

ВАВИЛОВСКИЙ

ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

2025 • 29 • 4

Молекулярная и клеточная биология / Генетика растений / Иммунология и продуктивность растений /
Популяционная генетика / Генетика микроорганизмов / Биоинформатика и системная биология



CELL TECHNOLOGIES
REGENERATIVE MEDICINE
INTELLIGENT DATA SCIENCE
SYNTHETIC BIOLOGY
POSTGENOME
RESearch & DEVELOPMENT



КОНГРЕСС CRISPR-2025

5–10 октября
2025 года

Уважаемые коллеги!

Продолжается регистрация для участия в Третьем международном конгрессе “CRISPR-2025”, который состоится с 5 по 10 октября 2025 г. в Ереване (Армения).

Стремительно совершенствующиеся методы геномного редактирования, в том числе в области клинического применения CRISPR-систем, требуют всестороннего осмысления с учетом различных областей знаний.

В связи с этим мы предлагаем широкий спектр направлений, которые будут обсуждаться на конгрессе “CRISPR-2025”:

- Cell Technologies
- Regenerative Medicine
- Intelligent Data Science
- Synthetic Biology
- Postgenome
- Research & Development.

В программе конгресса

- пленарные и секционные выступления
- конкурс молодых ученых
- конкурс постерных докладов
- панельная дискуссия «От предсказания лекарств с помощью искусственного интеллекта, точного редактирования генома до клеточной и генной терапии».

Приглашаем постоянных и новых участников: ученых, врачей, студентов и представителей бизнеса!

Информационный сайт конгресса: <https://crispr2025.rau.am/>

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-25-51***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, профессор РАН (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 – д-р биол. наук, доцент (Россия)

Л.И. Афтанас – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)

Л.А. Беспалова – академик РАН, д-р с.-х. наук (Россия)

А. Бёрнер – д-р наук (Германия)

Н.П. Бондарь – канд. биол. наук (Россия)

С.А. Боринская – д-р биол. наук (Россия)

П.М. Бородин – д-р биол. наук, проф. (Россия)

А.В. Васильев – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

М.И. Воевода – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)

Т.А. Гавриленко – д-р биол. наук (Россия)

И. Гроссе – д-р наук, проф. (Германия)

Н.Е. Грунтенко – д-р биол. наук (Россия)

С.А. Демаков – д-р биол. наук (Россия)

И.К. Захаров – д-р биол. наук, проф. (Россия)

И.А. Захаров-Гезехус – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

С.Г. Инге-Вечтомов – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

А.В. Кильчевский – чл.-кор. НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)

С.В. Костров – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)

А.М. Кудрявцев – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

И.Н. Лаврик – д-р биол. наук (Германия)

Д.М. Ларкин – канд. биол. наук (Великобритания)

Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция)

И.Н. Лебедев – чл.-кор. РАН, 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 – чл.-кор. РАН, 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 – чл.-кор. РАН, 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**Publication frequency: 8 issues a year*

doi 10.18699/vjgb-25-51

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), Professor of the RAS, Russia

Deputy Editor-in-Chief

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

I.N. Leonova, Dr. Sci. (Biology), Russia

N.B. Rubtsov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

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

Executive Secretary

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

Editorial board

O.S. Afanasenko, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

D.A. Afonnikov, Associate Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

L.I. Aftanas, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

E.E. Andronov, Cand. Sci. (Biology), Russia

Yu.S. Aulchenko, Dr. Sci. (Biology), Russia

L.A. Bespalova, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Agricul.), Russia

N.P. Bondar, Cand. Sci. (Biology), Russia

S.A. Borinskaya, Dr. Sci. (Biology), Russia

P.M. Borodin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

A. Börner, Dr. Sci., Germany

M. Chen, Dr. Sci. (Biology), People's Republic of China

S.A. Demakov, Dr. Sci. (Biology), Russia

T.A. Gavrilenko, Dr. Sci. (Biology), Russia

I. Grosse, Professor, Dr. Sci., Germany

N.E. Gruntenko, Dr. Sci. (Biology), Russia

S.G. Inge-Vechtomov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

E.K. Khlestkina, Corr. Member of the RAS, 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, Corr. Member of the RAS, 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),
RussiaD.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, Corr. Member of the RAS, 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.), BelarusS.V. Shestakov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
RussiaV.A. Stepanov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
RussiaI.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),
RussiaN.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

- 479 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Концепция природной реконструкции генома. Часть 3. Анализ изменения количества теломерной ДНК в клетках колоний как нового амплифицированного признака, возникшего при обработке гемопоэтических стволовых клеток костного мозга. В.С. Рузанова, С.Г. Ошихмина, Г.С. Риттер, Е.В. Долгова, С.С. Кирикович, Е.В. Левитес, Я.Р. Ефремов, Т.В. Карамышева, А.Г. Богомолов, М.И. Мещанинова, А.Л. Мамаев, О.С. Таранов, С.В. Сидоров, С.Д. Никонов, О.Ю. Леплина, А.А. Останин, Е.Р. Черных, Н.А. Колчанов, А.С. Проскурина, С.С. Богачев
- 496 **ОБЗОР**
Неклассические модели животных для изучения роли теломер в процессах старения и долголетия. Е.В. Симороз, Е. Василевская, Н.А. Аракелян, А.Д. Манахов, Е.И. Рогачев

Генетика растений

- 508 **ОБЗОР**
Особенности генетического картирования локусов, влияющих на образование эмбрионного каллуса и регенерацию растений *in vitro* у зерновых и бобовых культур. Е.К. Потокина, А.С. Сущенко
- 517 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Оптимизация этапов технологии получения ДН-растений капусты белокочанной. А.И. Минейкина, К.С. Стебницкая, М.Г. Фомичева, Л.Л. Бондарева, А.С. Домблидес, Е.А. Домблидес

Иммунитет и продуктивность растений

- 530 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Устойчивость к засухе фотосинтетического аппарата линий пшеницы *Triticum aestivum* L. с интрогрессиями от *Aegilops tauschii* Coss. в хромосоме 2D. С.В. Осипова, А.В. Пермяков, А.В. Рудиковский, Е.Г. Рудиковская, Т.А. Пшеничникова
- 539 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Цитофизиологические проявления защитных реакций пшеницы от стеблевой ржавчины, индуцируемые биофунгицидом Новохизолем. А.Б. Щербань, Л.Я. Плотникова, В.В. Кнауф, Е.С. Сколотнева, В.В. Фоменко

549

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Рецепторподобные киназы с лейцин-богатыми повторами подсемейства III участвуют в распознавании *Pectobacterium* spp. растениями семейства Solanaceae. Е.В. Шруб, А.В. Колубако, П.В. Вычик, О.А. Бадалян, Е.А. Николайчик

559

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Влияние отобранного подвоя на параметры роста, накопление ИУК и витаминов в привоях *Cucumis sativus* L. и *Cucumis melo* L. А.Ж. Шойбекова, С.К. Джантасов, А.С. Джантасова, А.Т. Саматов, Т.С. Сагындыков, А.Н. Каримова, Г.А. Серикбаева, М.Р. Тойшиманов, Г.Т. Бари (на англ. языке)

Популяционная генетика

- 568 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Данные митохондриальной ДНК позволяют выделить субпопуляции широкоареального вида журавлей красавки (*Anthropoides virgo*). Е.А. Мудрик, Е.И. Ильяшенко, П.А. Казимиров, К.Д. Кондракова, Т.П. Арчимаева, Л.Д. Базаров, О.А. Горошко, Ц.З. Доржиев, А.Н. Куксин, К.А. Постельных, В.В. Шуркина, В.Ю. Ильяшенко, А.В. Шатохина, Д.В. Политов

578

ОБЗОР

Генетическая изменчивость и филогеография сорок рода *Pica* Голарктики. А.П. Крюков

Генетика микроорганизмов

- 594 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Генетический потенциал к образованию биопленок клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa*. У.М. Немченко, Н.Л. Белькова, Е.С. Клименко, Н.Е. Смурова, Р.Е. Зугеева, В.В. Синьков, Е.Д. Савилов
- 600 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
ЕпV-псевдовirus на основе генетического варианта, циркулирующего на территории Сибири. Н.Б. Рудометова, А.А. Фандо, Д.Н. Щербаков, Б.Н. Зайцев, А.П. Рудометов, Л.И. Карпенко

Биоинформатика и системная биология

- 608 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Определение числа соприкасающихся зерен пшеницы на изображениях на основе эллиптической аппроксимации. Д.Р. Авзалов, Е.Г. Комышев, Д.А. Афонников

Molecular and cell biology

- 479 **ORIGINAL ARTICLE**
Concept of natural genome reconstruction. Part 3. Analysis of changes in the amount of telomeric DNA in colony cells as a new amplified feature that arose during the processing of hematopoietic bone marrow stem cells. V.S. Ruzanova, S.G. Oshikhmina, G.S. Ritter, E.V. Dolgova, S.S. Kirikovich, E.V. Levites, Y.R. Efremov, T.V. Karamysheva, A.G. Bogomolov, M.I. Meschaninova, A.L. Mamaev, O.S. Taranov, S.V. Sidorov, S.D. Nikonov, O.Y. Leplina, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh, N.A. Kolchanov, A.S. Proskurina, S.S. Bogachev

- 496 **REVIEW**
Unconventional animal models to study the role of telomeres in aging and longevity. E.V. Simoroz, J. Vasilevska, N.A. Arakelyan, A.D. Manakhov, E.I. Rogaev

Plant genetics

- 508 **REVIEW**
Genetic mapping of loci affecting embryogenic callus formation and *in vitro* regeneration in cereals and leguminous crops. E.K. Potokina, A.S. Sushchenko
- 517 **ORIGINAL ARTICLE**
Optimization of technology steps for obtaining white cabbage DH-plants. A.I. Mineykina, K.S. Stebnitskaia, M.G. Fomicheva, L.L. Bondareva, A.S. Domblides, E.A. Domblides

Plant immunity and performance

- 530 **ORIGINAL ARTICLE**
Drought tolerance of the photosynthetic apparatus of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) lines with introgressions in chromosome 2D from *Aegilops tauschii* Coss. S.V. Osipova, A.V. Permyakov, A.V. Rudikovskii, E.G. Rudikovskaya, T.A. Pshenichnikova
- 539 **ORIGINAL ARTICLE**
Cytophysiological manifestations of wheat's defense reactions against stem rust induced by the biofungicide Novochizol. A.B. Shcherban, L.Ya. Plotnikova, V.V. Knaub, E.S. Skolotneva, V.V. Fomenko

- 549 **ORIGINAL ARTICLE**
Receptor-like leucine-rich repeat kinases of subfamily III are involved in the recognition of *Pectobacterium* spp. by Solanaceae plants. E.V. Shrub, N.V. Kalubaka, P.V. Vychyk, O.A. Badalyan, Y.A. Nikolaichik

- 559 **ORIGINAL ARTICLE**
Influence of selected rootstock on growth parameters, accumulation of IAA and vitamins in scions of *Cucumis sativus* L. and *Cucumis melo* L. A.Zh. Shoibekova, S.K. Jantassov, A.S. Jantassova, A.T. Samatov, T.S. Sagindykov, A.N. Karimova, G.A. Serikbayeva, M.R. Toishimanov, G.T. Bari

Population genetics

- 568 **ORIGINAL ARTICLE**
Mitochondrial DNA data allow distinguishing the subpopulations in the widespread Demoiselle crane (*Anthropoides virgo*). E.A. Mudrik, E.I. Ilyashenko, P.A. Kazimirov, K.D. Kondrakova, T.P. Archimaeva, L.D. Bazarov, O.A. Goroshko, Ts.Z. Dorzhiev, A.N. Kuksin, K.A. Postelnikh, V.V. Shurkina, V.Yu. Ilyashenko, A.V. Shatokhina, D.V. Politov
- 578 **REVIEW**
Genetic variation and phylogeography of the magpie's genus *Pica* in the Holarctic. A.P. Kryukov

Microbial genetics

- 594 **ORIGINAL ARTICLE**
Genetic potential for biofilm formation of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. U.M. Nemchenko, N.L. Belkova, E.S. Klimenko, N.E. Smurova, R.E. Zugeeva, V.V. Sinkov, E.D. Savilov
- 600 **ORIGINAL ARTICLE**
Env-pseudoviruses based on the HIV-1 genetic variant circulating in Siberia. N.B. Rudometova, A.A. Fando, D.N. Shcherbakov, B.N. Zaitsev, A.P. Rudometov, L.I. Karpenko

Bioinformatics and systems biology

- 608 **ORIGINAL ARTICLE**
Counting touching wheat grains in images based on elliptical approximation. D.R. Avzalov, E.G. Komyshev, D.A. Afonnikov

doi 10.18699/vjgb-25-52

Концепция природной реконструкции генома. Часть 3. Анализ изменения количества теломерной ДНК в клетках колоний как нового амплифицированного признака, возникшего при обработке гемопоэтических стволовых клеток костного мозга

В.С. Рузанова , С.Г. Ошихмина , Г.С. Риттер , Е.В. Долгова , С.С. Кирикович , Е.В. Левитес ,
Я.Р. Ефремов , Т.В. Карамышева¹, А.Г. Богомолов , М.И. Мещанинова , А.А. Мамаев⁴, О.С. Таранов ,
С.В. Сидоров^{2, 6}, С.Д. Никонов⁷, О.Ю. Леплина , А.А. Останин , Е.Р. Черных , Н.А. Колчанов ,
А.С. Проскурина , С.С. Богачев  

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁴ ООО «Лаборатория Ангиофарм», Новосибирск, Россия

⁵ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

⁶ Городская клиническая больница № 1, Новосибирск, Россия

⁷ Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза, Новосибирск, Россия

⁸ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

 labmolbiol@mail.ru

Аннотация. Индуцированная «рекомбиногенная ситуация» в гемопоэтических стволовых клетках и активация репаративных систем клетки создают основу для рекомбинационных событий между доставленными в клетку фрагментами экстраклеточной двуцепочечной ДНК и ДНК хромосом или иных форм репаративно-рекомбинационного процесса. На модельных организмах мыши и крысы, а также с использованием в качестве исходного материала клеток костного мозга человека было оценено изменение количества теломерной ДНК в гемопоэтических стволовых клетках как показатель произошедших репарационно-рекомбинационных событий. Во всех проведенных экспериментах в качестве фактора сравнения использовался ангиогенин рекомбинантного человеческого. Методом дот-блот гибридизации показано, что в клетках колоний, полученных из клеток костного мозга модельных организмов, а также из клеток образцов костного мозга человека, обработанных препаратом двуцепочечной ДНК, произошло достоверное увеличение количества теломерной ДНК. Амплификация теломерной ДНК в клетках колоний не связана с контаминацией препаратом исходной ДНК, которым обрабатывались клетки костного мозга. Обработка клеток костного мозга ДНК, не несущей теломерных последовательностей (*AluI* ПЦР-фрагмент), не приводит к увеличению количества теломерной ДНК в клетках выросших колоний. Это предполагает участие в амплификации теломерной ДНК экстрахромосомальной ДНК-матрицы, несущей ДНК теломер. Установлено, что обработка клеток костного мозга ангиогенином также сопровождается увеличением теломерной ДНК в клетках колоний. Сопоставление типа колоний с интенсивностью гибридизации (т.е. количества теломерной ДНК в образце) предполагало, что увеличение количества детектируемой теломерной ДНК при обработке ангиогенином и hDNA⁹⁷ имеет принципиально разное происхождение. Вестерн-блот анализом и методом ПЦР в реальном времени установлено, что увеличение количества теломерной ДНК при обработке клеток костного мозга препаратом двуцепочечной ДНК не коррелирует с активностью эндогенной/экзогенной теломеразы. Для ангиогенина показано, что увеличение количества теломерной ДНК может быть результатом активации эндогенной теломеразной активности. Разработан принцип амплификации нового генетического признака, пришедшего в гемопоэтические стволовые клетки с экстраклеточным двуцепочечным ДНК материалом и закрепившимся в реципиентном геноме или транзитно присутствующим в клетке в качестве новой генетической информации.

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые клетки; дот-блот гибридизация; теломерная ДНК; ангиогенин; рекомбиногенная ситуация

Для цитирования: Рузанова В.С., Ошихмина С.Г., Риттер Г.С., Долгова Е.В., Кирикович С.С., Левитес Е.В., Ефремов Я.Р., Карамышева Т.В., Богомолов А.Г., Мещанинова М.И., Мамаев А.А., Таранов О.С., Сидоров С.В., Никонов С.Д., Леплина О.Ю., Останин А.А., Черных Е.Р., Колчанов Н.А., Проскурина А.С., Богачев С.С. Концепция природной реконструкции генома. Часть 3. Анализ изменения количества теломерной ДНК в клетках колоний как нового амплифицированного признака, возникшего при обработке гемопоэтических стволовых клеток костного мозга. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(4):479-495. doi 10.18699/vjgb-25-52

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в Институте цитологии и генетики СО РАН (государственный бюджетный проект № FWNR-2022-0016) и при поддержке А.А. Пуртова, И.Н. Зайцевой и ООО «ЭСЛАБ ДИАГНОСТИК».

Concept of natural genome reconstruction.

