) belongs to lineage 9: individuals collected from the same locations were sent to A.G. Viktorov and the authors of this paper by D.I. Berman. Furthermore, extensive studies failed to find other lineages of the pigmented form of *E. nordenskioldi* in this region (Shekhovtsov et al., 2020d).

M.N. Kashmenskaya and A.V. Polyakov (2008) conducted a study on the chromosome set of two individuals identified as *E. n. nordenskioldi* and *E. atlavyniteae*, a closely related species isolated from *E. nordenskioldi* (Perel, Graphodatsky, 1984), from the Central Siberian Botanical Garden in Novosibirsk. Both individuals were found to be diploid ( $2n = 36$ ). A later study of earthworms from the same location found lineages 1, 2, and 3 of the pigmented form of *E. nordenskioldi* (Shekhovtsov et al., 2013). Although we cannot attribute the specimens from the study of M.N. Kashmenskaya and A.V. Polyakov (2008) to a precise lineage, we know that this location does not harbor any lineage of *E. nordenskioldi* s. str. Therefore, these diploid populations belong to *Eisenia* sp. 1 aff. *E. nordenskioldi*.

Tetra- and octoploid races of *E. nordenskioldi* were reported from the Taymyr Autonomous Okrug, located in the north of West Siberia (Bulatova et al., 1984; Viktorov, 1989; Vsevolodova-Perel, Leirikh, 2014). Molecular studies identified genetic lineages 1 and 9 of the pigmented form of *E. nordenskioldi* from the same region (Shekhovtsov et al., 2020d). T.V. Malinina and T.S. Perel (1984) used allozyme data to demonstrate that the octoploid population from Taymyr is related to those from the south of West Siberia compared to other regions, suggesting that it likely belongs to lineage 1.

The population of *E. nordenskioldi* from the Dzhyanybek experimental station of the Institute of Forest Science RAS, located in the steppe zone of European Russia in Volgograd Oblast, has been reported to have  $4n = 72$  (Malinina, Perel, 1984; Viktorov, 1989). This population was artificially introduced from the floodplain of the Eruslan River in Saratov Oblast, Russia (Vsevolodova-Perel, Bulatova, 2008). According to our data, only lineage 7 of *E. nordenskioldi* is found in



**Fig. 3.** The position of chromosomal races of *E. nordenskioldi* on the phylogenetic tree of the species according to published data. The tree was taken from (Shekhovtsov et al., 2020d) built using transcriptomic data of various genetic lineages of *E. nordenskioldi* and outgroup species using the maximum likelihood algorithm.

Grey boxes around lineage names indicate that these lineages belong to the *pallida* (unpigmented) form. Bold numbers indicate chromosome numbers; question signs indicate that karyotype assignment is tentative. Numbers near branches indicate bootstrap support/Bayesian posterior probabilities. \* Refers to 100/1.0.

this region. The population from the Prioksko-Terrasny Nature Reserve in Moscow Oblast is also within the distribution range of lineage 7. Moreover, T.V. Malinina and T.S. Perel (1984) suggested that it is related to the Dzhanybek population based on allozyme data, so we could also attribute it to lineage 7. The same can be hypothesized for the Kursk population, which has  $6n = 102$  chromosomes (Viktorov, 1989).

A.G. Viktorov (1989) reported that *E. nana* from East Kazakhstan Oblast has 34 chromosomes. It has since been discovered that this species is actually a synonym of lineage 5 of the pigmented form of *E. nordenskioldi* (Shekhovtsov et al., 2020d; Golovanova et al., 2021). As the individuals used for both genetic and chromosomal analyses were collected from the same region, it is reasonable to hypothesize that they belong to the same lineage.

The unpigmented *pallida* form of *E. nordenskioldi* is considered to be diploid (Vsevolodova-Perel, Leirikh, 2014). These data were obtained for the population from the Novosibirsk Akademgorodok (Malinina, Perel, 1984; Viktorov, 1989). However, the *pallida* form is distributed throughout Siberia and the Far East and also contains many genetic lineages with different distributions (Shekhovtsov et al., 2016). The *pallida* form from Akademgorodok belongs to lineage 6 (Shekhovtsov et al., 2020d). It has a small genome size (ca. 270 Mb) (Shekhovtsov et al., 2021), while lineage 1 of the *pallida* form has a big genome (ca. 2500 Mb), suggesting that it may be polyploid.

We summarized the obtained data in Fig. 3, which includes chromosome numbers and the phylogenetic tree constructed using 212 nuclear genes (Shekhovtsov et al., 2020d). However, it is important to note that the chromosome numbers displayed are representative of certain populations and may not apply to the entire lineage.

*Eisenia tracta*, the sister species of the *E. nordenskioldi* complex, has  $2n = 36$  chromosomes, as does its relative *E. balatonica* (Fig. 3). Therefore, it is reasonable to suggest

that the ancestors of the two clades of *E. nordenskioldi* were also diploid with 36 chromosomes, and that polyploidy arose independently in both clades. This hypothesis on the independent origin of polyploid races in *E. nordenskioldi* was proposed by T.V. Malinina and T.S. Perel (1984) based on allozyme data. The authors concluded that octoploid populations arose independently at least twice. Our data supports this position, as octoploid races appear to have arisen independently in the two large clades of *E. nordenskioldi* (Fig. 3).

It is worth noting that published papers (Viktorov, 1997; Vsevolodova-Perel, Bulatova, 2008) and our unpublished data indicate that all studied populations of *E. nordenskioldi* have well-developed testes and normal spermatogenesis. According to A.G. Viktorov (1997), the evidence for parthenogenesis was only observed for the *acystis* form from Central Asia, which was subsequently isolated into a separate species (Vsevolodova-Perel, 1997). Additionally, octoploid individuals of lineage 9 from Magadan were observed copulating (D.I. Berman, personal communication). Thus, the available evidence suggests that polyploidy does not result in the loss of sexual reproduction in the *E. nordenskioldi* complex in most cases.

## Discussion

Based on the data presented above, it is apparent that the relationships between ploidy races and genetic lineages are rarely straightforward. This was only observed in the cases of *O. tyrtaeum* and the *D. schmidtii* – *D. tellermanica* pair. For many species, multiple ploidy races were found to belong to the same genetic lineage. In all these cases, races of different ploidy do not have any apparent differences on the level of mitochondrial or nuclear DNA, suggesting that polyploidization events in these cases may be recent. However, in other cases, such as the *E. nordenskioldi* complex, the age of the polyploidization events is unknown, but is likely to be significant, 1–3 Mya as estimated in (Shekhovtsov et al., 2013).

Although the precision of molecular clock dating using only mitochondrial data and no fossils is limited (Kodandaramaiah, 2011), deep divergence between these taxa is obvious.

Earthworms exhibit a high degree of plasticity in their modes of reproduction: most species are reported to have either amphimixis or parthenogenesis, as well as less common modes such as autogamy or restitutional automixis (Pavlíček et al., 2023). Although it is generally considered that polyploidy in animals should be associated with parthenogenesis, there is no obvious association between these modes in earthworms: many polyploid races retain the ability to reproduce sexually. Furthermore, populations with sexual reproduction or partial degeneration of the sexual system were found in species that are considered parthenogenetic (Fernández et al., 2010). In other parthenogenetic species, there are genetic clues to possible sexual reproduction (Simonsen, Holmstrup, 2008). This flexibility in reproduction modes may contribute to the widespread occurrence of polyploidy in earthworms.

Some researchers suggested that polyploid races may have arisen as a result of allopolyploidization (Mezhzherin et al., 2018). However, it is important to note that none of the available molecular studies have yet provided evidence to support this hypothesis.

## Conclusion

Based on the available data, we can conclude that the most frequent case in earthworms is “one genetic lineage – several ploidy races”, implying that this polyploidy is recent. However, in some instances, polyploid populations can survive for prolonged periods of time, giving rise to new genetic lineages.