Part 3. Analysis of changes in the amount of telomeric DNA in colony cells as a new amplified feature that arose during the processing of hematopoietic bone marrow stem cells

V.S. Ruzanova ^{1#}, S.G. Oshikhmina ^{1, 2#}, G.S. Ritter ¹, E.V. Dolgova ¹, S.S. Kirikovich ¹, E.V. Levites ¹, Y.R. Efremov ¹, T.V. Karamysheva¹, A.G. Bogomolov ¹, M.I. Meschaninova ³, A.L. Mamaev⁴, O.S. Taranov ⁵, S.V. Sidorov^{2, 6}, S.D. Nikonov⁷, O.Y. Leplina ⁸, A.A. Ostanin ⁸, E.R. Chernykh ⁸, N.A. Kolchanov ¹, A.S. Proskurina ^{1#}, S.S. Bogachev ^{1#} 

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

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

⁴ Laboratory Angiopharm LLC, Novosibirsk, Russia

⁵ State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

⁶ City Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russia

⁷ Novosibirsk Tuberculosis Research Institute, Novosibirsk, Russia

⁸ Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

 labmolbiol@mail.ru

Abstract. The induced "recombinogenic situation" in hematopoietic stem cells and the activation of the cell's reparative systems create the basis for recombination events between fragments of extracellular double-stranded DNA delivered into the cell and chromosomal DNA or other forms of the reparative-recombination process. In mouse and rat model organisms as well as in human bone marrow cells, changes in the amount of telomeric DNA in hematopoietic stem cells were assessed as an indicator of repair and recombination events that have occurred. In all experiments performed, recombinant human angiogenin was used as a comparison factor. Dot blot hybridization showed that in the colony cells obtained from the bone marrow cells of the model organisms as well as from human bone marrow cells treated with a double-stranded DNA preparation, there was a significant increase in the amount of telomeric DNA. Amplification of telomeric DNA in colony cells is not associated with contamination of the original DNA preparation with which the bone marrow cells were treated. Treatment of bone marrow cells with DNA that does not carry telomeric sequences (*AluI* PCR fragment) does not lead to an increase in the amount of telomeric DNA in the cells of grown colonies. This suggests the participation in the amplification of telomeric DNA of an extrachromosomal DNA template carrying telomeric DNA. It has been established that treatment of bone marrow cells with angiogenin also leads to an increase in telomeric DNA in colony cells. A comparison of the type of colonies with the intensity of hybridization (i.e. the amount of telomeric DNA in the sample) suggests that the increase in the amount of detectable telomeric DNA following treatment with angiogenin and hDNA^{gr} has a fundamentally different origin. Western blot analysis and real-time PCR revealed that the increase in the amount of telomeric DNA following treatment of bone marrow cells with a double-stranded DNA preparation does not correlate with the activity of endogenous/exogenous telomerase. For angiogenin, it has been shown that an increase in the amount of telomeric DNA may be the result of activation of endogenous telomerase activity. A principle has been developed for the amplification of a new genetic trait that came into hematopoietic stem cells with extracellular double-stranded DNA material and was fixed in the recipient genome or was transitively present in the cell as new genetic information.

Key words: hematopoietic stem cells; dot blot hybridization; telomeric DNA; angiogenin; recombinogenic situation

For citation: Ruzanova V.S., Oshikhmina S.G., Ritter G.S., Dolgova E.V., Kirikovich S.S., Levites E.V., Efremov Y.R., Karamysheva T.V., Bogomolov A.G., Meschaninova M.I., Mamaev A.L., Taranov O.S., Sidorov S.V., Nikonov S.D., Leplina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Proskurina A.S., Bogachev S.S. Concept of natural genome reconstruction. Part 3. Analysis of changes in the amount of telomeric DNA in colony cells as a new amplified feature that arose during the processing of hematopoietic bone marrow stem cells. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii*=*Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(4):479-495. doi 10.18699/vjgb-25-52

Введение

Основной идеей настоящей части исследования является доказательство участия интернализованных в гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) (Рузанова и др., 2024) экстраклеточных фрагментов двуцепочечной ДНК в репарационно-рекомбинационных процессах, активированных этими же фрагментами в недифференцированных прогениторах. В качестве модельной мишени была выбрана теломера, представляющая собой массу однородной ДНК, изменения количества которой легко обнаружить экспериментально. Повторы, образующие теломеру, имеют

одну и ту же нуклеотидную последовательность у всех млекопитающих. Это позволяет использовать человеческую ДНК в качестве субстрата для оценки изменения количества теломерной ДНК, произошедшего вследствие репарационно-рекомбинационных процессов на различных экспериментальных модельных системах. Методом оценки была выбрана количественная дот-блот гибридизация с ДНК теломерного повтора.

Индукция пангеномных одноцепочечных разрывов фрагментами двуцепочечной ДНК, интернализованными ГСК естественным природным механизмом, представля-

ет собой основополагающее явление в череде событий, определяемых нами как «рекомбиногенная ситуация» (Лихачева и др., 2008). Такое состояние клетки приводит в движение репарационно-рекомбинационную машину, в результате которого возникает множество взаимодействий между хроматином и фрагментами ДНК, находящимися в ядре.

По своей сути это та же самая ситуация, когда в клетке формируются двуцепочечные разрывы или индуцируется нарушение структуры хроматина высшего порядка. В рамках рекомбиногенной ситуации можно выделить две основные стороны процесса: молекулярную ферментативную машину, активированную в клетке, и рекомбинационные интермедиаты хроматина и фрагментов ДНК, участвующие в репарационной рекомбинации. Обе стороны процесса глубоко проанализированы для двуцепочечных разрывов и одноцепочечной ДНК, однако существует минимальное количество информации о факторах рекомбиногенной ситуации, индуцированной никами.

Следуя сказанному, в Приложениях 1 и 2¹ мы кратко описываем молекулярные события, которые характеризуют появление двуцепочечных разрывов, одноцепочечных нитей ДНК или нарушения структуры хроматина высшего порядка, предполагая, что многие из описанных деталей будут также характерны для рекомбиногенной ситуации, индуцированной никами. В Приложении 1 дана краткая информация о факторах, участвующих в описываемых процессах. Как следует из проведенного в Приложении 2 анализа, в клетке индуцируется комплексный ответ на повреждение и различные изменения структуры хроматина высшего порядка. Активируется система иерархических киназ (ATM, ATR, ДНК-РК, относящихся к семейству фосфатидилинозитол-3-киназависимых киназ) и приводятся в активное состояние молекулярные системы или восстановления целостности хроматина, или нормализации его пространственной организации.

Разрывы одной из нитей ДНК («ники») находятся в списке основных триггеров нарушения структуры хроматина высшего порядка. Показано, что этот тип нарушений структуры хроматина имеет свой путь репарации и активирует характерную для данного пути палитру репарационно-рекомбинационных факторов, отличающуюся от репаративной машины, восстанавливающей двуцепочечные разрывы. При рекомбиногенной ситуации, индуцированной никами, активируется процесс гомологичной рекомбинации, основной характеристикой которого является высокая точность коррекции генетической информации (Vriend, Krawczyk, 2017; Maizels, Davis, 2018). Известно, что при возникновении ников и их репарации по механизму гомологичной рекомбинации ATM и ATR киназы не являются абсолютно необходимыми факторами процесса восстановления повреждения. Это означает, что ник-опосредованная гомологичная рекомбинация может проходить без участия иерархических киназ и, как следствие, без активации «чек-пойнт» механизма. Также есть основания считать, что опосредованная никами гомологичная рекомбинация не зависит от фазы клеточного

цикла. Репарация ников, как и репарация двуцепочечных разрывов, зависит от формирования филаментов репликативного фактора А. При этом если репарация двуцепочечных разрывов зависит от активности BRCA1, RAD51, BRCA2 комплексов, то репарация ников связана с активностью BRCA1, но не зависит от RAD51 (Vriend, Krawczyk, 2017; Maizels, Davis, 2018).

Таким образом, фрагменты ДНК, интернализированные в клетку, индуцируют ники. Развивается рекомбиногенная ситуация, и иницируется механизм гомологичной рекомбинации. При таком сценарии фрагменты ДНК, находящиеся внутри клетки, выступают в качестве внехромосомного субстрата для репаративно-рекомбинационных процессов, ими же активированных. В результате взаимодействия фрагментов и хроматина произойдут изменения ДНК хромосом. Мы предполагаем, что если эти изменения будут масштабными, то их можно детектировать современными методами анализа.

Очевидно, что наиболее вероятными локусами хромосом, в которых возможно обнаружить произошедшие с геномом изменения, окажутся локусы, содержащие повторяющиеся последовательности, к которым относятся районы интеркалярного гетерохроматина, центромеры и теломеры. Эти районы хромосом содержат большое количество ДНК, и в случае масштабных изменений можно будет различными экспериментальными подходами, включая ПЦР в реальном времени, флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH), количественную дот-блот гибридизацию, определить изменение количества ДНК в выбранном локусе. Интеркалярный гетерохроматин и центромерные сателлиты видоспецифичны, и для анализа изменений, произошедших в геноме, необходимо брать аллогенную ДНК. Теломерные сателлиты у всех млекопитающих и человека представлены одним и тем же гексануклеотидным повтором TTAGGG, и для проведения экспериментов и анализа изменения в теломерных локусах на различных видах можно использовать любую двуцепочечную ДНК млекопитающих или человека (Giardini et al., 2014).

Теломеры – это специфические структуры хроматина на концах хромосом эукариотических клеток. ДНК теломер большинства эукариот, как было сказано выше, состоит из повторяющихся гексануклеотидов (для человека – TTAGGG). Размер теломеры для человеческих хромосом составляет около 10 т. п. н. Прямая и комплементарная цепи теломер называются G- и C-нитями. 3'-конец G-нити является одноцепочечной ДНК, которая называется G-хвостом. Показано, что G-хвост проникает в проксимальный двуцепочечный повтор и взаимодействует с C-нитью, образуя особую структуру – t-петлю. Каждая теломера представляет собой окончание ДНК хромосомы, которое защищено от процессов деградации, вызывающих нестабильность хромосом, замкнутым кольцом t-петли и комплексом специфических белков – шелтерином и гетеротимером CST (CTC1-STN1-TEN1). CST гетеротимер связывается с интермедиатом t-петли в точке аннилинга одноцепочечной свисающей G-цепи и комплементарной последовательности 3'–5' цепи (C-цепь), формируя защитный комплекс экпирования (рис. 1, А) (Giardini et al., 2014; Soman et al., 2022; Alanazi et al., 2024).

¹ Приложения 1–5 см. по адресу:

<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx16.pdf>

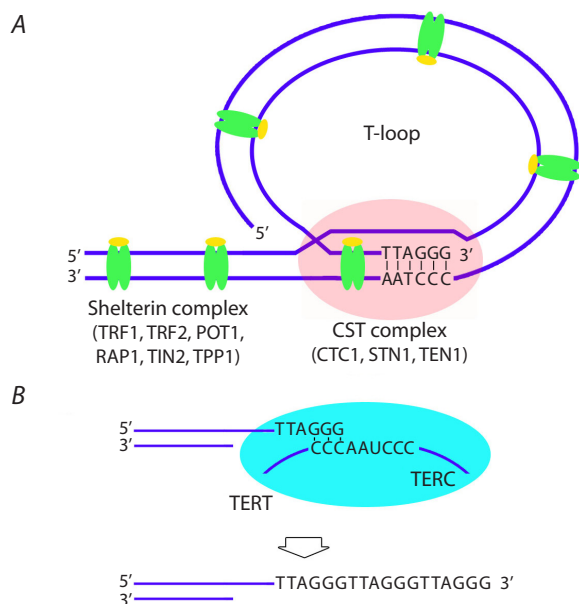


Рис. 1. Структура теломеры и механизм ее удлинения теломеразным комплексом.

А – белковые комплексы в теломерном районе. В – механизм удлинения теломеры теломеразным комплексом. Несколько нуклеотидов на 3' конце G-цепи теломеры комплементарно связываются с последовательностью шаблонного домена теломеразной РНК TERC. Хромосомный конец удлиняется обратной транскриптазой TERT.

Специфический белковый комплекс шелтерин служит функциональной основой хроматина теломер и в клетках млекопитающих состоит из одного (POT1) и двух (TRF1 и TRF2) теломерных ДНК-связывающих белков, а также специфических белков, соединяющих эти ДНК-связывающие белки (см. рис. 1, А) (Giraud-Panis et al., 2010; Lee et al., 2014; Soman et al., 2022). Вместе указанные структурные комплексы у млекопитающих формируют теломерный гетерохроматин (Lu W. et al., 2013).

ДНК теломер в делящихся клетках подвержена укорочению (так называемая проблема конечной репликации). Полуконсервативная репликация не может завершить синтез концов линейной ДНК. Таким образом, после нескольких раундов клеточного деления соматические клетки имеют укороченную ДНК теломер, что приводит к необратимой остановке роста клеток, или репликативному старению (Chan, Blackburn, 2003; Doksanı, 2019; Jones et al., 2023).

Описано два механизма, предотвращающих укорочение теломер и сохраняющих возможность бесконечного деления, которые активны в стволовых клетках, в том числе ГСК, и в immortalized клетках опухоли. Основной механизм связан с активностью теломеразы (см. рис. 1, В). Теломераза – это специфическая обратная транскриптаза, которая удлиняет G-нить теломерной ДНК. Стволовые клетки и раковые клетки около 90 % опухолей поддерживают длину теломер теломераз-зависимым образом (Chan, Blackburn, 2003; Nandakumar, Cech, 2013).

Второй механизм носит название «альтернативное удлинение теломер» и описан для незначительного количества опухолей. Этот путь характеризуется специфиче-

ским механизмом метаболизма ДНК теломер, в котором основным элементом являются рекомбинация и рекомбинация, ассоциированная с репликацией (Lundblad, 2002; Hande, 2004; Pickett et al., 2009; Nabetani, Ishikawa, 2011; Rovatsos et al., 2011; Doksanı, 2019; Loe et al., 2020; Lu R., Pickett, 2022; Jones et al., 2023).

В настоящем исследовании для оценки масштабных изменений в геноме был выбран анализ количества теломерной ДНК как мишени, состоящей из повторов, не имеющих видовой специфичности у млекопитающих, в клетках, обработанных терапевтической ДНК hDNA^{gr}. Анализ выполнен с использованием трех подходов: FISH, ПЦР в реальном времени, дот-блот гибридизация (Приложение 3). Как сказано выше, простым способом оценить изменение количества теломерной ДНК в ГСК будет анализ этого параметра в клетках-потомках после обработки ГСК в составе клеток костного мозга и после их амплификации в виде колоний на метилцеллюлозе (до 1000 клеток в колонии). ГСК с измененной генетикой на метилцеллюлозе дадут генетически однородное потомство, т. е. произойдет амплификация нового признака, который можно детектировать (технология является собственностью ООО «ЭС.ЛАБ ДИАГНОСТИК», патентная заявка № 2023124343 от 20.09.2023). Теломеры образованы повторами, которые идентичны для всех млекопитающих (TTAGGG повтор «позвоночных/человека»). Этот факт принципиально позволял использовать hDNA^{gr} в мышинной или крысиной моделях для оценки изменения количества теломерной ДНК.

Дополнительно было оценено изменение количества теломеразы в клетках колоний. Через 15 суток после первичной индукции в составе клеток костного мозга клетки колоний повторно обрабатывались теми же факторами. Образцы клеток отбирались во временные точки 0 (без обработки) и спустя 1, 2, 4, 8, 16, 32 ч после повторной обработки. Все оценки проводились в сравнении между клетками, обработанными тремя индукторами – ангиогенином, hDNA^{gr} и совместно двумя препаратами.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. В работе использованы молодые самцы мышей СВА/Лас в возрасте от 2 до 5 месяцев, старые самцы мышей СВА/Лас в возрасте от 9 до 12 месяцев; старые самцы крыс линии Wistar в возрасте от 18 до 22 месяцев, выведенные в ЦКП «Виварий конвенциональных животных» Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия). Животных содержали группами по 6–10 мышей и по 3–4 крысы в клетке со свободным доступом к пище и воде. Все эксперименты с животными были одобрены Комитетом по уходу и использованию животных Института цитологии и генетики СО РАН. Мышей выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации шейных позвонков, крыс – методом CO₂ эвтаназии или декапитацией.

Клетки костного мозга человека. Были использованы клетки криоконсервированного сепарата костного мозга больных лимфомой Ходжкина, предоставленного криобанком Научно-исследовательского института фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ). В Клинике иммунопатологии НИИФКИ в отделении ге-

матологии с блоком трансплантации костного мозга проводится лечение больных гемобластомами высокодозной химиотерапией и трансплантацией аутологичных или аллогенных периферических ГСК. При заготовке периферических стволовых клеток наряду с основным продуктом афереза, который трансплантируется пациенту, заготавливается два-три образца (пробирки-спутники) сепарированных клеток для контроля качества продукта афереза и научных исследований. Такие образцы исследовались в настоящей работе. Каждый образец сепарата костного мозга, включая образцы-спутники, сопровождается необходимым пакетом документов, включающим информированное согласие, протокол исследований материала костного мозга, протокол лечения, которые подписываются пациентом в соответствии с установленными нормами. После проведенного лечения образцы-спутники утилизируются согласно СанПиН или используются в научных целях. Документы, сопровождающие каждый забор материала костного мозга, хранятся в архиве криобанка НИИФКИ и могут быть востребованы по официальному запросу.

Препарат ДНК. Реконструктор ДНК генома человека (hDNA^{gr}) и ДНК плаценты были выделены из плацент здоровых женщин. hDNA^{gr} фрагментировали до 1–10 нуклеосомных мономеров (200–2000 п. н.) путем обработки ультразвуком, депротеинизировали с помощью протеиназы К и выделяли фенол-хлороформной экстракцией. ДНК плаценты выделяли аналогичным образом, без фрагментации.

Ангиогенин предоставлен ООО «Лаборатория Ангиофарм» (Новосибирск, Россия).

pBSM13-*AluI*-pBSM13 ПЦР-фрагмент. Амплификацию *AluI* повтора человека (pBSM13-*AluI*-pBSM13 фрагмент) проводили с помощью ПЦР. Матрица представляла собой ДНК *AluI* повтора, клонированного в pUC19, включающего начало и конец tandemно повторяющихся последовательностей *AluI* и *AluY* (NCBI: AC002400.1, 53494–53767). Для амплификации использовали стандартные праймеры M13 (M13 for: 5' GTAAAACGACGGCC AGT 3', M13 rev: 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'). ПЦР-фрагмент пересаждали 0.1 V NaAc 3 M, pH 5.2, и 1 V изопропанола в течение 10 мин при –20 °C. Осадок промывали в 70 % этаноле и растворяли в стерильной воде.

Выделение клеток костного мозга. После цервикальной дислокации шейных позвонков у мышей препарировали бедренные и большеберцовые кости, отсекали эпифизы и вымывали костный мозг средой IMDM+2 % FBS. Клеточную суспензию пропускали несколько раз через иглу 21-го калибра, чтобы избавиться от костномозговых розеток, и фильтровали через 40 мкм. Клетки осаждали центрифугированием 10 мин при 400g и ресуспендировали в буфере со 130 mM хлоридом аммония для лизиса эритроцитов на 3–5 мин. Затем буфер разбавляли в 10 раз PBS, клетки вновь осаждали, ресуспендировали в среде IMDM и подсчитывали в камере Горяева.

Обработка клеток костного мозга индукторами. Клетки костного мозга, выделенные из старых животных и сепаратов костного мозга больных лимфомой Ходжкина, инкубировали с индукторами в течение 1 ч в атмосфере 5 % CO₂, влажности 95 %, 37 °C из расчета: на 3 млн

клеток – 500 мкг hDNA^{gr}, либо 500 нг ангиогенина, либо 500 мкг hDNA^{gr} и 500 нг ангиогенина совместно в 1 мл среды IMDM без сыворотки. Контрольные клетки костного мозга (без обработок) инкубировали в среде IMDM без сыворотки с добавлением PBS в объеме, равном объему добавленного индуктора к активированным клеткам костного мозга.

Культивирование клеток костного мозга в метилцеллюлозной среде. Клетки костного мозга после/без активации индукторами переосаждали в течение 10 мин при 400g и ресуспендировали в среде IMDM+2 % FBS. Для количественного определения и анализа миелоидных предшественников клетки костного мозга мыши помещали в метилцеллюлозную среду MethoCult M3434, а клетки костного мозга крысы и человека – в метилцеллюлозную среду MethoCult H4034 (Stem Cell Technologies). Подсчет количества колоний и выделение клеток из метилцеллюлозной среды после культивации осуществляли согласно инструкции производителя. Культивирование клеток проводили 9–15 дней, в зависимости от целей эксперимента.

Выделение ДНК из клеток колоний и печени молодых мышей. Клетки колоний осаждали при 400g в течение 5–7 мин. Осадок ресуспендировали в 50 mM ЭДТА.

После цервикальной дислокации шейных позвонков у мышей отсекали фрагмент печени и гомогенизировали его в буфере со 100 mM ЭДТА, pH 8.0, и 20 mM Трис-HCl, pH 7.5. Затем в обоих случаях к клеткам добавляли SDS до 1 % и инкубировали гомогенат со 100 мкг/мл протеиназы К при 58 °C в течение 60 мин. Для выделения ДНК проводили фенол-хлороформную экстракцию и переосаждение 1 V изопропанола из 0.3 M NaAc. Осадок ДНК промывали 70 % этанолом и растворяли в стерильной воде. Количество ДНК измеряли на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США).

Выделение суммарной РНК. Клетки колоний осаждали при 400g в течение 5–7 мин. Осадок ресуспендировали в TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, США). Суммарную РНК выделяли в соответствии с инструкциями производителя. Количество РНК измеряли на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США).

Получение кДНК. ПЦР с обратной транскрипцией проводили на матрице поли-А мРНК с использованием амплификатора T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, США) и набора MMLV RT («Евроген», Россия) по протоколу производителя.

Дот-блот гибридизация. Для количественной оценки теломерной ДНК использовали образцы ДНК, выделенные из клеток колоний мыши и человека. ДНК образцов была озвучена до размеров 100–500 п. н. Образцы ДНК денатурировали в 0.2 M NaOH при 100 °C в течение 10 мин и равное количество ДНК наносили на мембрану Hybond N, используя специальное оборудование для нанесения – дот-камеру. Образцы прижигали к мембране 10 мин под ультрафиолетовой лампой и хранили до гибридизации.

Мембрану с пришитой к ней ДНК переносили в 50 мл предгибризационного буфера, содержащего 0.1 % SDS, 5×SSC, 5× раствор Денхарда, 100 мкг/мл суммарной РНК дрожжей, и инкубировали при 37 °C в течение 1–3 ч. Меченый образец ДНК 54 п. н. (P³² олигонуклеотид G-зонд – (TTAGGG)₉, C-зонд – (CCCTAA)₉) денатуриро-

вали кипячением в течение 10 мин и вносили в 50 мл гибридационного буфера, содержащего 0.1 % SDS, 5×SSC, 5 % декстран сульфат 500000, 100 мкг/мл суммарной РНК дрожжей. Предгибридационный раствор сливали и к мембране после перемешивания приливали гибридационный буфер, содержащий меченый материал. Гибридацию вели при 37 °C на протяжении ночи при постоянном перемешивании. После гибридации мембрану отмывали раствором, содержащим 0.1 % SDS и 0.1×SSC, три раза по 15 мин при 37 °C. Режим гибридации (буферная система, температура и количество отмывок) коротких олигонуклеотидов выбран эмпирически при проведении многочисленных экспериментов с радиоактивным фосфором и находится в пределах 37–42 °C (Dolgova et al., 2012).

Мембрану с перенесенными на нее образцами экспонировали на экран К-типа. Сканирование радиоизотопных образцов выполняли при помощи системы PharosFX. Полученные изображения анализировали в программе Quantity One по параметру плотности пятен (интенсивность/мм²).

Пульс-форез. Для оценки теломерной ДНК методом пульс-фореза использовали клетки крысиных колоний. Их объединяли, отмывали от метилцеллюлозной среды и считали в камере Горяева. Клетки колоний заливали в блоки 1 % легкоплавкой агарозы из расчета 500 тыс. клеток на один блок. До проведения анализа блоки хранили в 0.5 М ЭДТА при 4 °C. Перед пульс-электрофорезом блоки споласкивали в ТЕ-буфере и инкубировали с лизирующим буфером (50 мМ ЭДТА, 1 % саркозил (Serva, Германия), 1 мг/мл протеиназы К (Thermo Fisher Scientific, США)) в течение 20 мин при 50 °C. Затем блоки легкоплавкой агарозы фиксировали в карманах агарозного блока и подвергали электрофоретической разгонке в системе пульс-фореза в режиме: forward – 3 с, reverse – 1 с, RAM-фактор – 0.9.

После этого ДНК переносили на мембрану Hybond N с использованием капиллярного способа в 20×SSC (Маниатис и др., 1984). Образцы ДНК прижигали к мембране в течение 10 мин под ультрафиолетовой лампой и хранили до гибридации. Далее гибридацию с P³² олигонуклеотидом и сканирование радиоизотопных образцов проводили таким же образом, как и при дот-блот гибридации.

Анализ экспрессии TERT. Клетки костного мозга, выделенные из сепаратов костного мозга больных лимфомой Ходжкина, инкубировали с индукторами (hDNA^{gr}, ангиогенин, ангиогенин+hDNA^{gr}) и без индукторов (клетки костного мозга без обработок, контроль) в среде IMDM в течение 1 ч в атмосфере 5 % CO₂, влажности 95 %, 37 °C. Затем на протяжении 15 дней клетки костного мозга культивировали в метилцеллюлозной среде. При выделении клеток из метилцеллюлозной среды образовавшиеся колонии объединяли и отмывали от среды согласно инструкции производителя. Далее клетки образовавшихся колоний считали в камере Горяева и вновь инкубировали с индукторами. После/без активации индукторами клетки переосаждали в течение 10 мин при 400g, ресуспандировали в DMEM/F-12 (1:1) среде («БиолоТ», Россия) с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Capricorn Scientific, Германия), гентамицина 100 мкг/мл

Последовательности используемых праймеров

Праймер	Структура
Rplp0-for	5' CGTCCTCGTGGAAATGACAT 3'
Rplp0-rev	5' GCATCATGGTGTCTTGGCC 3'
TERT-for	5' GGCACGGCTTTTGTTCAGAT 3'
TERT-rev	5' ACATGCGTGAACCTGTACG 3'

(«Дальхимфарм», Россия) и амфотерицина Б 1 мкг/мл («Синтез», Россия) и рассаживали по лункам в 24-луночной планшете. Через 1, 2, 4, 8, 16, 32 ч после повторной индукции отбирали образец клеток и делили его на две равные по количеству клеток части. Нулевая точка представляла собой клетки колоний до повторной обработки индукторами.

Одну часть клеток осаждали, осадок лизировали в TRIzol Reagent и выделяли суммарную РНК. Образцы РНК были пуллированы в две группы: 0–4 и 8–32 ч. RT-qPCR проводили на матрице мРНК поли-А на амплификаторе T100 Thermal Cycler с набором MMLV RT согласно протоколу производителя. qPCR проводили в 96-луночных планшетах с использованием BioMaster HS-qPCR SYBR (2×) в соответствии с протоколом производителя на приборе QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). Последовательности праймеров приведены в таблице. Анализ qPCR каждого образца выполняли в трех повторностях. Относительный уровень экспрессии определяли методом 2^{–ΔΔC_t}. Временная группа образцов 0–4 ч была выбрана в качестве контрольной группы; уровень экспрессии целевого гена в них принимали равным 1, референсный ген – Rplp0. Протокол для ПЦР был следующим: 95 °C в течение 5 мин, 40 циклов по 95 °C в течение 20 с, 57 °C – 30 с, 72 °C – 30 с, с заключительным этапом плавления с медленным нагревом от 60 до 95 °C.

Другую часть клеток осаждали и ресуспандировали в физиологическом растворе. К суспензии клеток добавляли ингибиторы протеаз: PMSF, N-этилмалеимид, TPCK до 1 мМ и аprotинин до конечной концентрации 2 мкг/мл. Затем добавляли Sample buffer (66 мМ Трис-НСl, pH = 6.8, 26.3 % глицерина, 2.1 % SDS, 0.011 % бромфенолового синего), кипятили лизаты при 96 °C в течение 10 мин и центрифугировали 5 мин при 12 тыс. оборотов. Лизаты использовали для электрофореза, образцы не объединяли по времени. Перед нанесением на электрофорез образцы выравнивались по количеству клеток, подвергшихся лизису. В качестве контроля был взят коммерчески доступный рекомбинантный белок TERT человеческий (Cloud-Clone-Corp, США) (2 мкг на дорожку). Вестерн-блот с антителами проводился после электрофореза и переноса на нитроцеллюлозную мембрану. Неспецифическое связывание блокировалось инкубацией в 0.01 М фосфатно-солевом буфере (PBS), содержащем 0.02 % Tween 20, в течение ночи при 4 °C. Затем мембраны инкубировали с поликлональными антителами к человеческому TERT (Cloud-Clone-Corp, США) или с моноклональными пер-

вичными антителами к человеческому TERT (Antibody System, Франция) и вторичными антителами к мышиному IgG (H+L) (Affinity Biosciences, США). Сигнал визуализировали с помощью ECL Western blotting detection system (Abcam, Великобритания) и детектировали на устройстве iBright (Thermo Fisher Scientific, США).

Статистический анализ был выполнен с использованием программного обеспечения Statistica 8 (StatSoft, США). Достоверность различий оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни, выявленные различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты

Выбор адекватного метода оценки количества теломерной ДНК

Проведена серия аналитических экспериментов. На первом этапе на мышинной модели были отработаны три принципиальных методических подхода определения количества теломерной ДНК.

Для выбора адекватного метода клетки костного мозга мышей были обработаны активаторами hDNA^{gr} и ангиогенином и высеяны на метилцеллюлозу. Через 9 суток клетки были собраны. Из части клеток выделили ДНК и провели ПЦР в реальном времени и дот-блот гибридизацию. Часть клеток того же образца обработали колхицином и провели FISH. Таким образом, эксперименты были выполнены в один момент времени, «здесь и сейчас», с использованием одного и того же материала клеток, что позволило оценить адекватность каждого подхода для количественной оценки содержания теломерной ДНК в анализируемых образцах (см. Приложение 3).

Полученные данные свидетельствовали, что анализ длины теломер методами ПЦР в реальном времени и FISH в выбранных экспериментальных условиях дает противоречивые результаты, которые можно интерпретировать различными механизмическими вариантами. Только дот-блот гибридизация позволяет выявить существующую высокую достоверную разницу в изменении количества теломерной ДНК. В этой связи мы выбрали метод оценки количества теломерной ДНК с использованием количественной дот-блот гибридизации. Этот подход позволяет прямо оценить количество гомологичной используемому зонду ДНК в экспериментальном образце независимо от перечисленных в Приложении 3 обстоятельств.

Оценка количества теломерной ДНК

в клетках колоний методом дот-блот гибридизации

Увеличение количества теломерной ДНК в потомках ГСК, обработанных в составе клеток костного мозга и давших колонии с увеличенным количеством теломерной ДНК, может иметь несколько принципиальных вариантов происхождения:

- 1) интеграция теломерной ДНК, исходно присутствующей в образце hDNA^{gr}, в геном ГСК и ее амплификация в составе генетически однородных клеток колоний;
- 2) амплификация циклизированных теломерных повторов, присутствующих в препарате hDNA^{gr}, по типу «катящегося кольца» или альтернативного удлинения теломер;

- 3) индукция эндогенной теломеразы ГСК или индукция транзитного гена теломеразы, пришедшего вместе с интернализованной в ГСК экстраклеточной hDNA^{gr}, стохастически содержащей ДНК гена теломеразы;
- 4) активация покоящихся ГСК, ранее никогда не активированных жизненными событиями, содержащих исходное максимально возможное количество теломерных повторов (а значит, теломерной ДНК);
- 5) увеличение количества теломерной ДНК является следствием присутствия в клетках колоний остаточной исходной hDNA^{gr};
- 6) возможны также смешанные варианты.

Клетки костного мозга мыши и человека

Оценено количество теломерной ДНК в клетках-потомках ГСК, обработанных в составе клеток костного мозга активаторами hDNA^{gr}, ангиогенином и совместно, на мышинной модели и в клетках костного мозга человека методом количественной дот-блот гибридизации (рис. 2). Эксперименты были повторены многократно (см. пояснения к рис. 2) с ДНК из различных выделений и использованием прямого и обратного праймера-зонда для гибридизации. Было выбрано два подхода к нормированию количества ДНК в образцах обработанных клеток. Первый – количество ДНК выравнивалось по интеркалятору (Qubit) и проводилась количественная дот-блот гибридизация (мышинная модель, клетки костного мозга человека). Второй – нормирование осуществлялось по количеству взятых в обработку клеток колоний (крысинная модель).

На рис. 2, *H* сопоставляются сигналы гибридизации с теломерным зондом ДНК, выделенной из клеток, обработанных ангиогенином, hDNA^{gr} и совместно индукторами. Можно видеть, что в различных экспериментах в образцах ангиогенина интенсивность гибридизации разнонаправленно меняется. Для hDNA^{gr} она всегда выше, чем в контроле, количество теломерной ДНК для индуктора hDNA^{gr} превосходило количество теломерной ДНК в контроле в 1.1–2.5 раза. При совместном применении двух индукторов сигнал гибридизации незначительно выше контроля. Полученные результаты означали, что рассматриваемый признак для ангиогенина как монопрепарата нестабилен.

Сопоставление типа колоний с интенсивностью гибридизации. Проведено сопоставление зависимости силы гибридизационного сигнала (т. е. количества теломерной ДНК в образце) от типа колоний в четырех независимых экспериментах, где учитывались указанные параметры. Анализировались два ростка, BFU-E и CFU-GM (Приложение 4).

Можно полагать, что увеличение количества детектируемой теломерной ДНК при обработке ангиогенином и hDNA^{gr} имеет принципиально разное происхождение. Для ангиогенина возможен вариант увеличения количества теломерной ДНК, связанный с индукцией активности G0 CFU-GM колоний, ранее в костном мозге неактивных, содержащих эмбрионально заложенное количество теломерной ДНК. Для hDNA^{gr} при сопоставлении всех полученных данных на обеих модельных системах не обнаруживается корреляции между силой гибридизации и превалированием колоний одного из типов.

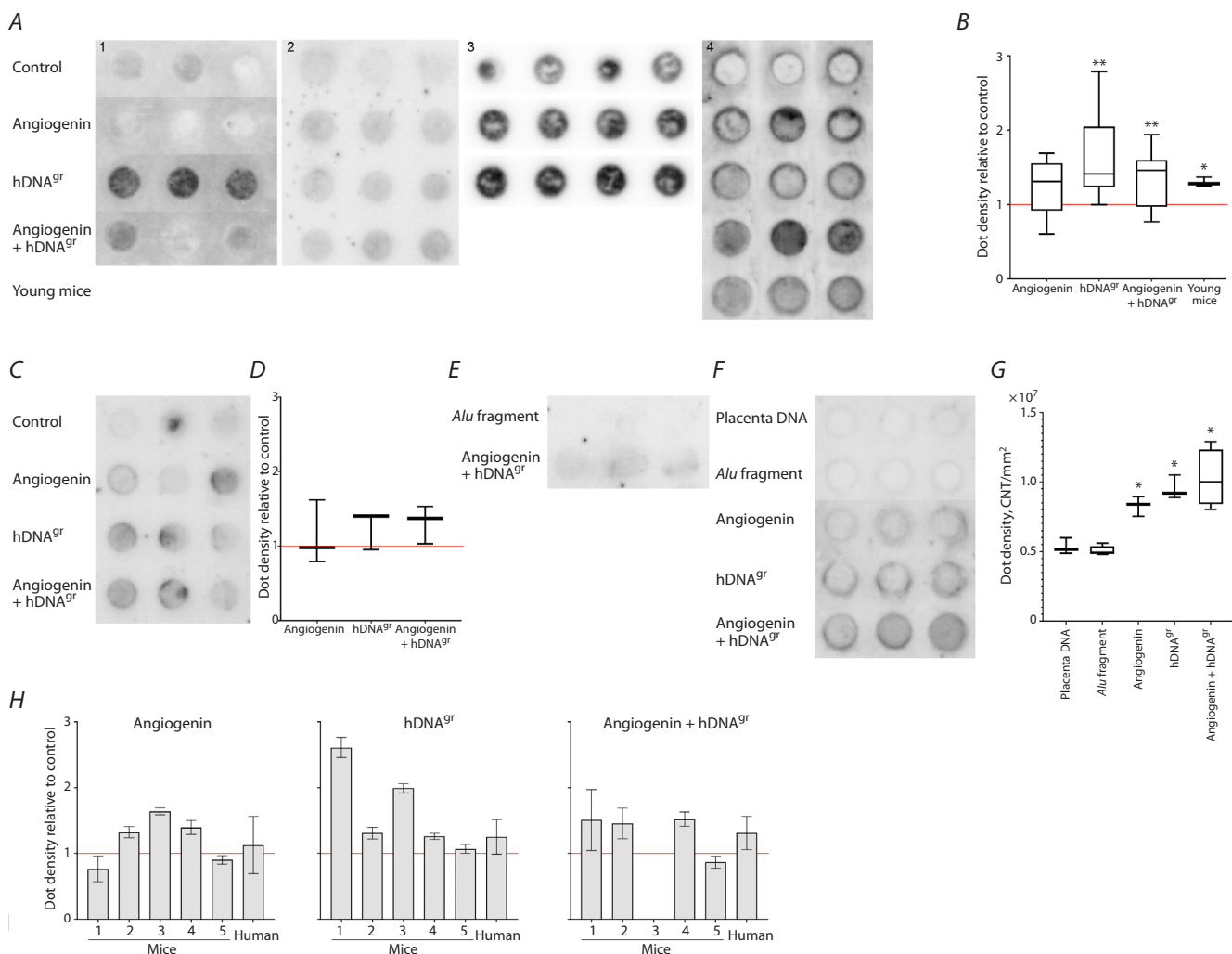


Рис. 2. Количественная дот-блот гибридизация ДНК, выделенной из колоний стволовых гемопоэтических клеток костного мозга мышей (A, B) и человека (C–G) без индукции (Control) и после индукции ангиогенином, препаратом hDNA^{9f} или совместно ангиогенином и препаратом hDNA^{9f}, с использованием в качестве зонда теломерного повтора (54 п.н., $n = 9$). A1, A3, C, F – C-зонд; A2, A4 – G-зонд. Также в качестве контрольных образцов использовали ДНК молодых мышей (A4), ДНК плаценты человека (F) и ДНК, выделенную из колоний, полученных из ГСК в составе клеток костного мозга, обработанных pBSM13-AluI-pBSM13 ПЦР-фрагментом (E, F). Мембрану анализировали с помощью фосфоимиджера. Интенсивность сигнала анализировали в программе Quantity1. A, C, E, F – фотографии мембран после гибридизации. B, D, G – диаграммы, отражающие плотность пятен (интенсивность/мм²) относительно контрольной группы, плотность пятен в которой принята за единицу (красная линия). Достоверные различия определены с помощью критерия Манна–Уитни: B – по сравнению с контрольной группой, G – по сравнению с группой, обработанной AluI фрагментом, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. H – сравнительный анализ интенсивности гибридизации (т.е. количества теломерной ДНК) по индивидуальным экспериментам между образцами ДНК колоний после обработки ангиогенином, hDNA^{9f} или совместно ангиогенином и препаратом hDNA^{9f}.