## References

- Bakhtadze N.G., Kvavadze E.S., Bakhtadze G.I. Results of karyologic investigation of *Dendrobaena (C.) marinae* Kvavadze, 1985 (Oligochaeta, Lumbricidae). *Bull. Georg. Natl. Acad. Sci.* 2003;167(2): 315-316
- Bakhtadze N., Bakhtadze G., Kvavadze E. The results of study of the genus *Dendrobaena* (Oligochaeta, Lumbricidae) species chromosome numbers. *Bull. Georg. Acad. Sci.* 2005;172(1):141-143
- Blakemore R.J. Earthworms newly from Mongolia (Oligochaeta, Lumbricidae, *Eisenia*). *Zookeys*. 2013;285:1-21. DOI 10.3897/zookeys.285.4502
- Bulatova N.S., Viktorov A.G., Perel T.S. Ecological heterogeneity of polyploid forms of earthworms (Oligochaeta, Lumbricidae) with special reference to *Eisenia nordenskioldi* (Eisen). *Proc. USSR Acad. Sci.* 1984;278:1020-1021 (in Russian)
- Bulatova N., Perel T.S., Graphodatsky A.S. Constancy of the chromosome set in polyploid earthworms with special reference to *Eisenia nordenskioldi* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Bollettino di Zoologia*. 1987;54(4):289-291. DOI 10.1080/11250008709355599
- Casellato S. On polyploidy in Oligochaetae with particular reference to Lumbricids. In: *Year Earthworms*. Modena: Mucci, 1987;75-87
- Casellato S., Rodighiero R. Karyology of Lumbricidae. III Contribution. *Caryologia*. 1972;25(4):513-524. DOI 10.1080/00087114.1972.10796504
- Csuzdi C., Chang C.-H., Pavlíček T., Szederjesi T., Esopi D., Szlávecz K. Molecular phylogeny and systematics of native North American lumbricid earthworms (Clitellata: Megadrili). *PLoS One*. 2017;12(8):e0181504. DOI 10.1371/journal.pone.0181504
- Ermolov S.A., Shekhovtsov S.V., Geraskina A.P., Derzhinsky E.A., Kotsur V.M., Poluboyarova T.V., Peltek S.E. Morphological and genetic analysis of *Dendrodrilus rubidus (Bimastos rubidus)* (Oligochaeta, Lumbricidae) in Russia and Belarus. *Russ. J. Ecosyst. Ecol.* 2023;8(1):15-27. DOI 10.21685/2500-0578-2023-1-2
- Fernández R., Novo M., Gutiérrez M., Almodóvar A., Díaz Cosín D.J. Life cycle and reproductive traits of the earthworm *Aporrectodea trapezoides* (Dugès, 1828) in laboratory cultures. *Pedobiologia*. 2010;53(5):295-299. DOI 10.1016/j.pedobi.2010.01.003
- Fernández R., Novo M., Marchán D.F., Díaz Cosín D.J. Diversification patterns in cosmopolitan earthworms: similar mode but different tempo. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2016;94(Pt. B):701-708. DOI 10.1016/j.ympev.2015.07.017
- Giska I., Sechi P., Babik W. Deeply divergent sympatric mitochondrial lineages of the earthworm *Lumbricus rubellus* are not reproductively isolated. *BMC Evol. Biol.* 2015;15(1):217. DOI 10.1186/s12862-015-0488-9
- Golovanova E.V., Kniazev S.Y., Babiy K.A., Tsvirko E.I., Karaban K., Solomatin D.V. Dispersal of earthworms from the Rudny Altai (Kazakhstan) into Western Siberia. *Ecol. Montenegrina*. 2021;45: 48-61. DOI 10.37828/em.2021.45.9
- Graphodatsky A.S., Perel T.S., Radzhabli S.I. Chromosome sets of two forms of *Eisenia nordenskioldi* (Eisen) (Oligochaeta, Lumbricidae). *Doklady AN SSSR = Reports of the Academy of Sciences of USSR*. 1982;262:1514-1516 (in Russian)
- Gregory T.R., Mable B.K. Polyploidy in animals. In: *The Evolution of the Genome*. San Diego: Elsevier, 2005;427-517. DOI 10.1016/B978-012301463-4/50010-3
- Heethoff M., Etzold K., Scheu S. Mitochondrial COII sequences indicate that the parthenogenetic earthworm *Octolasion tyrtaeum* (Savigny 1826) constitutes of two lineages differing in body size and genotype. *Pedobiologia*. 2004;48(1):9-13. DOI 10.1016/j.pedobi.2003.04.001
- Holmstrup M., Simonsen V. Genetic and physiological differences between two morphs of the lumbricid earthworm *Dendrodrilus rubidus* (Savigny, 1826). *Soil Biol. Biochem.* 1996;28(8):1105-1107. DOI 10.1016/0038-0717(96)00110-1
- Hong Y., Csuzdi C. New data to the earthworm fauna of the Korean Peninsula with redescription of *Eisenia koreana* (Zicsi) and remarks on the *Eisenia nordenskioldi* species group (Oligochaeta, Lumbricidae). *Zool. Stud.* 2016;55:12. DOI 10.6620/ZS.2016.55-12
- Kashmenskaya M.N., Polyakov A.V. Karyotype analysis of five species of earthworms (Oligochaeta: Lumbricidae). *Comp. Cytogenet.* 2008;2(2):121-125
- King R.A., Tibble A.L., Symondson W.O.C. Opening a can of worms: Unprecedented sympatric cryptic diversity within British lumbricid earthworms. *Mol. Ecol.* 2008;17(21):4684-4698. DOI 10.1111/j.1365-294X.2008.03931.x
- Kodandaramaiah U. Tectonic calibrations in molecular dating. *Curr. Zool.* 2011;57(1):116-124. DOI 10.1093/czoolo/57.1.116
- Kvavadze E.S. The Earthworms (Lumbricidae) of the Caucasus. Tbilisi: Metsniereba Publ., 1985 (in Russian)
- Malevich I.I. On the study of earthworms in the Far East. *Proc. V.P. Potemkin MSPI*. 1956;61(4/5):439-449 (in Russian)
- Malinina T.V., Perel T.S. Characterization of *Eisenia nordenskioldi* (Oligochaeta, Lumbricidae) chromosome races using allozyme markers. *Doklady Akademii Nauk SSSR = Reports of the Academy of Sciences of USSR*. 1984;279:1265-1269 (in Russian)
- Marchán D.F., Cosín D.J.D., Novo M. Why are we blind to cryptic species? Lessons from the eyeless. *Eur. J. Soil Biol.* 2018;86:49-51. DOI 10.1016/j.ejsobi.2018.03.004
- Martinsson S., Erséus C. Cryptic speciation and limited hybridization within *Lumbricus earthworms* (Clitellata: Lumbricidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 2017;106:18-27. DOI 10.1016/j.ympev.2016.09.011
- Martinsson S., Erséus C. Hybridisation and species delimitation of Scandinavian *Eisenia* spp. (Clitellata: Lumbricidae). *Eur. J. Soil Biol.* 2018;88:41-47. DOI 10.1016/j.ejsobi.2018.06.003
- Martinsson S., Rhodén C., Erséus C. Barcoding gap, but no support for cryptic speciation in the earthworm *Aporrectodea longa* (Clitellata: Lumbricidae). *Mitochondrial DNA Part A*. 2017;28(2):147-155. DOI 10.3109/19401736.2015.1115487
- Meinhardt U. Comparative observations on the laboratory biology of endemic earthworm species. II. Biology of bred species. *Zeitschrift für Angew. Zool.* 1974;61:137-182