Оценка интенсивности гибридизации с P³² теломерным зондом при использовании в качестве индуктора ПЦР-фрагмента pBSM13-AluI-pBSM13. Отдельно следует остановиться на результатах сравнительной гибридизации с ДНК, выделенной из колоний, полученных из ГСК в составе клеток костного мозга, которые были обработаны pBSM13-AluI-pBSM13 ПЦР-фрагментом, с ДНК плаценты и с ДНК, выделенной из колоний на 15-е сутки после обработки индукторами. Оказалось, что ДНК ПЦР-фрагмента не стимулирует увеличение количества теломерной ДНК в клетках колоний (см. рис. 2, E–G). Этот факт означает, что фрагменты экстраклеточной ДНК (в данном конкретном эксперименте) не индуцируют активность эндогенной теломеразы.

Обоснование возможности изменения силы гибридизации в зависимости от количества и состава интернализированных ДНК фрагментов, а также от варианта P³²-меченого теломерного (C/G) зонда. Необходимо отметить, что изменения силы гибридизации в образцах с участием hDNA^{9f} в различных экспериментах могут быть связаны с количеством доставленных в клетку теломерных ДНК. Поскольку в клетке может присутствовать около 0.2 % (для мыши) – 0.02 % (для человека) (Рузанова и др., 2024; Potter et al., 2024) экстраклеточных фрагментов, то результатом конкурентной интернализации всегда будет неопределенность в качественном составе доставленных фрагментов. Это означает, что количество теломерных повторов может существенно изменяться от эксперимента к

эксперименту. Кроме того, изменение силы гибридизационного сигнала могло быть связано с использованием или прямого, или обратного праймера. Анализ интенсивности гибридизации при применении двух различных зондов свидетельствует, что максимальной амплификации подверглась ДНК, гомологичная G-хвосту (С-зонд). ДНК, гомологичная С-хвосту (G-зонд), тоже амплифицирована, но незначительно.

Сопоставление силы гибридизационного ответа на R^{32} -меченый теломерный ДНК зонд между ДНК, выделенной из колоний контрольного образца, и ДНК, выделенной из печени молодых животных. Проведено сопоставление силы гибридизационного ответа на теломерный ДНК зонд, меченный фосфором, между ДНК, выделенной из колоний контрольного образца, и ДНК, выделенной из печени молодых животных (см. рис. 2, А4). Можно видеть однозначно трактуемое увеличение силы гибридизационного ответа в образце молодых животных, что подкрепляет известный факт о более низком количестве теломерной ДНК в ГСК у старых организмов по сравнению с молодыми особями. Также полученные данные свидетельствуют, что если в результате действия индукторов произошла активация пролиферации спящих ГСК эмбрионального происхождения, то картина гибридизации для образцов, полученных от молодых животных и экспериментальных мышей, не будет существенно различаться.

Оценка возможности сохранения в ГСК остаточного материала $hDNA^{gr}$ после обработки этой ДНК ГСК в составе клеток костного мозга, которая может давать артефакт увеличения количества теломерной ДНК. Если доставленная в клетку ДНК не интегрирует в геном, то существует вероятность ее длительного присутствия в качестве экстрахромосомального материала, который и может давать артефакт увеличения количества теломерной ДНК (Dolgova et al., 2012).

Мы оценили количество чужеродной ДНК в клетках-потомках клеток костного мозга человека на 15-е сутки культивирования на метилцеллюлозе после обработки ГСК в составе клеток костного мозга TAMRA-меченой ДНК *AluI* повтора, обрамленного последовательностями pBS с праймерами M13 (Приложение 5). Полученные результаты свидетельствуют, что в клетках колоний не детектируются молекулы ДНК *AluI* повтора, исходно попавшие в ГСК при первичной обработке клеток костного мозга. То есть обнаруженное в экспериментах по дот-блот гибридизации увеличение количества теломерной ДНК не может быть следствием присутствия в клетках колоний остаточной исходной ДНК. Кроме того, по-видимому, фрагменты *AluI* вместе с неомологичными концами pBSM13 не попадают в состав генома и не амплифицируются в ПЦР.

Суммируя все полученные данные, можно сделать определенные выводы. Для $hDNA^{gr}$ увеличение интенсивности гибридизации не связано с превалированием одного из типов колоний, а значит, не связано с ГСК, ранее неактивными на протяжении всей жизни организма. Возможны варианты активации гена теломеразы экзогенного происхождения, прямой интеграции теломерной ДНК в геном ГСК или появления дополнительной теломерной ДНК,

связанного с репликацией, при обработке клеток костного мозга индуктором. Исключается вариант сохранения в клетке в неинтегрированном состоянии на протяжении всего времени культивирования на метилцеллюлозе ДНК фрагментов, исходно доставленных в ГСК в количестве, достаточном для изменения силы гибридизационного ответа.

Тем не менее совокупность результатов предполагает в большей степени истинную интеграцию в геном доставленной в клетку теломерной ДНК или появление дополнительной ДНК теломер, связанное с репликацией.

Для ангиогенина увеличение интенсивности гибридизации может быть связано с индукцией колониеобразования клеток CFU-GM ростка, ранее неактивных на протяжении всей жизни организма. Возможна активация гена эндогенной теломеразы. На оба варианта указывают результаты экспериментов по интернализации белка ангиогенина в примитивные гемопоэтические клетки мыши и человека. Показано, что ангиогенин интернализуют примитивные Sca1 гемопоэтические клетки мыши и CD34+ стволовые клетки крови человека (Рузанова и др., 2024). В этом случае активируется ген теломеразы. Вариант интеграции исключается, поскольку отсутствует необходимый субстрат.

Таким образом, в проведенном анализе достоверно установлено, что при индукции клеток костного мозга препаратом ДНК, ангиогенином и совместно в клетках происходят изменения, влияющие на длину теломерных повторов (т. е. количества теломерной ДНК) в таком количестве клеток, которое дает возможность визуализировать обнаруженный феномен.

Клетки костного мозга крысы

Для крысиной модели в экспериментах в качестве нормировочного критерия было выбрано количество клеток колоний. Клетки колоний после отмывки от метилцеллюлозы заливались в блоки легкоплавкой агарозы в количестве 500000 на блок, что соответствует около 3 мкг ДНК. Блоки лизировали и проводили электрофорез с использованием пульс-контроллера, как описано в разделе Материалы и методы. Был проанализирован электрофорез и проведен саузерн-блот анализ. Полученные результаты представлены на рис. 3. Фотографии электрофореза были обработаны в программе GelPro 3.0 (см. рис. 3, А). По свечению интеркалярного красителя оценено относительное соотношение количества ДНК в дорожках. Оказалось, что в образце с клетками, обработанными ДНК, количество ДНК в бэндах, которые впоследствии были оценены в ходе гибридизации, возросло в сумме на 10 %. При этом увеличение в трех бэндах происходило неравномерно: в двух верхних почти не изменилось, тогда как в третьем количестве ДНК выросло в два раза (см. рис. 3, В).

По результатам гибридизации в образце клеток, обработанных ДНК, на 17–30 % возросло количество теломерных повторов (см. рис. 3, С, D). Следует отметить, что увеличение количества теломерных повторов, в отличие от общего количества ДНК, наблюдалось во всех бэндах. В образце клеток, обработанных ангиогенином, количество ДНК уменьшилось относительно контрольной группы. Это может быть связано с тем, что из ГСК, об-

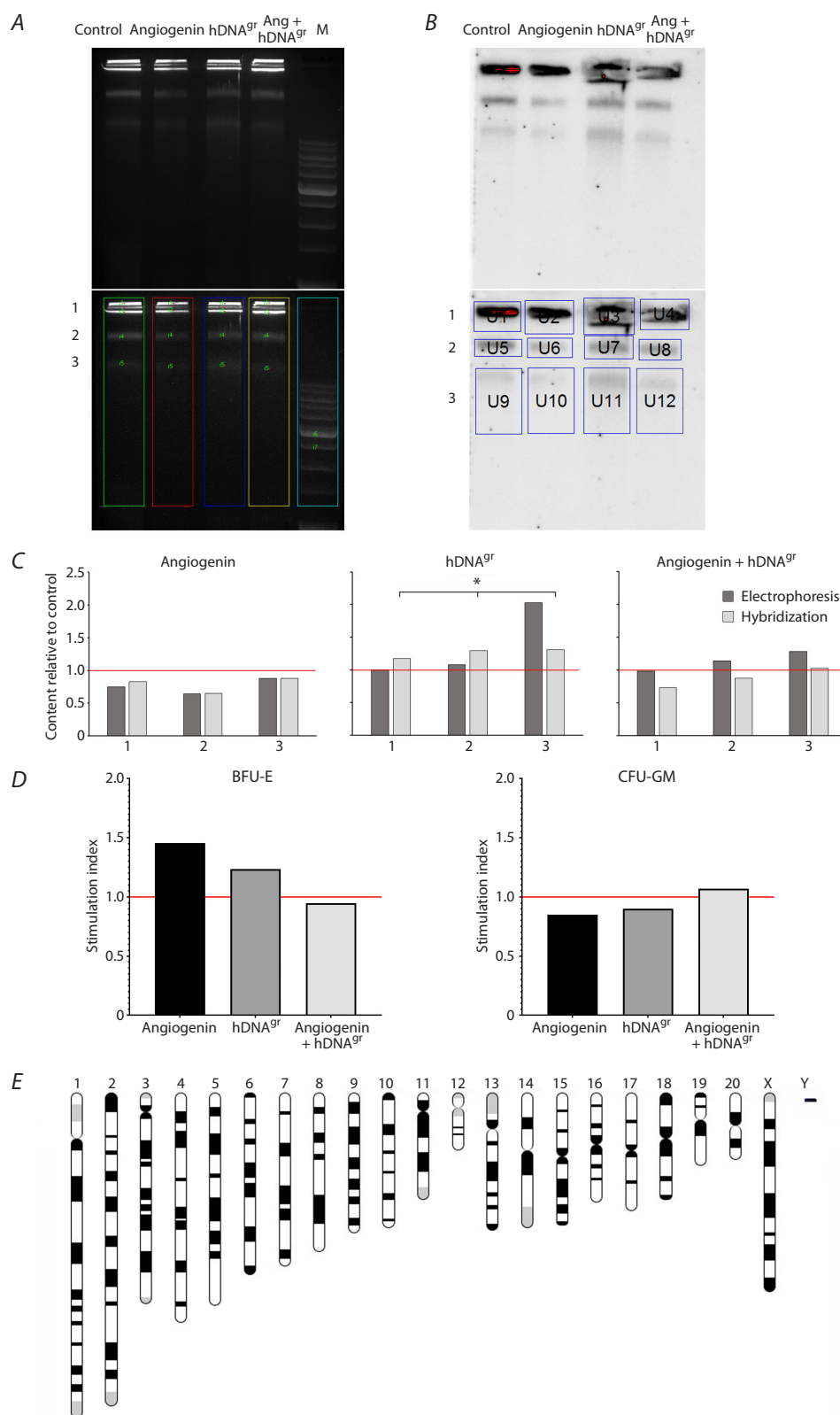


Рис. 3. Результаты обработки клеток костного мозга крысы ангиогенином, препаратом hDNA^{gr} и ангиогенином совместно с hDNA^{gr}.

A – электрофорез с ДНК, выделенной из колоний, фиксированных в блоках легкоплавкой агарозы. На нижнем блоке цифрами 1–3 обозначены фрагменты, использованные для количественного анализа. **B** – гибридизация с теломерными повторами (С-зонд) ДНК, выделенной из колоний. На нижнем блоке цифрами 1–3 обозначены области, использованные для количественного анализа. **C** – содержание ДНК по свечению красителя и интенсивность гибридизации для трех различных фрагментов относительно контрольной группы (значения приняты за единицу, обозначены красной линией). * Отличия достоверны по сравнению с контрольной группой, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни. **D** – содержание BFU-E и CFU-GM колоний на метилцеллюлозе после обработки клеток костного мозга крысы различными индукторами, выраженное в индексе относительно контрольной группы (значения приняты за единицу, обозначены красной линией). **E** – хромосомы крысы (<https://rgd.mcv.edu/rgdweb/report/genomeInformation/genomeInformation.html?species=Rat&mapKey=372&details=true>).

работанных ангиогенином, выросло большое количество эритроидных колоний (см. рис. 3, *E*), которые могут содержать безъядерные зрелые эритроциты, посчитанные при отборе клеток.

Анализ возможных механизмов увеличения количества теломерной ДНК

Гемопоэтические стволовые клетки мыши интернализуют фрагменты экстраклеточной ДНК (Potter et al., 2024). В дальнейших исследованиях в основных экспериментах использовалась модельная система «криоконсервированный костный мозг человека». Установлено, что CD34+ ГСК человека также захватывают экстраклеточные фрагменты ДНК. В клетку доставляется 0.02 % от гаплоидного генома экстраклеточного ДНК материала (в конкретном эксперименте) (Рузанова и др., 2024).

Для анализа механизма увеличения количества теломерной ДНК были выбраны два индуктора, один из которых, hDNA^{gr}, имеет в своем составе теломерную ДНК, которая является потенциальным субстратом для детекции в ГСК, а второй, ангиогенин, не несет в своем составе какой-либо ДНК, включая теломерную.

Это означает, что увеличение количества детектируемой теломерной ДНК при обработке ангиогенином связано или с индукцией эндогенной теломеразы, или с активацией покоящихся, ранее никогда не активированных исходных ГСК, сформированных и занявших костномозговые ниши во время эмбриогенеза. Невозможен вариант активации гена экзогенной теломеразы и интеграции, поскольку отсутствует необходимый субстрат.

Для препарата hDNA^{gr} рассматриваются следующие опции. Опция, связанная с возможностью встраивания в геном теломерной ДНК самого препарата hDNA^{gr} или увеличения количества G-теломерных повторов в результате репаративной репликации G-цепи (хвоста), что будет наблюдаться как увеличение количества теломерной ДНК в потомках исходной ГСК костного мозга. Также для hDNA^{gr} возможна активация транзитного гена теломеразы, находящегося в составе доставленных во внутренние компартменты ГСК экстраклеточных фрагментов. Результаты дот-блот гибридизации не подтверждают опцию активации эндогенного гена теломеразы в клетках-акцепторах фрагментов ДНК (см. рис. 2, *E–G*). Не подтверждается вариант, аналогичный описанному для ангиогенина, с активацией покоящихся, ранее никогда не активированных исходных ГСК, сформированных и занявших костномозговые ниши во время эмбриогенеза. Также не подтверждается вариант сохранения остаточного количества hDNA^{gr} в клетках колоний после исходного поглощения экстраклеточных фрагментов ГСК в составе клеток костного мозга и последующей контаминации образцов ДНК колоний остаточным количеством теломерной ДНК, исходно присутствующей в образце hDNA^{gr} и достаточной для выявления методом дот-блот гибридизации.

Проведенный анализ предполагал, что по крайней мере для ангиогенина наиболее вероятным объяснением увеличения количества теломерной ДНК будет индукция этим фактором теломеразной активности. Для hDNA^{gr} сохранялась возможность активации транзитного гена теломеразы.

Оценка влияния индукторов на теломеразную активность

Была проанализирована возможность активации теломеразной активности в прямых экспериментах. Эксперименты выполнялись на модели ГСК в составе клеток костного мозга человека после обработки hDNA^{gr}, ангиогенином и совместно. Ранее было показано, что в колониях, выросших после активации ГСК индуктором hDNA^{gr}, до ~15 % клеток для мыши (c-Kit/Sca-1) и до 3 % для человека (CD34) сохраняют маркеры примитивных клеток (Potter et al., 2024). Это означает, что при повторной активации клеток, выросших в колониях, будет оказано аналогичное воздействие на примитивные предшественники и в них будут индуцированы аналогичные события, в частности может быть активирован ген теломеразы в предположенных выше вариантах. В такой аранжировке будет достаточно материала, чтобы охарактеризовать клеточные лизаты на присутствие теломеразы в ПЦР в реальном времени и/или вестерн-блот анализом.

Клетки колоний на 18-е сутки инкубации (полное закрытие пангенотипных однопочечных разрывов) после индукции ГСК в составе клеток костного мозга тремя индукторами повторно обрабатывали теми же веществами. Образцы отбирали и лизировали в нулевой точке, через 1, 2, 4, 8, 16, 32 ч после повторной индукции. Были приготовлены образцы для ПЦР в реальном времени и вестерн-блот анализа. Для ПЦР в реальном времени образцы РНК были пуллированы в две группы, 0–4 и 8–32 ч. Для вестерн-блот анализа использовались повременные образцы (рис. 4).

Результаты ПЦР в реальном времени (три независимых повтора) свидетельствовали о следующем. При развитии ответа в интервале 8–32 ч после второй индукции мРНК теломеразы синтезируется в образцах, обработанных ангиогенином и ангиогенином совместно с hDNA^{gr}. В контрольном образце синтез мРНК теломеразы блокируется. В образце, обработанном hDNA^{gr}, мРНК теломеразы не детектируется в выбранных условиях (см. рис. 4, *A*).