- Mezhzherin S.V., Garbar A.V., Vlasenko R.P., Onishchuk I.P., Kotsyuba I.Y., Zhalai E.I. Evolutionary Paradox of the Parthenogenetic Earthworms. Kiev: Naukova Dumka Publ., 2018 (in Russian)
- Muldal S. The chromosomes of the earthworms: I. The evolution of polyploidy. *Heredity*. 1952;6(1):56-76. DOI 10.1038/hdy.1952.4
- Muller H.J. Why polyploidy is rarer in animals than in plants. *Am. Nat.* 1925;59(663):346-353. DOI 10.1086/280047
- Omodeo P. Cariologia dei Lumbricidae: (con Tavole XIV–XV e 27 figure nel testo). *Caryologia*. 1952;4(2):173-275. DOI 10.1080/00087114.1952.10797539
- Omodeo P. Cariologia dei Lumbricidae II. Contributo (con 8 tabelle e 16 figure nel testo). *Caryologia*. 1955;8(1):135-178. DOI 10.1080/00087114.1955.10797555
- Orr H.A. “Why polyploidy is rarer in animals than in plants” revisited. *Am. Nat.* 1990;136(6):759-770. DOI 10.1086/285130
- Pavliček T., Szederjesi T., Pearlson O., Csuzdi C. Biodiversity and distribution of earthworms in the biogeographic province of the Levant. *Zool. Middle East*. 2023;69(4):394-409. DOI 10.1080/09397140.2023.2279360
- Perel T.S. Earthworms in forest soils of the Northwestern Caucasus. In: The Impact of Animals on the Productivity of Forest Biogeocenoses. Moscow: Nauka Publ., 146-165 (in Russian)
- Perel T.S., Graphodatsky A.S. New species of the genus *Eisenia* (Lumbricidae, Oligochaeta) and their chromosome sets. *Zoologicheskii Zhurnal*. 1984;63(4):610-612
- Porco D., Decaëns T., Deharveng L., James S.W., Skarzyński D., Erseus C., Butt K.R., Richard B., Hebert P.D.N. Biological invasions in soil: DNA barcoding as a monitoring tool in a multiple taxa survey targeting European earthworms and springtails in North America. *Biol. Invasions*. 2013;15(4):899-910. DOI 10.1007/s10530-012-0338-2
- Ronquist F., Teslenko M., Van Der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 2012;61(3):539-542. DOI 10.1093/sysbio/sys029
- Shekhovtsov S.V., Golovanova E.V., Peltek S.E. Cryptic diversity within the Nordenskiöld's earthworm, *Eisenia nordenskiöldi* subsp. *nordenskiöldi* (Lumbricidae, Annelida). *Eur. J. Soil Biol.* 2013;58:13-18. DOI 10.1016/j.ejsobi.2013.05.004
- Shekhovtsov S.V., Golovanova E.V., Peltek S.E. Genetic diversity of the earthworm *Octolasion tyrtaeum* (Lumbricidae, Annelida). *Pedobiologia*. 2014;57(4-6):245-250. DOI 10.1016/j.pedobi.2014.09.002
- Shekhovtsov S.V., Berman D.I., Bazarova N.E., Bulakhova N.A., Porco D., Peltek S.E. Cryptic genetic lineages in *Eisenia nordenskiöldi pallida* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Eur. J. Soil Biol.* 2016;75:151-156. DOI 10.1016/j.ejsobi.2016.06.004
- Shekhovtsov S.V., Berman D.I., Bulakhova N.A., Vinokurov N.N., Peltek S.E. Phylogeography of *Eisenia nordenskiöldi nordenskiöldi* (Lumbricidae, Oligochaeta) from the north of Asia. *Polar Biol.* 2018;41(2):237-247. DOI 10.1007/s00300-017-2184-2
- Shekhovtsov S.V., Ershov N.I., Vasiliev G.V., Peltek S.E. Transcriptomic analysis confirms differences among nuclear genomes of cryptic earthworm lineages living in sympatry. *BMC Evol. Biol.* 2019;19(Suppl. 1):50. DOI 10.1186/s12862-019-1370-y
- Shekhovtsov S.V., Derzhinsky Y.A., Poluboyarova T.V., Golovanova E.V., Peltek S.E. Phylogeography and genetic lineages of *Aporrectodea rosea* (Lumbricidae, Annelida). *Eur. J. Soil Biol.* 2020a;99:103191. DOI 10.1016/j.ejsobi.2020.103191
- Shekhovtsov S.V., Ermolov S.A., Derzhinsky Ye.A., Poluboyarova T.V., Laricheva M.S., Peltek S.E. Genetic and body size variation in *Octolasion tyrtaeum* (Lumbricidae, Annelida). *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020b;6(1):5-9. DOI 10.18699/Letters2020-6-01 (in Russian)
- Shekhovtsov S.V., Rapoport I.B., Poluboyarova T.V., Geraskina A.P., Golovanova E.V., Peltek S.E. Morphotypes and genetic diversity of *Dendrobaena schmidtii* (Lumbricidae, Annelida). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020c;24(1):48-54. DOI 10.18699/VJ20.594
- Shekhovtsov S.V., Shipova A.A., Poluboyarova T.V., Vasiliev G.V., Golovanova E.V., Geraskina A.P., Bulakhova N.A., Szederjesi T., Peltek S.E. Species delimitation of the *Eisenia nordenskiöldi* complex (Oligochaeta, Lumbricidae) using transcriptomic data. *Front. Genet.* 2020d;11:1508. DOI 10.3389/fgene.2020.598196
- Shekhovtsov S.V., Efremov Y.R., Poluboyarova T.V., Peltek S.E. Variation in nuclear genome size within the *Eisenia nordenskiöldi* complex (Lumbricidae, Annelida). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(6):647-651. DOI 10.18699/VJ21.073
- Shekhovtsov S.V., Shipova A.A., Bulakhova N.A., Berman D.I. Differentiation within the *Drawida ghilarovi* complex (Moniligastridae: Annelida) revealed by multigene transcriptomic dataset analysis. *Eur. J. Soil Biol.* 2022;111:103411. DOI 10.1016/j.ejsobi.2022.103411
- Simonsen V., Holmstrup M. Deviation from apomictic reproduction in *Dendrobaena octaedra*? *Hereditas*. 2008;145(4):212-214. DOI 10.1111/j.0018-0661.2008.02045.x
- Sims R.W., Gerard B.M. Earthworms: Notes for the Identification of British Species. London, 1999
- Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 2014;30(9):1312-1313. DOI 10.1093/bioinformatics/btu033
- Taheri S., James S., Roy V., Decaëns T., Williams B.W., Anderson F., Rougerie R., Chang C.-H., Brown G., Cunha L., Stanton D.W.G., Da Silva E., Chen J.-H., Lemmon A.R., Moriarty Lemmon E., Bartz M., Baretta D., Barois I., Lapied E., Coulis M., Dupont L. Complex taxonomy of the ‘brush tail’ peregrine earthworm *Pontoscotlex corethrurus*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2018;124:60-70. DOI 10.1016/j.ympev.2018.02.021
- Vedovini A. Systématique, caryologie et écologie des oligochètes terrestres de la région provençale. Centre de documentation du C.N.R.S. Thèse. Fac. Sci. Univ. Provence, 1973
- Viktorov A.G. Ecology, Caryology, and Radiosensitivity of Earthworm Races with Different Ploidy. Moscow, 1989 (in Russian)
- Viktorov A.G. Polyploid race variety in the earthworms family Lumbricidae. *Uspekhi Sovremennoy Biologii = Biology Bulletin Reviews*. 1993;113(3):304-312 (in Russian)
- Viktorov A.G. Diversity of polyploid races in the family Lumbricidae. *Soil Biol. Biochem.* 1997;29(3-4):217-221. DOI 10.1016/S0038-0717(96)00086-7
- Vlasenko R.P., Mezhzherin S.V., Kotsyuba Y. Polyploid races, genetic structure and morphological features of earthworm *Aporrectodea rosea* (Savigny, 1826) (Oligochaeta, Lumbricidae) in Ukraine. *Comp. Cytogenet.* 2011;5(2):91. DOI 10.3897/compcytogen.v5i2.968
- Vsevolodova-Perel T.S. The Earthworms of the Russian Fauna: Cadaster and Key. Moscow: Nauka Publ., 1997 (in Russian)
- Vsevolodova-Perel T.S. Addition to the fauna of earthworms (Oligochaeta, Lumbricidae) of the Northern Caucasus. *Zoologicheskii Zhurnal*. 2003;82(2):275-280 (in Russian)
- Vsevolodova-Perel T.S., Bulatova N.S. Polyploid races of earthworms (Lumbricidae, Oligochaeta) in the East European plain and Siberia. *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci.* 2008;35(4):385-388. DOI 10.1134/S1062359008040092
- Vsevolodova-Perel T.S., Leirikh A.N. Distribution and ecology of the earthworm *Eisenia nordenskiöldi pallida* (Oligochaeta, Lumbricidae) dominant in Southern Siberia and the Russian Far East. *Zoologicheskii Zhurnal*. 2014;93(1):45-52. DOI 10.7868/S0044513414010206 (in Russian)

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received February 11, 2024. Revised March 20, 2024. Accepted March 22, 2024.

DOI 10.18699/vjgb-24-63

## Филогеография шерстистого мамонта (*Mammuthus primigenius*) в Минусинской котловине на юге Сибири в позднем плейстоцене

С.А. Модина<sup>1,2</sup> , М.А. Куслий<sup>1</sup>, Д.Г. Маликов<sup>1,3</sup>, А.С. Молодцева<sup>1,4</sup><sup>1</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия<sup>3</sup> Институт геологии и минералогии им. В.С. Соболева Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия<sup>4</sup> Институт археологии и этнографии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия s.modina@gs.nsu.ru

**Аннотация.** К настоящему времени опубликован ряд исследований о филогенетике шерстистых мамонтов (*Mammuthus primigenius*), начиная с анализа частей митохондриального генома и заканчивая изучением полных ядерных геномов. Однако до сих пор ничего не известно о генетическом разнообразии шерстистых мамонтов на Юге Сибири, в частности в Минусинской котловине. В рамках данной работы были получены библиотеки для высокопроизводительного секвенирования семи костных образцов шерстистых мамонтов, проведены двухраундное обогащение с использованием биотинилированных зондов современной мтДНК *Elephas maximus*, иммобилизованных на магнитные микросферы, и секвенирование с последующим биоинформационным анализом. Филогенетические реконструкции показали принадлежность всех исследованных нами вариантов мтДНК мамонтов к кладе I, что расширило ее ареал. Расположение митотипов мамонтов Минусинской котловины в разных субкладах внутри клады I может указывать на достаточно высокое разнообразие их генофонда. Филогеографические реконструкции выявили генетическую близость митохондриальных линий позднплейстоценовых мамонтов Минусинской котловины и других регионов Восточной Сибири и их дивергенцию во временном промежутке от 100 до 150 тыс. лет назад, что свидетельствует об активных миграциях шерстистых мамонтов на обширных территориях Восточной Сибири в конце среднего–начале позднего плейстоцена.

**Ключевые слова:** древняя ДНК; шерстистый мамонт; филогеография; митохондриальный геном; Южная Сибирь.

**Для цитирования:** Модина С.А., Куслий М.А., Маликов Д.Г., Молодцева А.С. Филогеография шерстистого мамонта (*Mammuthus primigenius*) в Минусинской котловине на юге Сибири в позднем плейстоцене. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(5):571-577. DOI 10.18699/vjgb-24-63

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 23-74-10060, <https://rscf.ru/project/23-74-10060/>.

## Phylogeography of the woolly mammoth (*Mammuthus primigenius*) in the Minusinsk Depression of southern Siberia in the Late Pleistocene

S.A. Modina<sup>1,2</sup> , M.A. Kusliy<sup>1</sup>, D.G. Malikov<sup>1,3</sup>, A.S. Molodtseva<sup>1,4</sup><sup>1</sup> Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia<sup>3</sup> V.S. Sobolev Institute of Geology and Mineralogy of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia<sup>4</sup> Institute of Archaeology and Ethnography, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia s.modina@gs.nsu.ru

**Abstract.** To date, a number of studies have been published on the phylogenetics of woolly mammoths (*Mammuthus primigenius*), ranging from analyses of parts of the mitochondrial genome to studies of complete nuclear genomes. However, until recently nothing was known about the genetic diversity of woolly mammoths in southern Siberia, in the Minusinsk Depression in particular. Within the framework of this effort, libraries for high-throughput sequencing of seven bone samples of woolly mammoths were obtained, two-round enrichment using biotinylated probes of modern mtDNA of *Elephas maximus* immobilised on magnetic microspheres and sequencing with subsequent bioinformatic analysis were carried out. Phylogenetic reconstructions showed the presence of all studied mammoths in clade I, which expanded its range. The assignment of mammoth mitotypes in the Minusinsk Depression to different clusters within clade I may indicate a sufficiently high diversity of their gene pool. Phylogeographic reconstructions revealed a genetic proximity of mitochondrial lineages of Late Pleistocene mammoths of the Minusinsk Depression and other

regions of eastern Siberia and estimated their divergence time in the range of 100–150 thousand years ago, which indicates active migrations of woolly mammoths over vast territories of eastern Siberia in the late Middle Pleistocene–early Late Pleistocene.

**Key words:** ancient DNA; woolly mammoth; phylogeography; mitochondrial genome; southern Siberia.

**For citation:** Modina S.A., Kusliy M.A., Malikov D.G., Molodtseva A.S. Phylogeography of the woolly mammoth (*Mammuthus primigenius*) in the Minusinsk Depression of southern Siberia in the Late Pleistocene. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(5):571–577. DOI 10.18699/vjgb-24-63

## Введение

К настоящему времени сформирована обширная научная база для изучения филогеографии шерстистых мамонтов, являющихся одними из наиболее значимых представителей мамонтовой фауны. В базе Genbank находится 32 митогенома *Mammuthus primigenius* Blumenbach, 1799. По палеонтологическим данным, общая линия азиатских слонов и шерстистых мамонтов (*Mammuthus primigenius*) отделилась от линии африканских слонов (*Loxodonta africana*) 6 млн лет назад, а дивергенция линий мамонтов и азиатских слонов (*Elephas maximus*), согласно генетическим данным, датирована периодом 440 тыс.–2 млн лет назад (Krause et al., 2006; Rogaev et al., 2006).

В 2007 г. были опубликованы результаты одного из первых исследований филогеографических взаимоотношений митохондриальных линий обширной и разнообразной выборки шерстистых мамонтов, основанного на анализе последовательностей 741 п. н. митогенома (три гена + часть контрольного района) (Barnes et al., 2007). Выборка включала в себя 41 шерстистого мамонта, обитавшего в Европе, Азии (Западная Берингия, полуостров Камчатка, Северо-Центральная Сибирь) и Северной Америке (Восточная Берингия), возраст образцов варьировал от 12 до 51 тыс. лет. В ходе исследования были выявлены две основные митогруппы шерстистых мамонтов, существовавшие в пределах Западной, Восточной Сибири, Дальнего Востока и Аляски, а также митохондриальная линия мамонтов Европейского региона. Первая митогруппа была распространена в Сибири и Северной Америке, а вторая – только на севере Восточной Сибири, между долинами рек Лены и Колымы. Анализ последовательностей 743 п. н. гиперварибельного района митогенома 160 мамонтов голарктической области Евразии и Северной Америки выявил 80 гаплотипов, образующих пять гаплогрупп (A–E), формирующих три основные клады (A, B и C+D+E), кластеризация которых поддерживается высокими значениями апостериорной вероятности. Клада A включает только азиатские митотипы, клада C – только североамериканские, остальные гаплогруппы являются смешанными (Debruyne et al., 2008). Однако авторы упомянутых работ были сосредоточены лишь на частичных последовательностях митогенома, которые, в отличие от полных последовательностей, дают не такое четкое решение филогении.

Исследования 18 полных митогеномов шерстистых мамонтов подтвердили наличие двух митогрупп в Сибири в позднем плейстоцене (Krause et al., 2006; Poinar et al., 2006; Rogaev et al., 2006; Gilbert et al., 2007). Одна из клад стабильно присутствовала в генофонде популяций длительное время, тогда как представители второй клады

вымерли. Исчезновение второй клады могло быть связано с ее ограниченным распространением (Payne, Finnegan, 2007).

Существуют разногласия в определении времени внутривидовой дивергенции мамонтов. Одни авторы указывают на 1–2 млн лет назад (Gilbert et al., 2007), другие, основываясь на филогенетических реконструкциях, – на около 1 млн лет назад (Van der Valk et al., 2021). Репрезентативность данных о разнообразии вариантов митохондриальной ДНК, относящихся к первой и второй кладам, невелика, особенно для популяций Сибири, поэтому продолжение исследования локальных серий образцов мтДНК из различных ее районов необходимо для полного понимания генетического разнообразия шерстистых мамонтов в этом регионе.

Анализ ядерного генома позволил подтвердить близость шерстистых мамонтов к азиатским слонам (Greenwood et al., 1999; Capelli et al., 2006; Miller et al., 2008) и оценить время дивергенции мамонтов и африканских слонов (*Elephas maximus*) в 5–6 млн лет назад (Poinar et al., 2006). Отдельные исследования последовательностей ядерного генома тоже указывают на две клады мамонтов, разделение которых произошло 1.5–2 млн лет назад (Miller et al., 2008), однако полногеномный анализ предполагает время разделения от 50 до 155 тыс. лет назад (Palkopoulou et al., 2015). Также результаты изучения ядерных геномов мамонтов раннего и среднего плейстоцена указывают на существование двух линий в Восточной Сибири, лишь одна из которых представляет предков шерстистых мамонтов.