Вестерн-блот анализ был проведен с образцами всех временных точек в трех независимых экспериментах. В первом использовались поликлональные антитела, во втором и третьем – моноклональные антитела против теломеразы. В первом эксперименте с поликлональными антителами в образцах, обработанных ангиогенином и ангиогенином совместно с hDNA^{gr}, в точке 16 ч после индукции детектируется бэнд 63 кДа, соответствующий клонированному фрагменту (EcoRI-NotI клон 712562) теломеразы человека (Cech et al., 1998), что коррелирует с общей картиной синтеза мРНК теломеразы (см. рис. 4, *B*). В случае моноклональных антител на теломеразу человека в двух последовательных экспериментах выявляется бэнд ~35 кДа, который не детектируется при окрашивании Ку-масси (см. рис. 4, *C, D*). В третьем эксперименте вместе с бэндом 35 кДа выявляется бэнд ~63 кДа (см. рис. 4, *D*). Специфический бэнд ~35 кДа обнаруживается в группах, обработанных ангиогенином совместно с hDNA^{gr} (второй эксперимент, см. рис. 4, *C*) и ангиогенином (третий эксперимент, см. рис. 4, *D*). Мода появления этого специфического бэнда для двух экспериментов различна. Во втором эксперименте бэнд ~35 кДа четко детектируется

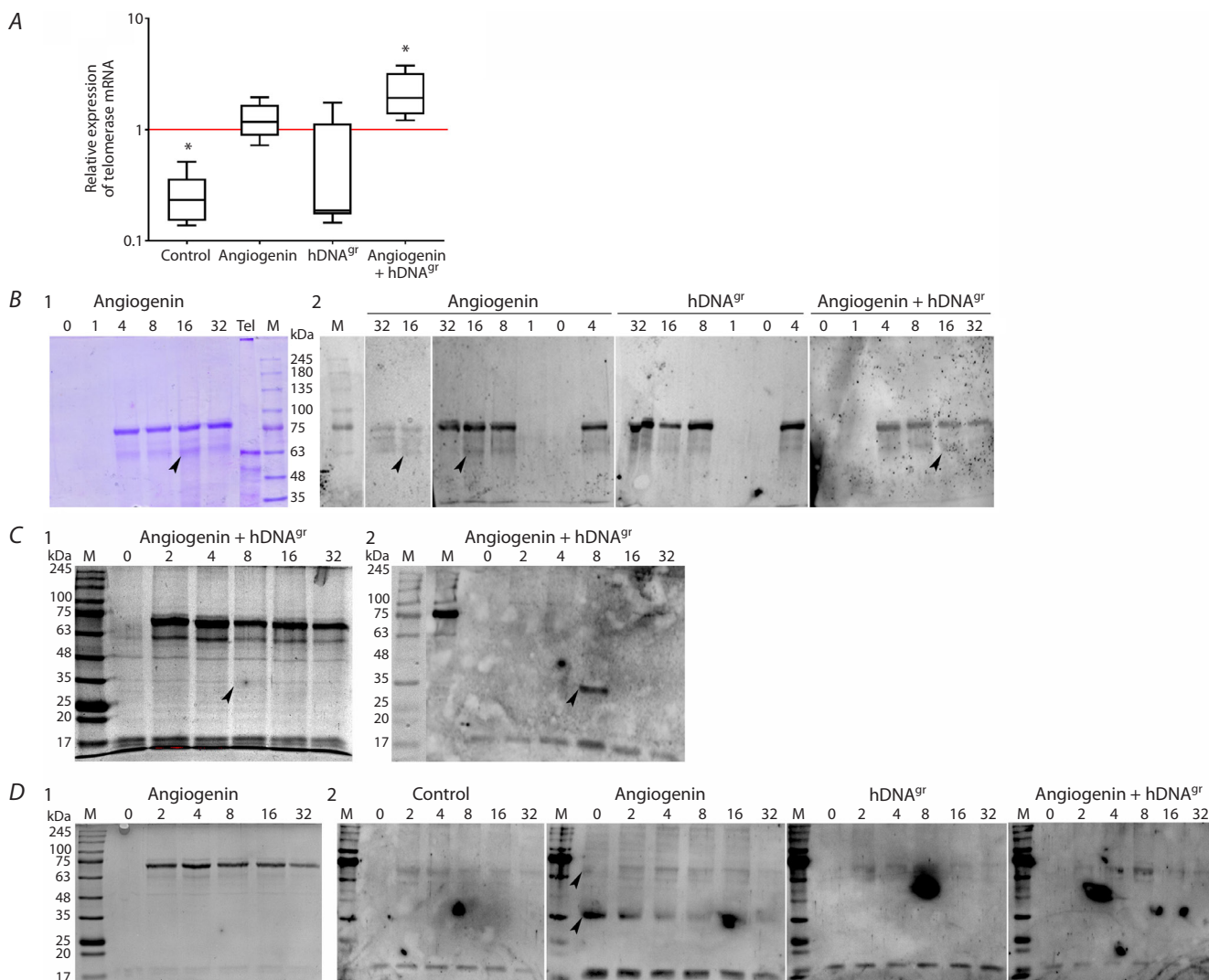


Рис. 4. ПЦР в реальном времени и вестерн-блот анализ РНК и белковых лизатов на присутствие мРНК теломеразы и белка теломеразы.

А – ПЦР в реальном времени пуллованных образцов в интервале 8–32 ч. Приведены значения относительно соответствующих групп 0–4 ч (значения приняты за единицу, отмечено красной линией). * Отличия достоверны по сравнению с группой 0–4 ч, $p < 0.005$, критерий Манна-Уитни. В–Д – вестерн-блот анализ на присутствие теломеразы в поврежденных лизатах обработанных активаторами клеток; 1 – акриламидные гели с окрашиванием Кумасси, 2 – блоты с антителами на теломеразу. Над дорожками подписано время инкубации (ч) с соответствующими индукторами. Стрелками отмечены специфические бэнды 63 и 35 кДа. Приведены результаты трех независимых экспериментов.

во временной точке 8 ч после начала второй индукции для образца ангиогенин+hDNA^{9r}. В других образцах второго эксперимента бэнд не выявляется. Для третьего эксперимента интенсивный бэнд ~35 кДа вместе с бэндом 63 кДа обнаруживается в точке «0», т.е. до начала индукции в клетках колоний образца, обработанного ангиогенином, после отмывки от метилцеллюлозы. По мере инкубации к 32 ч эксперимента интенсивность бэнды 35 кДа падает практически до фоновой отметки. Бэнд 63 кДа исчезает в первый час после второй индукции. В других образцах бэнды не выявляются. Мы обнаружили упоминание о белке 35 кДа, имеющем отношение к теломеразной активности, только в одной работе. Используя аффинную хроматографию при выделении теломеразы, дополнительно к белкам с молекулярной массой 120 и 43 кДа был детектирован белок с молекулярной массой 35 кДа. В работе этот бе-

лок не анализировался, поскольку он не детектировался в препаратах конечно очищенной теломеразы (Lingner, Cech, 1996).

Полученные результаты двух независимых подходов свидетельствуют, что ангиогенин активирует в ГСК молекулярные механизмы, которые индуцируют теломеразную активность. При этом присутствие препарата hDNA^{9r} не отменяет активность данного механизма.

Можно сделать следующие выводы: 1) hDNA^{9r} не индуцирует экспрессию гена теломеразы, а значит, увеличение количества теломерной ДНК не может быть связано с теломеразной активностью; 2) ангиогенин индуцирует экспрессию гена теломеразы, и увеличение количества теломерной ДНК при дот-блот гибридизации может быть связано именно с этой активностью ангиогенина. Совместное использование ангиогенина и hDNA^{9r} тоже приводит

к увеличению синтеза мРНК теломеразы. В проведенных гибридизациях было показано, что в некоторых случаях количество теломерной ДНК в образце, обработанном совместно двумя препаратами, превышает аналогичный показатель, полученный для образцов, обработанных отдельно активаторами. Этот факт может означать, что друг на друга накладываются три механизма увеличения количества теломерной ДНК. Первый – активация теломеразы. Второй – прямая интеграция добавочной теломерной ДНК в геном реципиентной клетки. Третий механизм – репликация квази t-колец, образованных экзогенными теломерными повторами в результате конкатамеризации и замыкания в кольцо.

Обсуждение

Проведенный анализ свидетельствует, что для двух индукторов происходит увеличение теломерной ДНК в клетках колоний двумя независимыми механизмами. Это классический теломераза-зависимый дополнительный синтез в случае ангиогенина и альтернативный механизм удлинения теломеры или истинная интеграция в область теломерного гетерохроматина теломерной ДНК в случае hDNA^{gr}.

Теломераза представляет собой гетеродимер, образованный некодирующей РНК-матрицей (теломеразный РНК-компонент длиной свыше 400 п. н., содержащий базовую теломерную последовательность, комплементарную G-цепи), необходимой для синтеза *de novo* теломерных последовательностей ДНК, и ферментативной субъединицы (теломеразная обратная транскриптаза, TERT). Теломеразный комплекс регулирует поддержание длины теломер, добавляя теломерные повторы к 3' концу хромосомы с использованием РНК-матрицы (см. рис. 1, В). За некоторыми исключениями (например, лимфоциты и эндотелиальные клетки) большинство соматических клеток человека не проявляет теломеразной активности, главным образом из-за подавления экспрессии гена TERT. С другой стороны, стволовые клетки, клетки зародышевой линии и большинство опухолей проявляют теломеразную активность (Chan, Blackburn, 2003; Giraud-Panis et al., 2010; Nandakumar, Cech, 2013; Soman et al., 2022).

Согласно более ранним данным, ангиогенин интернализуют Scf1 (мышь) и CD34 (человек) гемопоэтические стволовые клетки (Рузанова и др., 2024). Также на человеческих клетках костного мозга показано, что обработка ангиогенином стимулирует GM росток кроветворения и индуцирует активность теломеразы. В работе (Goncalves et al., 2016) установлено, что ангиогенин рекомбинантный стимулирует пролиферацию миелоидных предшественников (как и в наших экспериментах), но при этом усиливает покоевые свойства стволовых клеток. Эти характеристики связывают с генерацией стресс-индуцированных tРНК, снижением синтетической активности стволовой клетки крови, усилением синтеза рибосомальных РНК и стимуляцией белкового синтеза в миелоидных клетках предшественников. Возможно, именно следствием первого процесса (стимуляция пролиферации миелоидных предшественников) является обнаружение теломеразы в клетках колоний GM роста, показанное в настоящем исследовании.

Интернализованные фрагменты ДНК инициируют формирование ников, необходимых для перестройки хроматина в направлении выбранного пути терминальной дифференцировки прогениторов, которые и запускают механизм этой дифференцировки (Рузанова и др., 2024). Аналогичная концепция обсуждается в работе (Sjakste, Riekstina, 2021), авторы которой предполагают, что триггером дифференцировки могут быть повреждения ДНК хромосом в стволовых клетках. Следствием появления ников и релаксации хроматина будет индуцированная рекомбинационная ситуация и активация репаративно-рекомбинационной машины, состоящей из многочисленных активных и структурных белков (Nabetani, Ishikawa, 2011). Этот факт означает, что находящиеся во внутриядерном пространстве ГСК исходно экстраклеточные фрагменты ДНК могут принимать участие в рекомбинационных событиях, которые сами и инициировали. Результаты нашего исследования предполагают, что увеличение количества теломерной ДНК при использовании в качестве индуктора hDNA^{gr} подразумевает и/или интеграцию экстраклеточных фрагментов, содержащих теломерные повторы в гомологичные районы теломер, и/или активацию механизма альтернативного удлинения теломер с использованием конкатамеризованных циклизированных теломерных повторов.

Анализ силы гибридизационного ответа свидетельствовал о значительном приросте количества теломерной ДНК в анализируемых образцах, что в большей степени предполагало участие в этом процессе механизма альтернативного удлинения теломер. Одна из наиболее характерных особенностей клеток с активным механизмом альтернативного удлинения теломер – наличие внехромосомных теломерных колец, которые представлены либо двуцепочечными (t-кольца), либо частично одноцепочечными (C- или G-кольца) (Cesare, Griffith, 2004; Wang et al., 2004; Henson et al., 2009). t-кольца являются замкнутой двуцепочечной ДНК. C-кольца – это экстрахромосомальная ДНК теломер с замкнутой в кольцо C-цепью и разорванной аннилированной с ней G-цепью. G-кольца – это экстрахромосомальная ДНК теломер с замкнутой в кольцо G-цепью и разорванной аннилированной с ней C-цепью. Происхождение этих экстрахромосомальных структур обычно связывают с индуцированной разрывом репликацией теломерной ДНК (рис. 5). Известно, что репарация, связанная с разрывами, стимулируется индукцией теломерных двуцепочечных разрывов (McEachern, Haber, 2006; Dilley et al., 2016) и, как свидетельствуют данные настоящего исследования, одноцепочечными разрывами (никами). Репликация, вызванная разрывом, может инициироваться в результате внедрения конца нити разорванного теломерного агрегата между цепями неповрежденной теломеры и идти по типу миграции цепи. Мигрирующая d-петля копирует теломерные повторы от точки проникновения нити к концу донорской теломеры (Saini et al., 2013; Wilson et al., 2013), что сопровождается восстановлением длины и структуры теломеры.

Другой путь восстановления длины теломеры связан с внедрением 3' конца G-цепи теломеры между цепями экстрахромосомальных t- или C-колец. В этом случае индуцируется репликация по типу катящегося кольца,

что приводит к накоплению одноцепочечной G-богатой цепи теломеры (рис. 6, A) (Nabetani, Ishikawa, 2011; Lu W. et al., 2013; Doksani, 2019).

Описано два механизма образования t-, C- и G-колец. t-кольца могут формироваться в результате интрахромосомной рекомбинации и высвобождения t-петли вследствие Холлидеевской рекомбинации 3' конца t-петли, аннилированного с комплементарной последовательностью 3'–5' цепи (см. рис. 5, A) (Wang et al., 2004; Nabetani, Ishikawa, 2011; Claussin, Chang, 2015; Doksani, 2019; Jones et al., 2023). Во втором случае возникают оба варианта C- и G-кольца (см. рис. 5, B).

Показано, что репликативный стресс, связанный с остановкой репликативной вилки в трудно реплицируемом теломерном гетерохроматине или с повреждением ДНК хромосом (например, двуцепочечные разрывы или ники), выпетливает оба варианта колец, содержащих теломерные повторы. При этом G-кольцо способно инициировать репликацию по типу катящегося кольца с ника и синтеза C-богатого хвоста, содержащего теломерные повторы 3'–5' цепи размером до 100 т. п. н., который детектируется как в тестовой системе с phi29 полимеразой, так и *in vivo* (Zhang et al., 2017). Предполагается, что амплифицированный C-одноцепочечный хвост может аннилировать с укороченной G-теломерной цепью (например, после отделения от теломеры t-петли в результате репликативного стресса) и в качестве гомологичной матрицы стимулировать синтез укороченной G-цепи (Zhang et al., 2017). В формировании колец в данном случае задействованы Торо II, механизм NHEJ, активность ДНК-РК (см. рис. 6, B).

Именно за счет амплификации теломерных повторов по предполагаемому механизму катящегося кольца с использованием в качестве матрицы кольцеобразных структур и индуцированной никами репликации можно объяснить увеличение более чем в два раза количества теломерной ДНК в некоторых экспериментах. Известно, что при таком варианте амплификации длина одноцепочечного участка G-цепи может простираться до 70–100 т. п. н. (Doksani, 2019; Jones et al., 2023) (см. рис. 6, A, B).

Присутствие в клетке большого количества C-колец является главным условием механизма альтернативного удлинения теломер. По-видимому, 3' одноцепочечный конец 5'–3' G-цепи может спариться как с t-, так и с C-кольцом, образуя D-петлю

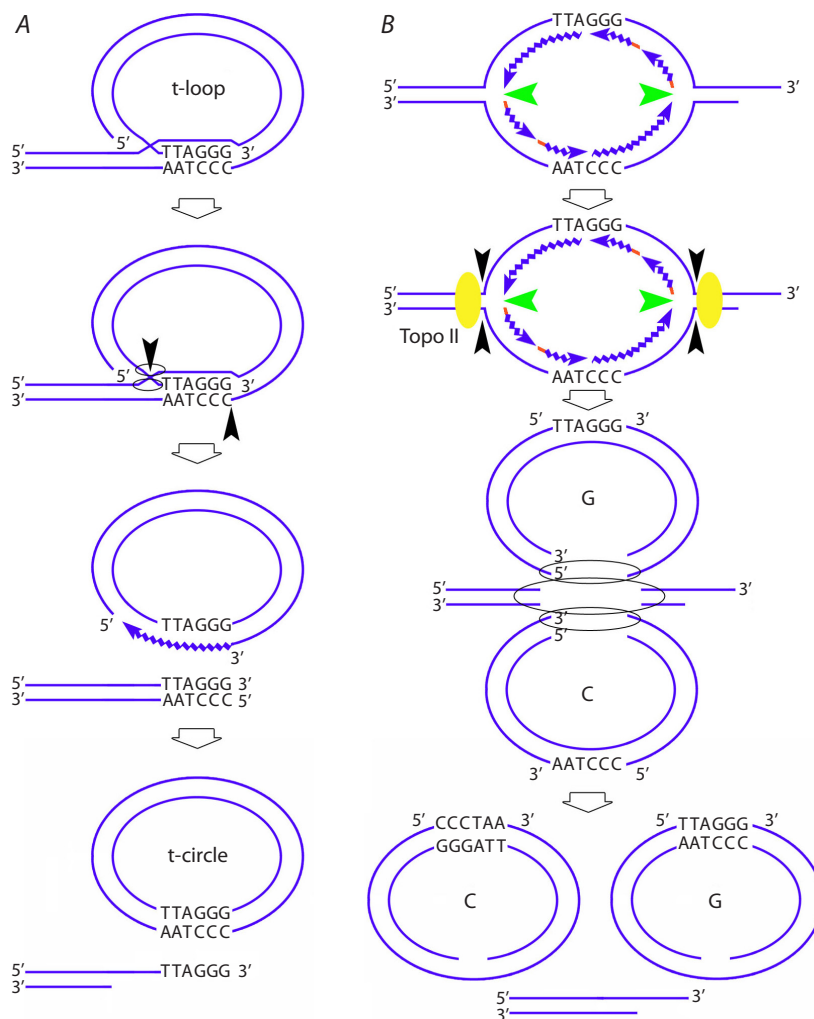


Рис. 5. Механизмы формирования экстрахромосомальных колец.

A – формирование t-кольца в результате отсоединения концевой структуры теломеры t-петли; B – формирование G- и C-колец в результате остановки репликативной вилки, индукции репарации, связанной с разрывами, и выпетливания G- и C-цепей при участии Торо II, механизма NHEJ, активности ДНК-РК (Zhang et al., 2017).