Надо подчеркнуть, что описанные ранее образцы с территории Сибири и Дальнего Востока происходят из северных и восточных районов. Молекулярно-генетический анализ образцов с географически изолированных территорий выявляет новое генетическое разнообразие, такое как наличие второй митогруппы шерстистых мамонтов в северной части Восточной Сибири (Gilbert et al., 2007). Дополнительное изучение образцов ДНК мамонтов из разных регионов Сибири позволяет расширить представление о филогенетическом разнообразии мтДНК мамонтов и особенностях ее филогеографии. Например, на Таймыре была обнаружена генетическая линия шерстистых мамонтов, которая ранее считалась характерной только для Европы (Maschenko et al., 2017). Мамонты Южной Сибири остаются недостаточно изученными на молекулярно-генетическом уровне, хотя эти данные важны для оценки особенностей локального генетического разнообразия мамонтов и специфики эволюции их региональных популяций. С целью восполнить этот пробел нами проведено изучение древней ДНК шерстистых мамонтов Минусинской котловины.



Работа с древней ДНК затруднена из-за ее низкого содержания, деградации и химических изменений, а также из-за возможной контаминации образцов микроорганизмами (Pääbo et al., 2004; Brotherton et al., 2007; Carpenter et al., 2013). Одним из ключевых подходов для преодоления этих затруднений является обогащение геномных библиотек целевыми ДНК-фрагментами.

Метод гибридизационного захвата обладает рядом преимуществ по сравнению с ПЦР (Meuer, Kircher, 2010; Horn, 2012). Процесс гибридизационного захвата включает подготовку геномной библиотеки и целевых ДНК-фрагментов, их соединение через гибридизацию и последующее разделение с использованием магнитных частиц. Методы гибридизационного захвата, такие как захват с удлинением праймера или мультиплексный захват целевых фрагментов, демонстрировали свою быстроту и эффективность (Briggs et al., 2009; Maricic et al., 2010).

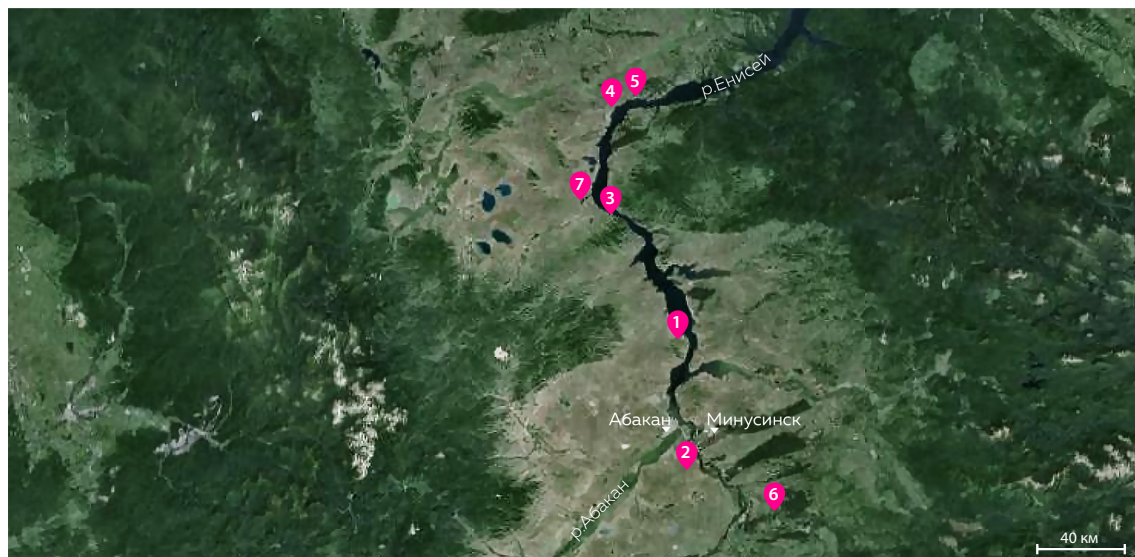
В нашем исследовании мы используем метод обогащения, предложенный в работе (Maricic et al., 2010), с двумя

раундами гибридизации, который, как уже многократно показано (Reich et al., 2010; Dabney et al., 2013; Thalmann et al., 2013; Vorobieva et al., 2020; Kusliy et al., 2021), является высокоэффективным подходом для анализа полного митохондриального генома в древних образцах.

### Материалы и методы

Материал для исследования был собран Д.Г. Маликовым в ходе экспедиционных работ 2011–2021 гг., а также частично получен в фондах Зоологического музея Хакасского государственного университета им. Н.Ф. Катанова и Хакасского национального краеведческого музея им. Л.Р. Кызласова. Костные остатки территориально охватывают все части Минусинской котловины (рис. 1) и происходят из шести местонахождений различного геологического возраста (см. таблицу).

Для всех образцов, за исключением МАМ3, были получены <sup>14</sup>C датировки, ранее опубликованные в обобщающей сводке (Маликов и др., 2023). Датирование про-



**Рис. 1.** Карта местонахождений остатков шерстистых мамонтов (*Mammuthus primigenius*) из Минусинской котловины. Местонахождения (красные кружки) отмечены цифрами, которые соответствуют номерам в таблице (Маликов и др., 2023).

#### Информация по костному материалу

Номер п/п	Место-нахождение	Географические координаты		Возраст, лет			Тип костного материала	Название образца	
		с. ш.	в. д.	<sup>14</sup> C	Лаб. шифр	Cal BP median			Cal BP 95.4 %
1	Саргов улус	54.110567	91.463749	14220 ± 160	СОАН-9890	17306	17866–16920	Scapula	MAM1
2	Изых	53.569545	91.491608	17955 ± 280	СОАН-9783	21777	22395–21005	Tusk	MAM2
3	Первомайское	54.614021	90.947409	*	*		25020–21800	Cranium	MAM3
4	Новосёлово аллювиальное	55.041728	91.024450	16710 ± 110	СОАН-9549	20200	20465–19910	Pelvis	MAM4
5				20490 ± 170	СОАН-9550	24659	25125–24201	Scapula	MAM5
6	Оя	53.395078	92.073517	27505 ± 240	СОАН-9548	31465	31881–31121	Humerus	MAM6
7	Чернусов лог	54.673669	90.757873	16760 ± 135	СОАН-9673	20256	20551–19893	Costa	MAM7

\* Данные получены по другим образцам из коллекции.

водилось в лаборатории геологии кайнозоя, палеоклиматологии и минералогических индикаторов климата Института геологии и минералогии им. В.С. Соболева СО РАН бензолно-сцинтилляционным методом. Возраст образца МАМЗ из местонахождения Первомайское определен исходя из  $^{14}\text{C}$  датировок, полученных по другим остаткам *M. primigenius* из этого местонахождения, имевшим аналогичную сохранность костного материала. Для радиоуглеродного датирования и выделения ДНК использовались различные части одних и тех же костных остатков, которые не подвергались предварительной обработке химическими реактивами.

Выделение древней ДНК из костного порошка осуществляли по протоколу, описанному в статье (Yang et al., 1996): соблюдая все критерии чистоты и аутентичности полученных образцов ДНК (Gilbert et al., 2007). В рамках настоящей работы с использованием набора TruSeq Nano Library Prep (Illumina) по протоколу производителя были получены митогеномные библиотеки для высокопроизводительного секвенирования семи шерстистых мамонтов из Минусинской котловины (Южная Сибирь) возрастом 17–30 тыс. лет. Для этих библиотек мы провели двухраундовое обогащение с помощью гибридизации с биотинилированными фрагментами современной митохондриальной ДНК *Elephas maximus* L., 1758, иммобилизованной на Dynabeads® Streptavidin магнитных частицах (Life Technologies, США), что позволяет значительно увеличить долю эндогенной митохондриальной древней ДНК.

## Результаты

Характеристики изученных нами семи последовательностей митогеномов позднплейстоценовых шерстистых мамонтов Минусинской котловины представлены в сводной таблице ([https://docs.google.com/spreadsheets/d/1XaSB-cb14rxNy0aas5xDLUil\\_YiKeBSy\\_Kwe1Rt2KQ/edit?usp=sharing](https://docs.google.com/spreadsheets/d/1XaSB-cb14rxNy0aas5xDLUil_YiKeBSy_Kwe1Rt2KQ/edit?usp=sharing)). Средняя глубина покрытия охарактеризованных митогеномов варьирует от 0.5 до 15.5 раза, ширина покрытия составляет от 38 до 99.5% от длины референсного митогенома. Среднее содержание уникальных картированных объединенных прочтений к общему количеству объединенных прочтений составляет 7.9%. Исходя из полученных нами значений частоты дезаминирования оснований и среднего размера фрагментов ДНК можно заключить, что костные образцы мамонтов из Минусинской котловины имеют высокую степень сохранности ДНК, что, скорее всего, связано с относительно хорошими для сохранности ДНК условиями окружающей среды.