(см. рис. 6, A). Следующие затем многочисленные раунды репликации по типу катящегося кольца амплифицируют теломерные повторы. Количество синтезированных таким образом повторов теломер может быть вырожденным и будет различным для разных теломер разных хромосом (Lee et al., 2014; Jones et al., 2023).

При попадании в ядро экстраклеточных фрагментов, содержащих теломерные повторы, будут происходить следующие события. Иницируется рекомбиногенная ситуация, спровоцированная появлением одноцепочечных разрывов. Если факторы, активированные рекомбиногенной ситуацией, иницированной никами, аналогичны факторам, активированным рекомбиногенной ситуацией, иницированной двуцепочечными разрывами (Dolgova et al., 2013), то интернализованные двуцепочечные фрагменты в течение короткого времени замкнутся в кольцо (Dolgova et al., 2013; Potter et al., 2018, 2024). За время существования в линейной форме они могут интегрировать в геном по механизму *ends in/ends out*. После лигирования в кольцо указанные структуры практически не будут отличаться от t- и C-колец, образующихся при альтернативном удлинении теломер. Это означает, что амплификация теломерной ДНК при интернализации экстраклеточных ДНК в ГСК связана в большей степени

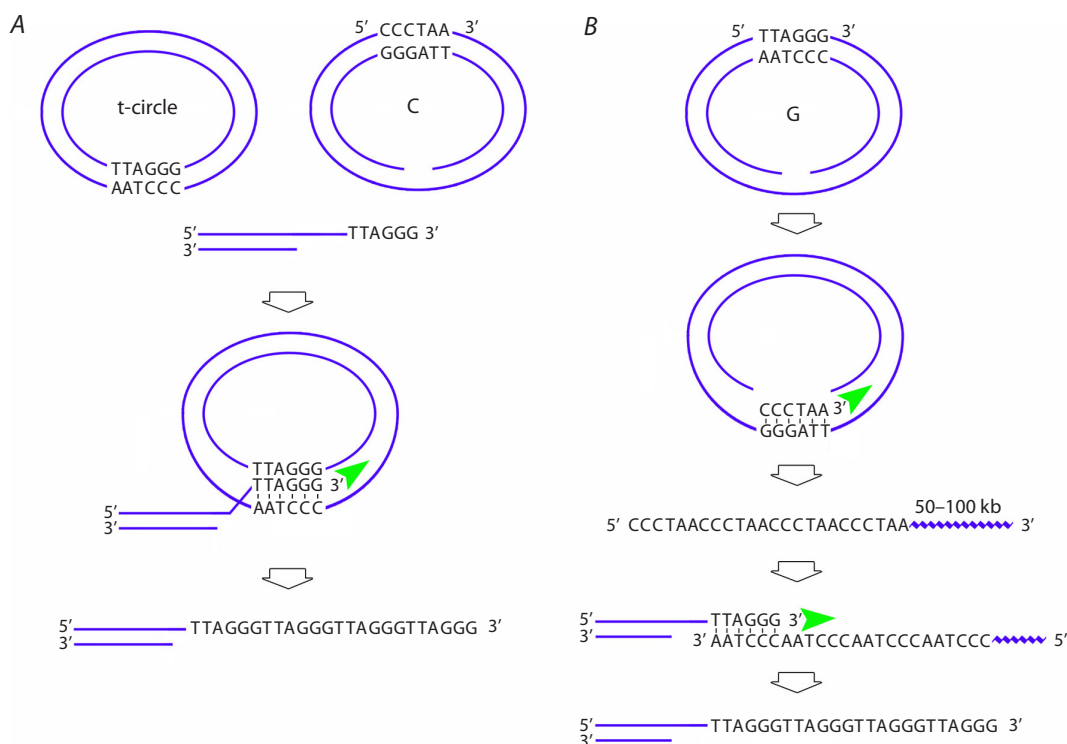


Рис. 6. Механизмы удлинения теломер.

А – удлинение теломерного хвоста по t-кольцу и C-кольцу; В – удлинение теломерного хвоста по G-кольцу (разъяснения см. в тексте).

с удлинением G-цепи теломеры в результате активации репликативного синтеза по механизму катящегося кольца, как предполагается, индуцированного никами. Именно так можно объяснить значительное (более чем в два раза) увеличение количества теломерной ДНК в некоторых экспериментах.

Интеграция внехромосомных фрагментов, содержащих теломерные повторы (приводящая к увеличению теломерной ДНК), также может осуществляться по механизму гомологичной рекомбинации в вариантах *ends in/ends out* (рис. 7) (Rubnitz, Subramani, 1984; Hastings et al., 1993; Cromie et al., 2001; Li et al., 2001; Langston, Symington, 2004). Другие механизмы гомологичного обмена (однонитевой отжиг, геновая конверсия) не будут приводить к увеличению количества ДНК в теломере.

Заключение

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют, что фрагменты экстраклеточной ДНК, доставленные в ГСК и содержащие теломерные повторы, или прямо интегрируют в теломерный гетерохроматин, или становятся матрицей для альтернативного удлинения теломер, что сопровождается увеличением количества теломерной ДНК и, как предполагается, увеличением длины теломер.

Список литературы / References

Лихачева А.С., Рогачев В.А., Николин В.П., Попова Н.А., Шилов А.Г., Себелева Т.Е., Струнkin Д.Н., Черных Е.Р., Гельфгат Е.Л., Богачев С.С., Шурдов М.А. Участие экзогенной ДНК в

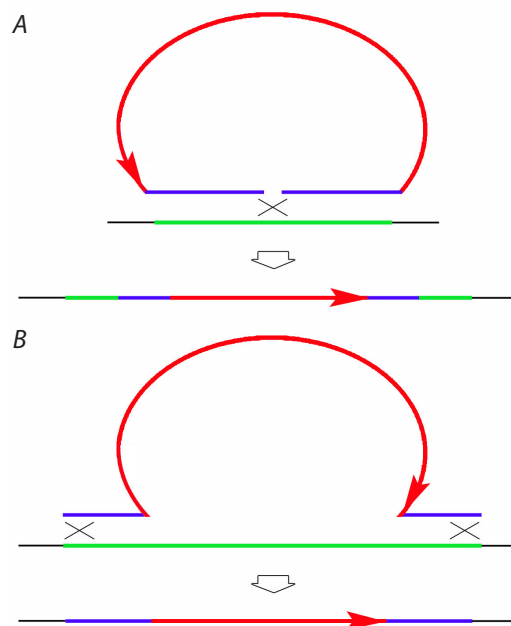


Рис. 7. Механизмы *ends in/ends out* интеграции экстраклеточных фрагментов ДНК в реципиентный геном.

А – интеграция *ends in*; В – *ends out*.

молекулярных процессах, протекающих в соматической клетке. *Информационный вестник ВОГиС*. 2008;12(3):426-473 [Likhacheva A.S., Rogachev V.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Shilov A.G., Sebeleva T.E., Strunkin D.N., Chernykh E.R., Gel'f-

- gat E.L., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Involvement of exogenous DNA in the molecular processes in somatic cell. *Informatsionnyy Vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders*. 2008;12(3):426-473 (in Russian)]
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984 [Maniatis T., Fritch E., Sambrook D. Methods of Genetic Engineering. Molecular Cloning. Moscow: Mir Publ., 1984 (in Russian)]
- Рузанова В.С., Ошихмина С.Г., Прокуркина А.С., Риттер Г.С., Кирикович С.С., Левитес Е.В., Ефремов Я.Р., Карамышева Т.В., Мещанинова М.И., Мамаев А.Л., Таранов О.С., Богачев А.С., Сидоров С.В., Никонов С.Д., Леплина О.Ю., Останин А.А., Черных Е.Р., Колчанов Н.А., Долгова Е.В., Богачев С.С. Концепция природной реконструкции генома. Часть 2. Влияние фрагментов экстраклеточной двуцепочечной ДНК на гемопоэтические стволовые клетки. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(8):993-1007. doi 10.18699/vjgb-24-106
- [Ruzanova V.S., Oshikhmina S.G., Proskurina A.S., Ritter G.S., Kirikovich S.S., Levites E.V., Efremov Y.R., Karamysheva T.V., Meschaninova M.I., Mamaev A.L., Taranov O.S., Bogachev A.S., Sidorov S.V., Nikonov S.D., Leplina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Dolgova E.V., Bogachev S.S. A concept of natural genome reconstruction. Part 2. Effect of extracellular double-stranded DNA fragments on hematopoietic stem cells. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov J Genet Breed*. 2024;28(8):993-1007. doi 10.18699/vjgb-24-106]
- Alanazi A.F.R., Parkinson G.N., Haider S. Structural motifs at the telomeres and their role in regulatory pathways. *Biochemistry*. 2024; 63(7):827-842. doi 10.1021/acs.biochem.4C00023
- Cech T.R., Lingner J., Nakamura T., Chapman K.B., Morin G.B., Harley C.B., Andrews W.H. Telomerase reverse transcriptase. *Patent WO1998/14592*. 1998.
- Cesare A.J., Griffith J.D. Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops. *Mol Cell Biol*. 2004;24(22):9948-9957. doi 10.1128/MCB.24.22.9948-9957.2004
- Chan S.W.L., Blackburn E.H. Telomerase and ATM/Tel1p protect telomeres from nonhomologous end joining. *Mol Cell*. 2003;11(5): 1379-1387. doi 10.1016/S1097-2765(03)00174-6
- Claussin C., Chang M. The many facets of homologous recombination at telomeres. *Microb Cell*. 2015;2(9):308-321. doi 10.15698/MIC 2015.09.224
- Cromie G.A., Connelly J.C., Leach D.R.F. Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans. *Mol Cell*. 2001;8(6):1163-1174. doi 10.1016/S1097-2765 (01)00419-1
- Dilley R.L., Verma P., Cho N.W., Winters H.D., Wondisford A.R., Greenberg R.A. Break-induced telomere synthesis underlies alternative telomere maintenance. *Nature*. 2016;539(7627):54-58. doi 10.1038/nature20099
- Doksani Y. The response to DNA damage at telomeric repeats and its consequences for telomere function. *Genes*. 2019;10(4):318. doi 10.3390/genes10040318
- Dolgova E.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Proskurina A.S., Orishenko K.E., Alyamkina E.A., Efremov Y.R., ... Taranov O.S., Rogachev V.A., Sidorov S.V., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Internalization of exogenous DNA into internal compartments of murine bone marrow cells. *Russ J Genet Appl Res*. 2012;2:440-452. doi 10.1134/S2079059712060056
- Dolgova E.V., Efremov Y.R., Orishchenko K.E., Andrushkevich O.M., Alyamkina E.A., Proskurina A.S., Bayborodin S.I., ... Omigov V.V., Minkevich A.M., Rogachev V.A., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Delivery and processing of exogenous double-stranded DNA in mouse CD34+ hematopoietic progenitor cells and their cell cycle changes upon combined treatment with cyclophosphamide and double-stranded DNA. *Gene*. 2013;528(2):74-83. doi 10.1016/j.gene.2013.06.058
- Giardini M.A., Segatto M., da Silva M.S., Nunes V.S., Cano M.I.N. Telomere and telomerase biology. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2014; 125:1-40. doi 10.1016/B978-0-12-397898-1.00001-3
- Giraud-Panis M.J., Pisano S., Poulet A., Le Du M.H., Gilson E. Structural identity of telomeric complexes. *FEBS Lett*. 2010;584(17): 3785-3799. doi 10.1016/j.febslet.2010.08.004
- Goncalves K.A., Silberstein L., Li S., Severe N., Hu M.G., Yang H., Scadden D.T., Hu G.F. Angiogenin promotes hematopoietic regeneration by dichotomously regulating quiescence of stem and progenitor cells. *Cell*. 2016;166(4):894-906. doi 10.1016/j.cell.2016.06.042
- Hande M.P. DNA repair factors and telomere-chromosome integrity in mammalian cells. *Cytogenet Genome Res*. 2004;104:116-122. doi 10.1159/000077475
- Hastings P.J., McGill C., Shafer B., Strathern J.N. Ends-in vs. ends-out recombination in yeast. *Genetics*. 1993;135(4):973-980. doi 10.1093/genetics/135.4.973
- Henson J.D., Cao Y., Huschtscha L.I., Chang A.C., Au A.Y.M., Pickett H.A., Reddel R.R. DNA C-circles are specific and quantifiable markers of alternative-lengthening-of-telomeres activity. *Nat Biotechnol*. 2009;27(12):1181-1185. doi 10.1038/nbt.1587
- Jones C.Y., Williams C.L., Moreno S.P., Morris D.K., Mondello C., Karlseder J., Bertuch A.A. Hyperextended telomeres promote formation of C-circle DNA in telomerase positive human cells. *J Biol Chem*. 2023;299(5):104665. doi 10.1016/j.jbc.2023.104665
- Langston L.D., Symington L.S. Gene targeting in yeast is initiated by two independent strand invasions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(43):15392-15397. doi 10.1073/pnas.0403748101
- Lee M., Hills M., Conomos D., Stutz M.D., Dagg R.A., Lau L.M.S., Reddel R.R., Pickett H.A. Telomere extension by telomerase and ALT generates variant repeats by mechanistically distinct processes. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(3):1733-1746. doi 10.1093/nar/gkt1117
- Li J., Read L.R., Baker M.D. The mechanism of mammalian gene replacement is consistent with the formation of long regions of heteroduplex DNA associated with two crossing-over events. *Mol Cell Biol*. 2001;21(2):501510. doi 10.1128/MCB.21.2.501-510.2001
- Lingner J., Cech T.R. Purification of telomerase from *Euplotes aediculatus*: requirement of a primer 3' overhang. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(20):10712-10717. doi 10.1073/PNAS.93.20.10712
- Loe T.K., Zhou Li J.S., Zhang Y., Azeroglu B., Boddy M.N., Denchi E.L. Telomere length heterogeneity in ALT cells is maintained by PML-dependent localization of the BTR complex to telomeres. *Genes Dev*. 2020;34(9-10):650-662. doi 10.1101/gad.333963.119
- Lu R., Pickett H.A. Telomeric replication stress: the beginning and the end for alternative lengthening of telomeres cancers. *Open Biol*. 2022;12(3):220011. doi 10.1098/rsob.220011
- Lu W., Zhang Y., Liu D., Songyang Z., Wan M. Telomeres-structure, function, and regulation. *Exp Cell Res*. 2013;319(2):133-141. doi 10.1016/j.yexcr.2012.09.005
- Lundblad V. Telomere maintenance without telomerase. *Oncogene*. 2002;21(4):522-531. doi 10.1038/sj.onc.1205079
- Maizels N., Davis L. Initiation of homologous recombination at DNA nicks. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(14):6962-6973. doi 10.1093/nar/gky588
- McEachern M.J., Haber J.E. Break-induced replication and recombinational telomere elongation in yeast. *Annu Rev Biochem*. 2006;75: 111-135. doi 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133234
- Nabetani A., Ishikawa F. Alternative lengthening of telomeres pathway: recombination-mediated telomere maintenance mechanism in human cells. *J Biochem*. 2011;149(1):5-14. doi 10.1093/jb/mvq119
- Nandakumar J., Cech T.R. Finding the end: recruitment of telomerase to telomeres. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(2):69-82. doi 10.1038/nrm3505
- Pickett H.A., Cesare A.J., Johnston R.L., Neumann A.A., Reddel R.R. Control of telomere length by a trimming mechanism that involves generation of t-circles. *EMBO J*. 2009;28(7):799-809. doi 10.1038/emboj.2009.42

- Potter E.A., Proskurina A.S., Ritter G.S., Dolgova E.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Taranov O.S., Efremov Y.R., Bayborodin S.I., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Efficacy of a new cancer treatment strategy based on eradication of tumor-initiating stem cells in a mouse model of Krebs-2 solid adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2018;9(47):28486-28499. doi 10.18632/oncotarget.25503
- Potter E.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Ruzanova V.S., Efremov Y.R., Kirikovich S.S., Oshikhmina S.G., ... Grivtsova L.U., Kolchanov N.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Stimulation of mouse hematopoietic stem cells by angiogenin and DNA preparations. *Braz J Med Biol Res*. 2024;57:e13072. doi 10.1590/1414-431X2024e13072
- Rovatsos M.T., Marchal J.A., Romero-Fernández I., Fernández F.J., Giagia-Athanosopoulou E.B., Sánchez A. Rapid, independent, and extensive amplification of telomeric repeats in pericentromeric regions in karyotypes of arvicoline rodents. *Chromosome Res*. 2011; 19(7):869-882. doi 10.1007/S10577-011-9242-3
- Rubnitz J., Subramani S. The minimum amount of homology required for homologous recombination in mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 1984;4(11):2253-2258. doi 10.1128/mcb.4.11.2253-2258.1984
- Saini N., Ramakrishnan S., Elango R., Ayyar S., Zhang Y., Deem A., Ira G., Haber J.E., Lobachev K.S., Malkova A. Migrating bubble during break-induced replication drives conservative DNA synthesis. *Nature*. 2013;502(7471):389-392. doi 10.1038/nature12584
- Sjakste N., Riekstina U. DNA damage and repair in differentiation of stem cells and cells of connective cell lineages: a trigger or a complication? *Eur J Histochem*. 2021;65(2):3236. doi 10.4081/ejh.2021.3236
- Soman A., Korolev N., Nordenskiöld L. Telomeric chromatin structure. *Curr Opin Struct Biol*. 2022;77:102492. doi 10.1016/J.SBI.2022.102492
- Vriend L.E.M., Krawczyk P.M. Nick-initiated homologous recombination: protecting the genome, one strand at a time. *DNA repair*. 2017;50:1-13. doi 10.1016/j.dnarep.2016.12.005
- Wang R.C., Smogorzewska A., De Lange T. Homologous recombination generates t-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell*. 2004; 119(3):355-368. doi 10.1016/j.cell.2004.10.011
- Wilson M.A., Kwon Y., Xu Y., Chung W.H., Chi P., Niu H., Mayle R., Chen X., Malkova A., Sung P., Ira G. Pif1 helicase and Polδ promote recombination-coupled DNA synthesis via bubble migration. *Nature*. 2013;502(7471):393-396. doi 10.1038/nature12585
- Zhang T., Zhang Z., Li F., Hu Q., Liu H., Tang M., Ma W., Huang J., Songyang Z., Rong Y., Zhang S., Chen B.P., Zhao Y. Looping-out mechanism for resolution of replicative stress at telomeres. *EMBO Rep*. 2017;18(8):1412-1428. doi 10.15252/embr.201643866

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 04.07.2024. После доработки 10.02.2025. Принята к публикации 10.02.2025.

doi 10.18699/vjgb-25-53

Неклассические модели животных для изучения роли теломер в процессах старения и долголетия

Е.В. Симороз¹, Е. Василевская¹ , Н.А. Аракелян¹, А.Д. Манахов ^{1, 2}, Е.И. Рогаев ^{1, 3}¹ Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия³ Медицинская школа Чан Мансчустерского университета, департамент психиатрии, Шрусбери, США vasilevskaya.e@talantiuspeh.ru

Аннотация. Укорочение теломер играет важную роль в различных клеточных процессах, связанных со старением. Оно ограничивает продолжительность клеточной пролиферации и активирует механизмы, связанные с повреждением ДНК, что, в свою очередь, приводит к репликативному старению. Укорочение теломер отражает биологический, а не хронологический возраст. Механизм восстановления длины теломер осуществляется с помощью фермента теломеразы. Однако в этом процессе необходимо соблюдать баланс, поскольку избыточная активность теломеразы и чрезмерно длинные хромосомы могут привести к развитию онкологических заболеваний. Предполагается, что различия в потенциальной продолжительности жизни могут быть связаны с вариациями в длине теломер у особей одного возраста. Тем не менее последние исследования показывают, что длина теломер может служить лишь приблизительной оценкой скорости старения и, вероятно, не является клинически значимым маркером риска возрастных заболеваний и смертности. Вариации в длине теломер часто обусловлены не только возрастом, но и генетическими изменениями, факторами окружающей среды, а также метаболически затратными процессами, такими как размножение и даже масса тела. Эти факторы могут способствовать ускоренной потере теломер у некоторых видов. Существует мнение, что для изучения роли длины теломер в контексте старения и долголетия классические модели, например мышь (*Mus musculus*) и крыса (*Rattus norvegicus domestica*), не оптимальны, поскольку продолжительность жизни этих животных и длина их теломер не сопоставимы с человеческими. Целесообразно использовать виды с более длительным жизненным циклом. В данном обзоре рассматривается степень корреляции между длиной теломер и долголетием в различных неклассических моделях долгоживущих животных, а также их пригодность для изучения молекулярных механизмов, приводящих к истощению теломер в контексте старения. Важно помнить, что вопрос о причинно-следственной связи длины теломер с продолжительностью жизни по-прежнему требует дальнейшего исследования.

Ключевые слова: длина теломер; теломераза; старение; долголетие; неклассические модели животных

Для цитирования: Симороз Е.В., Василевская Е., Аракелян Н.А., Манахов А.Д., Рогаев Е.И. Неклассические модели животных для изучения роли теломер в процессах старения и долголетия. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(4):496-507. doi 10.18699/vjgb-25-53

Финансирование. Работа В.Е. и А.Н.А. была финансирована федеральной территорией «Сириус». Соглашение 18-03, проект MB-BFT-2403.

Благодарности. Мы благодарим платформу BioRender.com, с помощью которой были сделаны схематические рисунки.

Unconventional animal models to study the role of telomeres in aging and longevity

E.V. Simoroz¹, J. Vasilevska¹ , N.A. Arakelyan¹, A.D. Manakhov ^{1, 2}, E.I. Rogaev ^{1, 3}¹ Research Center for Genetics and Life Sciences, Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Krasnodar region, Russia² Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia³ Department of Psychiatry, UMass Chan Medical School, Worcester, MA, USA vasilevskaya.e@talantiuspeh.ru

Abstract. The progressive shortening of telomeres is significantly implicated in various cellular processes related to aging, including the limitation of cellular proliferative lifespan through the activation of DNA damage response pathways, ultimately leading to replicative senescence. Telomere shortening is considered an indicator of biological age rather than chronological age. The restoration of telomere length is mediated by the enzyme telomerase; however, it is crucial to maintain a balance in this process, as excessive telomerase activity and overly elongated chromosomes may increase the susceptibility of individuals to cancer. It has been proposed that variations in telomere length among individuals of the same chronological age may be associated with differences in potential lifespan. However, recent studies suggest

that telomere length may serve only as a rough estimate of the aging process and is likely not a clinically relevant biomarker for age-related diseases or mortality risk. Furthermore, variations in telomere length are not solely determined by chronological age; rather, they are modulated by a multitude of factors, including genetic predispositions, environmental conditions, and heightened metabolic activities such as reproduction and body weight, which may lead to increased telomere attrition in certain species. It has been argued that traditional animal models, such as the mouse (*Mus musculus*) and the rat (*Rattus norvegicus domestica*), are suboptimal for investigating the relationship between telomere length and aging, as their lifespans and telomere lengths do not adequately reflect those of humans. Consequently, it is recommended to use long-lived species as they would provide a more appropriate framework for such research initiatives. This review aims to examine the correlation between telomere length and longevity in various non-traditional long-lived animal models, evaluating their suitability for investigating the molecular mechanisms underlying telomere attrition in the context of aging. Nevertheless, the question of whether telomere length is a causative factor or a consequence of longevity remains an area that necessitates further investigation.

Key words: telomere length; telomerase; aging; longevity; unconventional animal models

For citation: Simoroz E.V., Vasilevska J., Arakelyan N.A., Manakhov A.D., Rogaev E.I. Unconventional animal models to study the role of telomeres in aging and longevity. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2025; 29(4):496-507. doi 10.18699/vjgb-25-53

Введение

Биологическое старение представляет собой постепенную утрату функций организма после достижения зрелости, что в конечном итоге приводит к его смерти. Существуют различные доказательства, подтверждающие, что длина теломер может служить полезным биомаркером старения и долголетия. Теломеры – это нуклеопротеиновые структуры, которые защищают концы линейных хромосом от деградации ДНК и участвуют в процессах репарации, играя важную роль в стабильности хромосом. С каждым делением клетки теломеры укорачиваются из-за так называемой проблемы репликации концов, особенно под воздействием окислительного стресса, который возникает при дисбалансе между образованием активных форм кислорода и способностью организма к антиоксидантной защите (Allsopp et al., 1995; Armstrong, Boonekamp, 2023).

Предполагается, что длина теломер имеет большое значение в распределении ресурсов между ростом и репродукцией, а также в поддержании соматического состояния клеток (Young, 2018). Данное предположение было сделано исходя из теории старения, предложенной Т. Кирквудом (Kirkwood, 1977; Kirkwood, Rose, 1991). Он выдвинул гипотезу о том, что смертность от старости может быть следствием энергосберегающей стратегии, направленной на снижение регуляции ошибок в соматических клетках. Таким образом, метаболические затраты на раннее воспроизводство могут в будущем привести к дефициту энергоресурсов, необходимых для поддержания стабильного соматического состояния клеток, что, в свою очередь, может ускорить процесс старения и привести к более быстрой смерти. Как известно, у некоторых видов была отмечена негативная корреляция между длиной теломер и активным воспроизводством.

Принцип возрастного укорочения теломер – это сложный процесс. Биологические механизмы, лежащие в его основе, до сих пор не полностью изучены. В частности, остается неясным, является ли теломерное старение аналогом митотических часов или же это, скорее, биомаркер стресса (Koliada et al., 2015; Lin, Epel, 2022). Истощение теломер может быть компенсировано теломеразой – специализированным ферментом, основная функция которого заключается в удлинении теломер. Теломераза представляет собой рибонуклеопротеиновую ДНК-полимеразу, со-

стоящую из двух субъединиц: теломеразной РНК (TER) и обратной транскриптазы теломеразы (TERT). Этот фермент добавляет повторы TTAGGG *de novo* на концы хромосом, тем самым компенсируя их истощение (рис. 1). Теломераза связывается с концом теломеры, начиная с того, что TER взаимодействует с одноцепочечной ДНК на конце хромосомы. TERT использует встроенную РНК в качестве шаблона для синтеза новых повторов ДНК. Обычно это происходит с помощью обратной транскриптазы, которая создает новый участок ДНК, добавляя нуклеотиды к одноцепочечной ДНК теломеры. Синтезируемый фрагмент ДНК дополняет существующий участок, поскольку комплементарные нуклеотиды связываются с шаблоном, что приводит к удлинению теломеры. После синтеза нескольких повторов теломеразы перемещается (или «скользит») вдоль теломеры, позволяя ферменту повторно добавлять новые нуклеотиды к концу хромосомы. Этот процесс повторяется несколько раз и в результате значительно удлиняет теломеру. После синтеза нового участка ДНК одноцепочечная ДНК теломеры может образовывать двойную спираль, соединяясь с комплементарными цепями. Дополнительные ферменты, такие как лигаза и ДНК-полимеразы, тоже участвуют в этом процессе, обеспечивая правильное соединение и завершение структуры теломеры (Nguyen, 2021).

Существуют два основных комплекса защиты теломер: CST (Centriole- and Spindle-associated Telomerase) и шелтерин. Эти комплексы могут функционировать параллельно у большинства млекопитающих, включая человека. Комплекс шелтерина состоит из шести ключевых компонентов: TRF1 и TRF2 (Telomeric Repeat Binding Factor 1, 2), TIN2 (белок, взаимодействующий с TRF1), TPP1 (Telomeric Protein 1), POT1 (Protection of Telomeres 1) и RAP1 (Repressor-Activator Protein 1). Комплекс CST включает три компонента: Ctc1 (Cell Cycle Protein 1), Stn1 (Suppressor of Telomere Lengthening 1), Ten1 (Telomere Length Maintenance 1). Оба комплекса играют важную роль в защите и поддержании структуры теломер, а также участвуют в регуляции их длины (Jenner et al., 2022; Zaugg et al., 2022). Активность теломеразы высока на ранних стадиях внутриутробного развития человека, однако она значительно ограничена в большинстве нормальных клеток взрослого организма. Когда теломеры достигают кри-

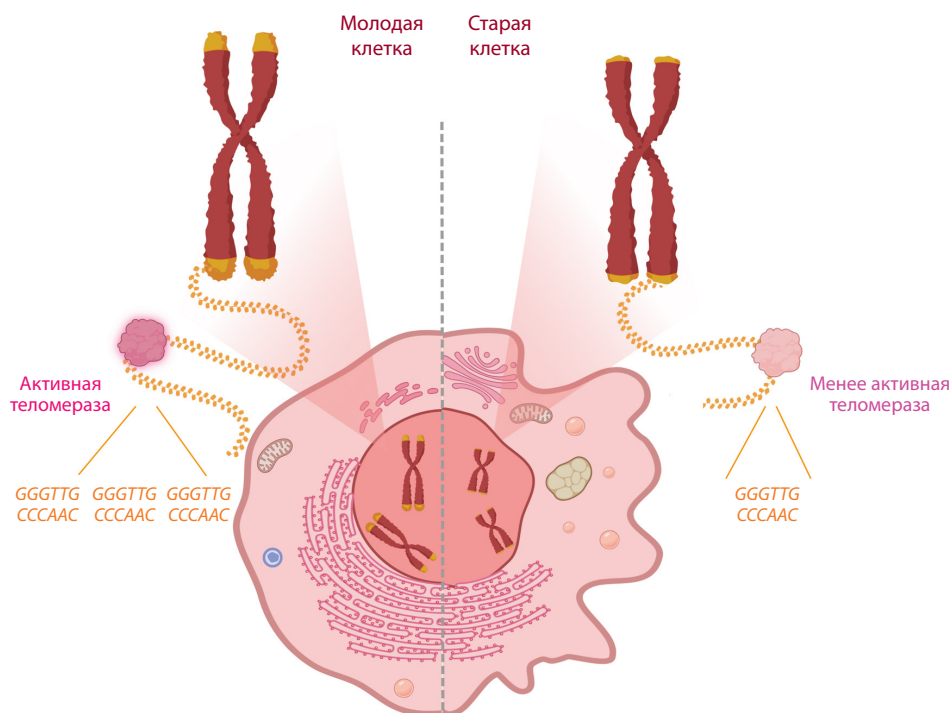


Рис. 1. Изменение длины теломер в зависимости от возраста и активности теломеразы.

тически короткой длины, они вызывают стойкую реакцию на повреждение ДНК, что, в свою очередь, приводит к различным клеточным процессам, таким как клеточное старение и/или апоптоз. Кроме того, это ухудшает способность стволовых клеток к регенерации тканей. Ускоренное сокращение теломер – характерная черта возрастных заболеваний, влияющая на общее состояние здоровья и продолжительность жизни (Rossiello et al., 2022).

Исследования показали, что длина теломер может предсказывать продолжительность жизни у людей. Например, у долгожителей наблюдаются более длинные теломеры, и установлено, что их потомство наследует этот признак (Atzmon et al., 2010). Кроме того, у здоровых долгожителей теломеры значительно длиннее, чем у тех, кто страдает от различных заболеваний (Terry et al., 2008). Тем не менее не все исследования подтверждают этот факт, что вызывает сомнения в возможности использования длины теломер в качестве надежного маркера долголетия (Arai et al., 2015).

В большинстве случаев для изучения молекулярных механизмов старения и долголетия использовались классические модели животных, такие как мышь (*Mus musculus*) и крыса (*Rattus norvegicus domestica*) (Sahm et al., 2018). Исследования с использованием генетически модифицированных мышей с гипердлинными теломерами показали, что у этих животных наблюдается меньше повреждений ДНК в процессе старения. Также таким мышам характерно худшее телосложение, низкий уровень холестерина, повышенная чувствительность к глюкозе и инсулину. Они реже страдают от рака и имеют более продолжительную жизнь (Muñoz-Lorente et al., 2019). Важно помнить, что эти знания не всегда можно экстраполиро-

вать на человека, поскольку наблюдаются значительные различия между динамикой теломер у мышей и человека. Например, продолжительность жизни мышей в 30 раз короче, чем у людей, в то время как теломеры у них в 5–10 раз длиннее и укорачиваются примерно в 100 раз быстрее. Кроме того, в субтеломерных областях имеются значительные различия в организации повторяющихся элементов и в комплексе шелтерина (Vera et al., 2012; Smoom et al., 2023). Полное отсутствие теломеразы слабо проявляется в фенотипе на протяжении нескольких поколений у мышей, тогда как гетерозиготности по мутациям теломеразы у людей достаточно, чтобы вызвать дефекты регенерации органов и способствовать развитию рака (Calado, Dumitriu, 2013). К тому же большинство исследований проводится на определенных инбредных штаммах грызунов, таких как мыши C57BL/6 и BALB/c (Bernardes de Jesus et al., 2012). Однако продолжительность жизни в естественных популяциях значительно превышает ту, которая достигается у инбредных штаммов благодаря антивозрастным вмешательствам в лабораторных условиях (Miller et al., 2002). Все это привело к мнению о целесообразности применения альтернативных моделей, отличающихся экстремальной продолжительностью жизни, для изучения механизмов укорочения теломер и их использования в качестве надежного биомаркера в процессах старения и долголетия.

В данном обзоре рассматриваются неклассические долгоживущие модели животных, обладающие различными преимуществами, способными подтвердить или опровергнуть роль теломер как биомаркера, определяющего возраст и предсказывающего продолжительность жизни (см. таблицу).

Исследование взаимосвязи между длиной теломер, активностью теломеразы и возрастом
на различных неклассических моделях животных

Модель животного	Продолжительность жизни	Признак, с которым ассоциирована длина теломер	Активность теломеразы	Исследуемые ткани	Тип анализа
Южный гигантский буревестник <i>Macronectes giganteus</i>	12–40 лет	Длина теломер ассоциирована с ожидаемой продолжительностью жизни	Нет данных	Кровь	Саузерн-блот
Птицы отряда Psittaciformes	33–65 лет (долгоживущие) 10–17 лет (короткоживущие)	Длина теломер коррелирует с продолжительностью жизни	Нет данных	Кровь	ПЦР в реальном времени
53 вида птиц	Нет данных	Длина теломер коррелирует с продолжительностью жизни, меньшими кладками и медленным эмбриональным ростом	Нет данных	Нет данных	Метаанализ
19 видов птиц	7–50 лет	Длина теломер коррелирует с продолжительностью жизни	Нет данных	Кровь	TRF
Зебровая амадина <i>Taeniopygia guttata</i>	5 лет (короткоживущие)	Нет данных	У короткоживущих видов активность теломеразы снижается с возрастом.	Ткани умерщвленных птиц	TRAPeZe® XL
Древесная ласточка <i>Tachycineta bicolor</i>	11 лет (короткоживущие)		У долгоживущих активность теломеразы остается постоянной		
Речная крачка <i>Sterna hirundo</i>	27 лет (долгоживущие)				
Северная качурка <i>Oceanodroma leucorhoa</i>	36 лет (долгоживущие)				
Большой подковонос <i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	30 лет	Длина теломер коррелирует с продолжительностью жизни	Нет данных	Биопсия крыла	ПЦР в реальном времени (Cawthon)
Обыкновенный длиннокрыл <i>Miniopterus schreibersii</i>	22 года				
Ночницы, род <i>Myotis</i>	37–40 лет	Нет корреляции длины теломер с возрастом, есть корреляция с факторами окружающей среды	Увеличение экспрессии 20 генов, связанных с поддержанием теломер и репарацией ДНК	Биопсия крыла, буккальные мазки	TRF, ПЦР в реальном времени (Cawthon)
Малая бурая ночница <i>Myotis lucifugus</i>	34 года (Puechmaile et al., 2011)	Нет корреляции длины теломер с возрастом, есть корреляция с грибковым заболеванием	Нет данных	Биопсия крыла, буккальные мазки	ПЦР в реальном времени (Cawthon)
Родригесская летучая лисица <i>Pteropus rodricensis</i>	28 лет	Нет корреляции длины теломер с возрастом	Нет данных	Биопсия крыла, буккальные мазки	ПЦР в реальном времени (Cawthon)
Большой бурый кожан <i>Eptesicus fuscus</i>	19 лет ¹				
Бразильский складчатогуб <i>Tadarida brasiliensis</i>	8 лет ²				
Океанический куахог <i>Arctica islandica</i>	10–226 лет (максимум 507 лет)	Постоянная длина теломер	Постоянная активность теломеразы	Ткани стопы и мышцы Жаберная ткань	ДНК секвенирование Саузерн-блот, ПЦР в реальном времени
Стилофора <i>Stylophora pistillata</i>	3–6 месяцев (Bythell et al., 2018)	Нет корреляции длины теломер с возрастом, есть корреляция с темнотой	Снижение экспрессии белка Pot2	Кончики веток	TRF, саузерн-блот