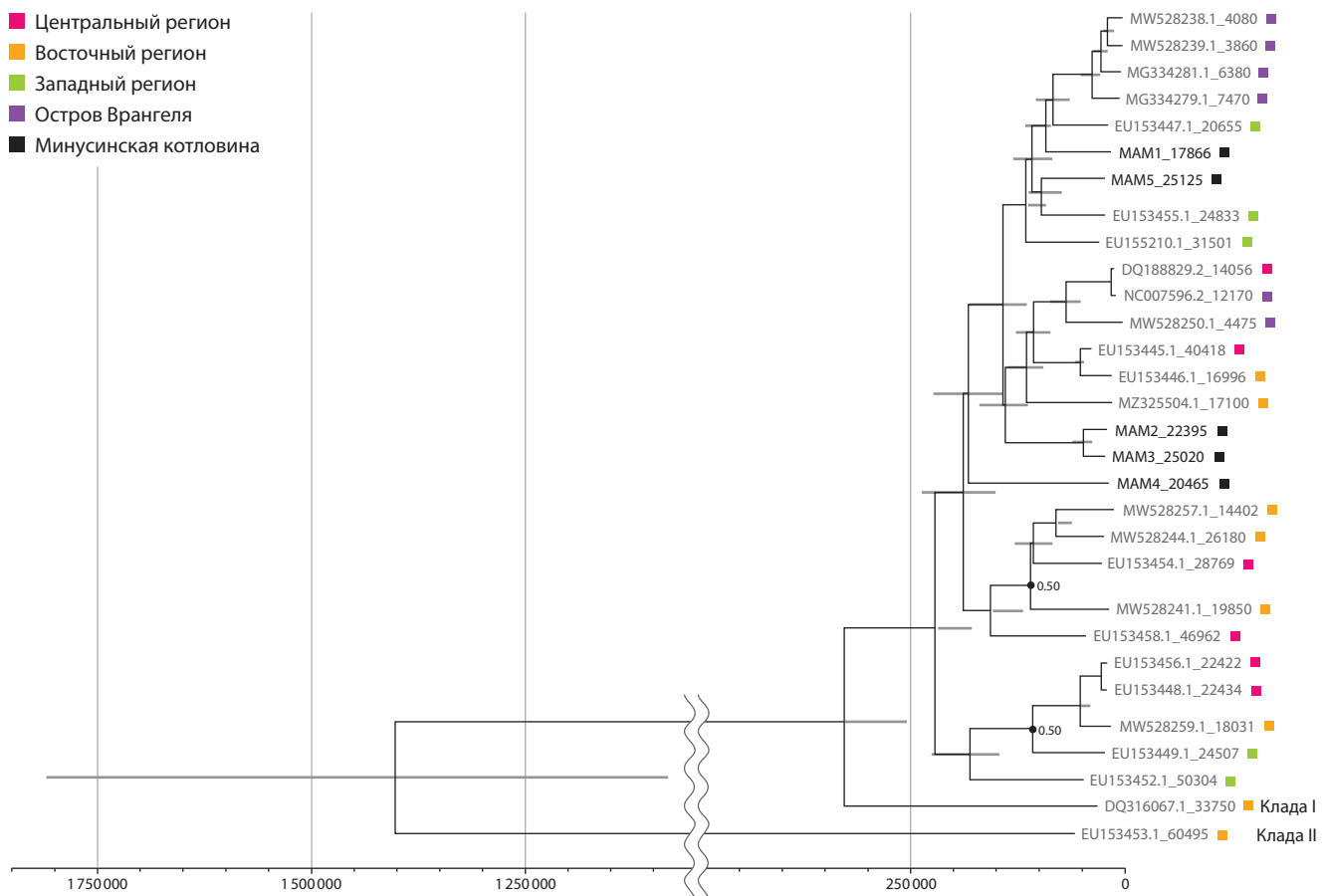
Для построения филогенетического дерева с определенным временем дивергенции генетических линий (рис. 2) использовались только образцы с достаточной шириной (более 70%) и глубиной покрытия митогенома (более 2), имеющие датировку радиоуглеродным методом. Этим критериям отвечали пять из семи образцов. Те же критерии отбора применялись для включения в анализ опубликованных ранее последовательностей митогеномов шерстистых мамонтов. Анализ проводился при помощи программной платформы BEAST на основе топологии построенного дерева с неопределенным временем расхождения генетических линий.

Дивергенция генетических линий мамонтов Минусинской котловины и наиболее генетически сходных с ними мамонтов из других регионов Восточной Сибири произошла во временном интервале от 150 до 100 тыс. лет назад. Шерстистые мамонты из Минусинской котловины образуют сестринские клады с шерстистыми мамонтами из других представленных регионов Сибири (остров Врангеля, Центральный, Западный и Восточный регионы), что отличает их от некоторых других локальных групп мамонтов, таких как мамонты острова Врангеля, находившихся в стадии сниженного генетического разнообразия.

## Обсуждение

Данное исследование позволяет оценить митохондриальное генетическое разнообразие шерстистых мамонтов на территории Минусинской котловины. По полученной филогенетической реконструкции видно, что расхождение двух клад шерстистых мамонтов произошло 1–2 млн лет назад, что соотносится с результатами исследований полных митохондриальных и ядерных геномов мамонтов, описанных во введении (Gilbert et al., 2007; Miller et al., 2008). Дивергенция генетических линий мамонтов из Минусинской котловины и наиболее генетически близких к ним линий мамонтов других регионов Восточной Сибири происходила во временном промежутке от 150 до 100 тыс. лет назад. Структура построенного нами филогенетического дерева свидетельствует, что последовательности мтДНК шерстистых мамонтов Минусинской котловины не формируют отдельную кладу на дереве, а рассредоточены в разных кластерах клады I. При этом последовательности мтДНК мамонтов из Минусинской котловины образуют сестринские клады с последовательностями мтДНК шерстистых мамонтов других представленных регионов Сибири (острова Врангеля, Центрального, Западного и Восточного регионов), что может говорить об интенсивных миграциях мамонтов на обширных территориях Восточной Сибири в конце среднего–начале позднего плейстоцена.

Расположение митотипов позднплейстоценовых мамонтов Минусинской котловины в разных кладах внутри клады I, в отличие от голоценовых мамонтов с острова Врангеля, указывает на небольшую степень вероятности того, что в этот период они находились на грани вымирания. На данном этапе мы предполагаем два возможных объяснения такому их положению на филогенетическом дереве: 1) исследованные образцы относятся к одной (постоянно существовавшей в регионе) популяции мамонтов, которая характеризовалась высоким филогенетическим разнообразием мтДНК; 2) образцы получены от представителей разных популяций мамонтов, независимо мигрировавших через территорию Минусинской котловины на протяжении позднего плейстоцена. Мы имеем аргументы «за» и «против» каждой из версий. Так, в пользу того, что исследованные нами мамонты Минусинской котловины относятся к единой популяции, может говорить факт, что некоторые образцы из местонаждений разного геологического возраста составляют либо единые, либо близко расположенные клады (см. рис. 2), вне зависимости от их геологического возраста и места находок. Кроме того,



**Рис. 2.** Филогенетические реконструкции на основе полученных нами последовательностей мтДНК пяти шерстистых мамонтов с территории Минусинской котловины и 25 ранее опубликованных последовательностей мтДНК шерстистых мамонтов из базы данных Genbank.

Построение филогенетического дерева выполнено при помощи программной платформы BEAST с внутренней калибровкой времени расхождения ветвей на основе радиоуглеродных датировок образцов. Цвета квадратов отражают географическое происхождение образцов: Центральный регион – часть Сибири, омываемая реками Колымой и Леной; Восточный регион – часть Сибири к востоку от Колымы; Западный регион – часть Сибири к востоку от 70° в. д. и к западу от Лены; остров Врангеля – группа островов на северо-востоке Сибири. Байесовская апостериорная вероятность топологии дерева составляет более 0.75 во всех случаях, кроме тех, где это указано в виде чисел рядом с узлами. Светло-серые линии, проходящие через узлы дерева, обозначают стандартное отклонение медианных оценок времени дивергенции. В названии каждого образца после знака «\_» указана его радиоуглеродная датировка.

выявленный изотопный сигнал стабильных изотопов углерода и азота ( $\delta^{13}\text{C}$  и  $\delta^{15}\text{N}$ ) у мамонтов Минусинской котловины существенно отличается от таковых в северных популяциях вида (Маликов и др., 2023). Это позволяет предполагать относительно длительное обитание животных в этом регионе, что отразилось в их изотопных показателях.

В то же время большой разброс изученных последовательностей мамонтов на общем филогенетическом дереве может говорить и об их принадлежности к разным популяциям. В качестве подтверждения этой версии отметим, что на данный момент в рассматриваемом нами регионе нет ни одной находки мамонта, которую можно было бы с уверенностью отнести к теплому временному интервалу конца позднего плейстоцена. Возможно, в теплые интервалы позднего плейстоцена условия на юге Сибири были неблагоприятны для постоянного обитания вида *M. primigenius*. В таком случае представители вида могли неоднократно мигрировать в котловину только в холодные периоды. Кроме того, известно, что современные африканские слоны живут небольшими группами по шесть-восемь

особей, с площадью сезонного участка обитания от 130 до 1600 км<sup>2</sup> (Насимович, 1975). Однако в неблагоприятных условиях индивидуальные миграции слонов могут достигать 32 000 км<sup>2</sup> в год (Wall et al., 2013). Общая площадь Минусинского межгорного прогиба, включая Назаровскую впадину, составляет около 100 000 км<sup>2</sup> (Воронцов, 2012). Максимальная длина Минусинской котловины, в северо-западном направлении, достигает ~450 км при максимальной ширине (по Южно-Минусинской впадине) ~400 км. Следовательно, общей площади региона достаточно для обитания лишь небольшой популяции таких крупных животных, как мамонты. Это позволяет предполагать, что территория Минусинской котловины была мала для постоянного обитания популяций *M. primigenius*, поскольку ресурсная база котловины ограничена, а ежегодные сезонные миграции вида сопоставимы либо превосходят собственные размеры котловины.

Еще одним аргументом в пользу миграционной природы популяции мамонтов Минусинской котловины является тот факт, что два образца из местонахождения Новосёлово аллювиальное (MAM4 и MAM5) продемонстри-



ровали максимальное генетическое удаление (см. рис. 2). Напротив, образцы из местонахождений Первомайское (ММЗ) и Изых (ММ2) составили единую группу. Хотя местонахождения и удалены друг от друга более чем на 100 км, они датируются примерно одним временным интервалом (около 21.8 тыс. лет назад). Не исключено, что эти особи относятся к единой популяции, которая время от времени мигрировала в регион, возможно, на протяжении длительного периода.

Если верна вторая из озвученных концепций, то полученные данные можно рассматривать как подтверждение локального вымирания мамонтов Минусинской котловины на границе плейстоцена и голоцена, вероятной причиной которого стало развитие таежных и лесостепных ландшафтов в Западной и Восточной Сибири. В результате прекратились пополнение популяций травоядных млекопитающих Минусинской котловины и их сезонные миграции (Маликов, 2015).

## Заклучение

Изменение климата от позднего ледникового периода до голоцена привело к уменьшению открытых пространств в Евразии, что сократило области обитания мамонтов и других степных животных. Этот процесс включал сложные изменения климата и растительности в пространстве и времени, выживание видов в укрытиях, локальное исчезновение и временное расширение областей обитания.

Один из эффективных подходов для детальной реконструкции этих процессов – изучение локальных серий образцов митохондриальной ДНК мамонтов, относящихся к разным хронологическим периодам. Проведенное нами исследование является одним из шагов в данном направлении.

Необходимо продолжить палеонтологические и молекулярно-генетические исследования шерстистых мамонтов в изолированных регионах Сибири, чтобы полностью определить их генетическое разнообразие и причины вымирания в этом месте. Предпочтительнее изучать полные геномы, поскольку на их основе филогеографический анализ становится более точным и достоверным.

## Список литературы / References

Воронцов А.А. Закономерности формирования вулканитов Минусинской котловины в девоне (по геологическим и изотопно-геохимическим данным). В: Современные проблемы геохимии: Материалы Всерос. совещ. Иркутск, 2012;36-39 [Vorontsov A.A. Regularities of the formation of volcanics of the Minusinsk Basin in the Devonian (according to geological and isotopic-geochemical data). In: Proceedings of the All-Russia Meeting "Modern Problems of Geochemistry". Irkutsk, 2012;36-39 (in Russian)]

Маликов Д.Г. Крупные млекопитающие среднего-позднего неоплейстоцена Минусинской котловины, стратиграфическое значение и палеозоогеография: Дис. ... канд. геол.-мин. наук. Томск, 2015 [Malikov D.G. Large Mammals of the Middle-Late Neopleistocene of the Minusinsk Depression, Stratigraphic Significance and Palaeozoogeography. Cand. geol. and mineral. sci. diss. Tomsk, 2015 (in Russian)]

Маликов Д.Г., Святко С.В., Пыряев А.Н., Колобова К.А., Овчинников И.Ю., Маликова Е.Л. Новые данные по распространению и изотопная характеристика остатков мамонта *Mammuthus primigenius* (Proboscidea, Elephantidae) в позднем плейстоцене

Минусинской котловины. *Зоол. журн.* 2023;102(8):924-938. DOI 10.31857/S004451342308007X [Malikov D.G., Svyatko S.V., Pyryaev A.N., Kolobova K.A., Ovchinnikov I.Yu., Malikova E.L. New data on the distribution and isotopic characteristics of woolly mammoth remains, *Mammuthus primigenius* (Proboscidea, Elephantidae), in the Late Pleistocene of the Minusinsk Depression (South Siberia). *Zoologičeskij Žurnal = Journal of Zoology.* 2023;102(8):924-938. DOI 10.31857/S004451342308007X (in Russian)]

Насимович А.А. Африканский слон. М.: Наука, 1975 [Nasimovich A.A. African Elephant. Moscow: Nauka Publ., 1975 (in Russian)]

Barnes I., Shapiro B., Lister A., Kuznetsova T., Sher A., Guthrie D., Thomas M. Genetic structure and extinction of the woolly mammoth, *Mammuthus primigenius*. *Curr. Biol.* 2007;17(12):1072-1075. DOI 10.1016/j.cub.2007.05.035

Briggs A.W., Good J.M., Green R.E., Krause J., Maricic T., Stenzel U., Lalueza-Fox C., Rudan P., Brajkovic D., Kucan Z., Gusic I., Schmitz R., Doronichev V.B., Golovanova L.V., Rasilla M., Fortea J., Rosas A., Paabo S. Targeted retrieval and analysis of five neandertal MtDNA genomes. *Science.* 2009;325(5938):318-321. DOI 10.1126/science.1174462

Brotherton P., Endicott P., Sanchez J.J., Beaumont M., Barnett R., Austin J., Cooper A. Novel high-resolution characterization of ancient DNA reveals C > U-type base modification events as the sole cause of *post mortem* miscoding lesions. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(17):5717-5128. DOI 10.1093/nar/gkm588

Capelli C., MacPhee R.D.E., Roca A.L., Brisighelli F., Georgiadis N., O'Brien S.J., Greenwood A.D. A nuclear DNA phylogeny of the woolly mammoth (*Mammuthus primigenius*). *Mol. Phylog. Evol.* 2006;40(2):620-627. DOI 10.1016/j.ympev.2006.03.015

Carpenter M.L., Buenrostro J.D., Valdiosera C., Schroeder H., Allentoft M.E., Sikora M., Rasmussen M., Gravel S., Guillén S., Nekhrizov G., Leshtakov K., Dimitrova D., Theodossiev N., Pettener D., Luiselli D., Sandoval K., Moreno-Estrada A., Li Y., Wang J., Gilbert M.T.P., Willerslev E., Greenleaf W.J., Bustamante C.D. Pulling out the 1 %: whole-genome capture for the targeted enrichment of ancient DNA sequencing libraries. *Am. J. Hum. Genet.* 2013;93(5):852-864. DOI 10.1016/j.ajhg.2013.10.002

Dabney J., Knapp M., Glocke I., Gansauge M.T., Weihmann A., Nickel B., Valdiosera C., Garcia N., Paabo S., Arsuaga J.L., Meyer M. Complete mitochondrial genome sequence of a middle pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013;110(39):15758-15763. DOI 10.1073/pnas.1314445110

Debruyne R., Chu G., King C.E., Bos K., Kuch M., Schwarz C., Szpak P., Gröcke D.R., Matheus P., Zazula G., Guthrie D., Froese D., Buigues B., Marliave C., Flemming C., Poinar D., Fisher D., Southon J., Tikhonov A.N., MacPhee R.D.E., Poinar H.N. Out of America: ancient DNA evidence for a new world origin of late quaternary woolly mammoths. *Curr. Biol.* 2008;18(17):1320-1326. DOI 10.1016/j.cub.2008.07.061

Gilbert M.T.P., Tomsho L.P., Rendulic S., Packard M., Drautz D.I., Sher A., Tikhonov A., Dalen L., Kuznetsova T., Kosintsev P., Campos P.F., Higham T., Collins M.J., Wilson A.S., Shidlovskiy F., Buigues B., Ericson P.G.P., Germonpre M., Gotherstrom A., Iacumin P., Nikolaev V., Nowak-Kemp M., Willerslev E., Knight J.R., Irzyk G.P., Perbost C.S., Fredrikson K.M., Harkins T.T., Sheridan S., Miller W., Schuster S.C. Whole-genome shotgun sequencing of mitochondria from ancient hair shafts. *Science.* 2007;317(5846):1927-1930. DOI 10.1126/science.1146971

Greenwood A.D., Capelli C., Possnert G., Paabo S. Nuclear DNA sequences from late Pleistocene megafauna. *Mol. Biol. Evol.* 1999;16(11):1466-1473. DOI 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026058

Horn S. Target enrichment via DNA hybridization capture. In: Shapiro B., Hofreiter M. (Eds.) Ancient DNA. Methods in molecular biology. Vol. 840. Humana Press, 2012;177-188. DOI 10.1007/978-1-61779-516-9\_21

- Krause J., Dear P.H., Pollack J.L., Slatkin M., Spriggs H., Barnes I., Lister A.M., Ebersberger I., Pääbo S., Hofreiter M. Multiplex amplification of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of elephantidae. *Nature*. 2006;439(7077):724-727. DOI 10.1038/nature04432
- Kusliy M.A., Vorobieva N.V., Tishkin A.A., Makunin A.I., Druzhkova A.S., Trifonov V.A., Iderkhangai T.O., Graphodatsky A.S. Traces of Late Bronze and Early Iron age Mongolian horse mitochondrial lineages in modern populations. *Genes*. 2021;12(3):412. DOI 10.3390/genes12030412
- Maricic T., Whitten M., Pääbo S. Multiplexed DNA sequence capture of mitochondrial genomes using PCR products. *PLoS One*. 2010; 5(11):e14004. DOI 10.1371/journal.pone.0014004
- Maschenko E.N., Potapova O.R., Vershinina A., Shapiro B., Streletskaya I.D., Vasiliev A.A., Oblogov G.E., Kharlamova A.S., Potapov E., Plicht J., Tikhonov A.N., Serdyuk N.V., Tarasenko K.K. The Zhenya mammoth (*Mammuthus primigenius* (Blum.)): taphonomy, geology, age, morphology and ancient DNA of a 48,000 year old frozen mummy from western Taimyr, Russia. *Quat. Int.* 2007;445: 104-134. DOI 10.1016/j.quaint.2017.06.055
- Meyer M., Kircher M. Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2010;2010(6):pdb.prot5448-pdb.prot5448
- Miller W., Drautz D.I., Ratan A., Pusey B., Qi J., Lesk A.M., Tomsho L.P., Packard M.D., Zhao F., Sher A., Tikhonov A., Raney B., Patterson N., Lindblad-Toh K., Lander E.S., Knight J.R., Irzyk G.P., Fredrikson K.M., Harkins T.T., Sheridan S., Pringle T., Schuster S.C. Sequencing the nuclear genome of the extinct woolly mammoth. *Nature*. 2008;456(7220):387-390. DOI 10.1101/pdb.prot5448
- Pääbo S., Poinar H., Serre D., Jaenicke-Despres V., Hebler J., Rohland N., Kuch M., Krause J., Vigilant L., Hofreiter M. Genetic analyses from ancient DNA. *Annu. Rev. Genet.* 2004;38:645-679. DOI 10.1146/annurev.genet.37.110801.143214
- Palkopoulou E., Mallick S., Skoglund P., Enk J., Rohland N., Li H., Omrak A., Vartanyan S., Poinar H., Götherström A., Reich D., Dalén L. Complete genomes reveal signatures of demographic and genetic declines in the woolly mammoth. *Curr. Biol.* 2015;25(10): 1395-1400. DOI 10.1016/j.cub.2015.04.007
- Payne J.L., Finnegan S. The effect of geographic range on extinction risk during background and mass extinction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007;104(25):10506-10511. DOI 10.1073/pnas.0701257104
- Poinar H.N., Schwarz C., Qi J., Shapiro B., MacPhee R.D.E., Buigues B., Tikhonov A., Huson D.H., Tomsho L.P., Auch A., Rapp M., Miller W., Schuster S.C. Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA. *Science*. 2006;311(5759):392-394. DOI 10.1126/science.1123360
- Reich D., Green R.E., Kircher M., Krause J., Patterson N., Durand E.Y., Viola B., Briggs A.W., Stenzel U., Johnson P.L.F., Maricic T., Good J.M., Marques-Bonet T., Alkan C., Fu Q., Mallick S., Li H., Meyer M., Eichler E.E., Stoneking M., Richards M., Talamo S., Shunkov M.V., Derevianko A.P., Hublin J.J., Kelso J., Slatkin M., Pääbo S. Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. *Nature*. 2010;468(7327):1053-1060. DOI 10.1038/nature09710
- Rogaev E.I., Moliaka Y.K., Malyarchuk B.A., Kondrashov F.A., Derenko M.V., Chumakov I., Grigorenko A.P. Complete mitochondrial genome and phylogeny of pleistocene mammoth *Mammuthus primigenius*. *PLoS Biol.* 2006;4(3):e73. DOI 10.1371/journal.pbio.0040073
- Thalmann O., Shapiro B., Cui P., Schuenemann V.J., Sawyer S.K., Greenfield D.L., Germonpré M.B., Sablin M.V., López-Giráldez F., Domingo-Roura X., Napierala H., Uerpmann H.P., Loponte D.M., Acosta A.A., Giemsch L., Schmitz R.W., Worthington B., Buikstra J.E., Druzhkova A.S., Graphodatsky A.S., Ovodov N.D., Wahlberg N., Freedman A.H., Schweizer R.M., Koepfli K.P., Leonard J.A., Meyer M., Krause J., Pääbo S., Green R.E., Wayne R.K. Complete mitochondrial genomes of ancient canids suggest a European origin of domestic dogs. *Science*. 2013;342(6160):871-874. DOI 10.1126/science.1243650
- Van der Valk T., Pečnerová P., Diez-del-Molino D., Bergström A., Oppenheimer J., Hartmann S., Xenikoudakis G., Thomas J.A., Dehasque M., Sağlıcan E., Fidan F.R., Barnes I., Liu S., Somel M., Heintzman P.D., Nikolskiy P., Shapiro B., Skoglund P., Hofreiter M., Lister A.M., Götherström A., Dalén L. Million-year-old DNA sheds light on the genomic history of mammoths. *Nature*. 2021; 591(7849):265-269. DOI 10.1038/s41586-021-03224-9
- Vorobieva N.V., Makunin A.I., Druzhkova A.S., Kusliy M.A., Trifonov V.A., Popova K.O., Polosmak N.V., Molodin V.I., Vasiliev S.K., Shunkov M.V., Graphodatsky A.S. High genetic diversity of ancient horses from the Ukok Plateau. *Plos One*. 2020;15(11):e0241997. DOI 10.1371/journal.pone.0241997
- Wall J., Wittemyer G., Klinkenberg B., LeMay V., Douglas-Hamilton I. Characterizing properties and drivers of long distance movements by elephants (*Loxodonta africana*) in the Gourma, Mali. *Biol. Conserv.* 2013;157:60-68. DOI 10.1016/j.biocon.2012.07.019
- Yang H., Golenberg E.M., Shoshani J. Phylogenetic resolution within the Elephantidae using fossil DNA sequence from the American mastodon (*Mammuthus americanum*) as an outgroup. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996;93(3):1190-1194. DOI 10.1073/pnas.93.3.1190

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

Поступила в редакцию 06.12.2023. После доработки 12.04.2024. Принята к публикации 13.05.2024.

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:

русскаяязычная версия – на сайте <https://vavilovj-icg.ru/>

и платформе Научной электронной библиотеки, [elibrary.ru/title\\_about.asp?id=32440](http://elibrary.ru/title_about.asp?id=32440)

англоязычная версия – на сайте [vavilov.elpub.ru/index.php/jour](http://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](mailto: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.

Дата публикации 30.08.2024. Формат 60 × 84 1/8. Уч.-изд. л. 16.2.