Окончание таблицы

Модель животного	Продолжительность жизни	Признак, с которым ассоциирована длина теломер	Активность теломеразы	Исследуемые ткани	Тип анализа
Вид акропоридных кораллов <i>Acropora digitifera</i>	Три стадии развития: сперматозоиды, личинки планулы и полипы взрослых колоний	Длина теломер коррелирует с возрастом и скоростью пролиферации клеток	Нет данных	Сперма, личинка планулы и полипы взрослых колоний	TRF
Поциллопора <i>Pocillopora</i> spp. (короткоживущие)	Нет данных	Длина теломер короткоживущих колоний больше зависит от сезонных колебаний температуры по сравнению с долгоживущими колониями	Нет данных	Верхние и нижние сегменты коралловых ветвей	TRF
Поритес <i>Porites</i> spp. (долгоживущие)	421–438 лет (Smith et al., 2021)				
Красный морской еж <i>Mesocentrotus franciscanus</i>	Более 100 лет	Постоянная длина теломер	Постоянная активность теломеразы. Высокая экспрессия генов, отвечающих за поддержание стабильности ДНК	Аристотелев фонарь, пищевод, пучок лучевого нерва	РНК секвенирование
Морской еж <i>Stomopneustes variolaris</i>	3–4 года	Постоянная длина теломер	Постоянная активность теломеразы	Икра	ДНК секвенирование
Американский омар <i>Homarus americanus</i>	До 100 лет	Нет данных	Постоянная высокая активность теломеразы	Ткани	TRAP-ПЦР, ДНК секвенирование
Голый землекоп <i>Heterocephalus glaber</i>	37 лет	Длина теломер коррелирует с продолжительностью жизни	Низкая активность теломеразы	Лимфоциты костного мозга	qFISH
				Сердце, печень, селезенка, почка, кожа, легкое, яичко	TRAP-ПЦР
				Кожа, почки, легкие, роговица	TRF
Азиатский слон <i>Elephas maximus</i>	60–70 лет	Нет корреляции длины теломер с возрастом, но есть корреляция с массой тела	Нет данных	Фибробласты из кожи, почек, легких или роговицы	TRF
Южная фонарная акула <i>Etmopterus granulosus</i>	48–57 лет ³	Нет корреляции длины теломер с возрастом, но есть корреляция с массой тела	Нет данных	Мышечная ткань	ПЦР в реальном времени
Гренландская акула <i>Somniosus microcephalus</i>	400 лет	Нет данных	Нет данных	Мышечная ткань, печень	РНК секвенирование
28 горбатых китов <i>Megaptera novaeangliae</i>	95 лет ⁴	Длина теломер коррелирует с продолжительностью жизни	Нет данных	Кожа	ПЦР в реальном времени
Усатые киты Mysticeti	75–100 лет ⁵	Нет корреляции длины теломер с возрастом, но есть корреляция с массой тела	Нет данных	Кожа	ПЦР в реальном времени
Зубатые киты Odontoceti	58–62 года ⁶				

Примечание. TRF – анализ концевых рестрикционных фрагментов; ПЦР – полимеразная цепная реакция; qFISH – количественная флуоресцентная гибридизация *in situ*; TRAPeze® XL – флуоресцентный анализ теломеразной активности. Источник, содержащий данные о возрасте животных:

¹ https://animaldiversity.org/accounts/Eptesicus_fuscus/#:~:text=Lifespan%2FLongevity,die%20in%20their%20first%20winter
² https://animaldiversity.org/accounts/Tadarida_brasiliensis/
³ https://fish.gov.au/docs/SharkReport/2023_FRDC_Etmopterus_granulosus%20_final.pdf
⁴ https://animaldiversity.org/accounts/Megaptera_novaeangliae/
⁵ <https://marilimitado.com/blog/fin-whale/>
⁶ <https://dlnr.hawaii.gov/dar/whales-and-dolphins/>

Птицы

Птицы представляют собой уникальную модель для изучения ключевых клеточных механизмов, которые способствуют долгой продолжительности жизни. Несмотря на высокие энергетические затраты в течение жизни, большинство птиц можно охарактеризовать как долгоживущих гомеотермов с умеренно медленным старением. Птицы живут дольше млекопитающих того же размера, и основные процессы старения у птиц, включая клеточные реакции на окислительный стресс и динамику теломер, часто аналогичны процессам, наблюдаемым у млекопитающих (Harper, Holmes, 2021).

В исследовании (Foote et al., 2011) была проанализирована длина теломер как показатель взаимосвязи жизненного цикла и приспособленности на примере южного гигантского буревого (Macronectes giganteus). В группе взрослых особей, возраст которых варьировал от 12 до 40 лет, длина теломер оказалась не связана с возрастом. Однако особи, которые умерли в течение 8-летнего периода после измерения длины теломер, имели значительно более короткие теломеры по сравнению с теми представителями, кто пережил этот период, независимо от возраста или пола. Эти результаты говорят о том, что относительно короткая длина теломер может служить маркером для прогнозирования ожидаемой продолжительности жизни, а также потенциальным показателем состояния здоровья у взрослых особей (Foote et al., 2011). В другом исследовании у долго- и короткоживущих птиц отряда Psittaciformes на протяжении четырех лет анализировали длину теломер в эритроцитах и маркеры окислительного стресса в плазме. Долгоживущие птицы (33–65 лет) отличались более длинными теломерами по сравнению с короткоживущими (10–17 лет), но у них наблюдалась более высокая скорость укорочения теломер. Важно отметить, что в ходе работы была выявлена значимая корреляция между скоростью укорочения теломер и уровнем накопленного окислительного стресса у короткоживущих птиц, что способствовало лучшему пониманию причин и динамики изменений длины теломер (Domínguez-de-Barros et al., 2023, 2024).

Считается, что виды с более низкими метаболическими затратами на размножение в молодом возрасте способны развивать более эффективные механизмы поддержания и восстановления соматических клеток. В свою очередь, это может способствовать увеличению потенциальной продолжительности жизни и замедлению процессов старения. В 2021 г. был проведен филогенетический метаанализ, основанный на данных о 53 видах птиц, в ходе которого изучались взаимосвязи между средней длиной теломер у цыплят и взрослых особей, средней скоростью изменения длины теломер на протяжении жизни, а также признаками жизненного цикла. Результаты показали, что независимо от размера тела, долгоживущие виды с меньшими кладками и более медленной скоростью эмбрионального роста демонстрируют меньшее снижение длины теломер на протяжении своей жизни (Criscuolo et al., 2021). Похожие результаты были получены в другом исследовании, где длина теломер была проанализирована у 19 видов птиц, продолжительность жизни которых варьировала от 7 до 50 лет. У видов с большей продолжительностью жизни

наблюдалось медленное снижение длины теломер по сравнению с видами, имевшими более короткую продолжительность жизни (Tricola et al., 2018).

Активность теломеразы определяет скорость снижения длины теломер и, по всей вероятности, напрямую влияет на продолжительность жизни. В одной из работ была проанализирована активность теломеразы в костном мозге двух видов короткоживущих птиц: зебровых амадин (*Taeniopygia guttata*) и древесных ласточек (*Tachycineta bicolor*), максимальная продолжительность жизни которых составляет 5 и 11 лет соответственно. Также были рассмотрены два вида долгоживущих птиц: речные крачки (*Sterna hirundo*) и качурки Лича (*Oceanodroma leucorhoa*), которые живут 27 и 36 лет соответственно. Результаты показали, что у птенцов короткоживущих видов наблюдалась высокая активность теломеразы, однако она резко снижалась как у молодых, так и у старых взрослых особей. В то же время у двух долгоживущих видов активность теломеразы в костном мозге оставалась относительно высокой и не снижалась с возрастом (Hausmann et al., 2004).

В заключение, врожденные механизмы борьбы со старением у птиц делают их более подходящими моделями для изучения долголетия по сравнению с короткоживущими лабораторными грызунами. Исследования птиц могут в конечном итоге помочь выявить пути терапевтического вмешательства при заболеваниях, связанных со старением человека.

Летучие мыши

Летучие мыши являются уникальным объектом для изучения процессов старения и долголетия. Подобно птицам, они обладают необычным для млекопитающих сочетанием небольших размеров тела и продолжительной жизни. Например, особи вида *Myotis brandtii* могут жить до 40 лет и более (Garg et al., 2023), тогда как *M. myotis* в среднем живут около 37 лет, *Rhinolophus ferrumequinum* – около 30 лет, а *Miniopterus schreibersii* – примерно 22 года (Foley et al., 2018).

Данные о длине теломер у летучих мышей противоречивы. Например, у *R. ferrumequinum* и *M. schreibersii* теломеры укорачиваются с возрастом, в то время как у рода *Myotis*, который отличается наибольшей продолжительностью жизни, этого не наблюдается (Gomes et al., 2011; Ineson et al., 2020). Кроме того, у таких видов, как *Myotis lucifugus*, *Pteropus rodricensis*, *Eptesicus fuscus* и *Tadarida brasiliensis*, укорочение теломер не коррелировало с возрастом. Однако было замечено, что у особей *M. lucifugus*, пораженных грибковым заболеванием «синдром белого носа» (WNS), теломеры оказались значительно короче по сравнению с особями, не имевшими инфекции (Ineson et al., 2020). Это служит дополнительным подтверждением гипотезы о том, что внешние факторы могут влиять на длину теломер и она не всегда связана со старением.

Анализ наличия теломеразы в фибробластах крыльев и клетках крови у *M. myotis* показал, что экспрессия этого фермента отсутствует, что говорит о наличии других механизмов, поддерживающих длину теломер. Более детальное исследование выявило значительное увеличение экспрессии 20 генов, связанных с поддержанием теломер и

репарацией ДНК, у летучих мышей рода *Myotis* по сравнению с другими млекопитающими. Среди этих генов можно выделить *Atm* и *SETX*, которые, как было установлено, эволюционируют под воздействием дивергентного отбора в роде *Myotis*, а также *Abl1*, *Cct4*, *Dclre1a*, *Dot1l*, *Gnl3l*, *Mlh3*, *Mrell1a*, *Parp1*, *Rad50*, *Rbl1*, *Rfc3*, *Rpal*, *Sde2*, *Ssb*, *Terf2ip*, *Wrap53*, *Wtn*, *Xrcc5*, которые могут способствовать геномной стабильности у летучих мышей. Также установлено, что изменения средней и минимальной температуры, количество осадков и скорость ветра значительно коррелируют с длиной теломер у летучих мышей (Foley et al., 2020). Таким образом, длина теломер может служить маркером старения и долголетия лишь в определенных случаях, и это не касается большинства видов летучих мышей. Тем не менее данная модель может быть полезной для изучения влияния стресса на теломеры. В будущем целесообразно выяснить, связаны ли различия в длине теломер с размером тела или стратегиями жизненного цикла, такими как зимовка или спячка.

Моллюски

Еще одной интересной моделью являются моллюски. Наиболее тщательно изучен североатлантический океанический куахог (*Arctica islandica*) – долгоживущий двусторчатый моллюск, для которого задокументирована самая длинная продолжительность жизни – не менее 507 лет. Эти организмы демонстрируют высокую устойчивость к различным факторам окружающей среды, таким как повышенная соленость, температура и уровень кислорода. Следует отметить, что аномально высокая продолжительность жизни характерна для исландской популяции *A. islandica*, в то время как для популяций в Балтийском и Белом морях максимальная продолжительность жизни составляет 30–50 лет (Basova et al., 2012; Gruber et al., 2015).

Изучение длины теломер и теломеразы у самого долгоживущего неколонизального организма, *A. islandica*, имеет большое значение для понимания роли поддержания длины теломер в достижении экстремально высокой продолжительности жизни. После анализа коротко- и долгоживущих популяций молодых и старых животных (возрастом от 10 до 226 лет) была выявлена высокая гетерогенность длины теломер у *A. islandica*. В целом постоянные активность теломеразы и длина теломер наблюдались на всех возрастных этапах, при этом ни один из факторов не коррелировал с возрастом или средой обитания популяции. Предполагается, что стабильное поддержание теломер может способствовать долгой продолжительности жизни *A. islandica*, однако динамика теломер не объясняет их экстремально долгую жизнь (Gruber et al., 2014). К настоящему времени ничего не известно о молекулярных механизмах и возможных мутациях, поскольку геном *A. islandica* не опубликован. Таким образом, уникальные факторы, определяющие продолжительность жизни этого организма, еще предстоит выяснить.

Кораллы

Благодаря своей продолжительности жизни кораллы представляют собой интересную, но пока недостаточно

исследованную модель для изучения реакции теломер на старение и стрессовые факторы окружающей среды. Недавние радиоуглеродные датировки глубоководных белковых кораллов *Gerardia* sp. и *Leiopathes* sp. показали, что их радиальные скорости роста составляют всего 4–35 мкм в год, а продолжительность жизни отдельных колоний достигает тысяч лет. Самые долгоживущие особи *Gerardia* sp. и *Leiopathes* sp. имели возраст 2742 и 4265 лет соответственно (Roark et al., 2009).

В экспериментах с кораллами акцент обычно делается на роли теломер в реакции на стресс. Например, A. Rouan с коллегами (2022) рассматривали изменения теломер у симбиотического коралла *Stylophora pistillata*, который находился в условиях постоянной темноты на протяжении шести месяцев. Стрессовое состояние привело к потере симбионтов. Было установлено, что постоянная темнота связана с укорочением длины ДНК теломер и снижением экспрессии белка Pot2. У млекопитающих этот белок образует гетеродимерный комплекс с Trp1 и играет решающую роль в привлечении теломеразы к теломерам. Однако авторы не проводили параллель с возрастом и ускоренным старением (Rouan et al., 2022). В другом эксперименте была проверена возможность использования длины теломер для оценки возраста колониальных кораллов на примере *Acropora digitifera* на трех стадиях развития: сперматозоиды, личинки планулы и полипы взрослых колоний (Tsuta et al., 2014). Выяснилось, что длина теломер уменьшается в процессе развития кораллов, достигая максимального значения у сперматозоидов и минимального – у полипов взрослых колоний. Однако на длину теломер влияет не только хронологический возраст полипов, но и скорость пролиферации клеток. Таким образом, можно сделать вывод, что оценка точного возраста кораллов на основе длины теломер может привести к неоднозначным результатам (Tsuta et al., 2014).

Долгосрочный и краткосрочный температурный режим воды является ключевым фактором, влияющим на межколониальные изменения в Тихом океане. В этом контексте была проанализирована длина теломер у короткоживущих, более чувствительных к стрессу колоний *Pocillopora* spp. и долгоживущих, более устойчивых к стрессу колоний *Porites* spp. Исследование показало, что длина ДНК теломер у короткоживущих колоний в значительной степени зависела от сезонных колебаний температуры. В то же время длина ДНК теломер у долгоживущих колоний не поддавалась влиянию сезонных закономерностей, а скорее определялась прошлыми тепловыми аномалиями (Rouan et al., 2023).

В заключение можно сказать, что длина теломер у кораллов в значительной степени зависит от окружающей среды. Механизмы поддержания теломер связаны с продуктивностью организмов, что имеет важное значение в контексте влияния изменения климата на здоровье. Тем не менее эти организмы нельзя считать наилучшей моделью для изучения механизмов старения и продолжительности жизни, поскольку их уникальные экологические адаптации и медленный метаболизм могут затруднить обобщение результатов на более сложные многоклеточные организмы.

Морские ежи

Морские ежи – интересный модельный объект для изучения биологии развития, долголетия и старения. Среди них можно выделить как короткоживущие виды, такие как *Lytechinus variegatus* и *L. pictus*, чья продолжительность жизни не превышает четырех лет, так и долгоживущие *Mesocentrotus franciscanus*, *Strongylocentrotus purpuratus*, *Echinometra mathaei* и *Stomopneustes variolaris*, которые могут жить более 100 лет и считаются одними из самых долгоживущих организмов. Геномы некоторых видов этих животных уже опубликованы и могут быть использованы для изучения геномных особенностей в контексте долголетия (Sea Urchin Genome Sequencing Consortium et al., 2006; Sergiev et al., 2016; Polinski et al., 2024). Поскольку данные организмы демонстрируют индетерминантный рост, способны сохранять репродуктивную активность и не характеризуются увеличением уровня смертности с возрастом, они представляют собой идеальную модель для изучения феномена отрицательного старения (Ebert, 2019).

Исследования, проведенные в рамках известных теорий старения, таких как изменение длины теломер, показали, что и коротко-, и долгоживущие виды морских ежей не проявляют многих признаков старения. Эти морские существа сохраняют длину теломер и активность теломеразы. Кроме того, у них сохраняются антиоксидантная и протеасомная активность ферментов, а также наблюдается незначительное накопление окислительных клеточных повреждений с возрастом. Регенеративный потенциал остается высоким на протяжении всей жизни, независимо от ее продолжительности (Francis et al., 2006; Du et al., 2013). Для изучения механизмов, связанных с долголетием и старением на данной модели, был проведен сравнительный анализ экспрессии генов в лучевом нервном канатике у *M. franciscanus* разных возрастов. В результате удалось выявить более 4000 дифференциально экспрессируемых генов, которые охватывают широкий спектр клеточных функций и молекулярных путей, включая нервную функцию, метаболизм и поддержание стабильности ДНК. При этом два гена, экспрессия которых с возрастом возрастала, участвуют в поддержании длины теломер (Polinski et al., 2020).

Т. Aramburu с коллегами (2020) сравнили аминокислотную последовательность теломерсвязывающего белка Pot1, который играет ключевую роль в поддержании длины теломер за счет регуляции теломеразы-опосредованного удлинения. На клеточных культурах было установлено, что мутации в кодирующем гене приводят к различным фенотипам теломер, а его отсутствие вызывает старение клеток (Zade, Khattar, 2023). 198-я аминокислота Pot1 различается у разных организмов. У долгоживущих видов, таких как красный морской еж и летучая мышь (*M. brandtii*), в этой позиции находится валин, тогда как у короткоживущих морских ежей и летучих мышей – треонин и серин. Интересно, что у человека, как и у долгоживущего голого землекопа, 198-я аминокислота представлена изолейцином (Sergiev et al., 2016).

Хотя длина теломер не служит маркером долголетия и старения в этих моделях, они очень интересны для изучения механизмов долголетия и поддержания стабильности ДНК.

Членистоногие

Ракообразные – группа членистоногих, отличающаяся изменчивостью размера и структуры своего генома. Например, *Homarus* – это род омаров, представители которого, по оценкам, могут жить до 50 лет в дикой природе и до 100 лет в неволе. Они продолжают расти на протяжении всей жизни, способны регенерировать конечности даже в преклонном возрасте, а старые особи могут быть более плодовитыми, чем молодые (Koorman et al., 2015; Bowden et al., 2020). Любопытным представителем этой группы является также американский омар (*H. americanus*). Этот вид примечателен своей продолжительностью жизни, которая может достигать 100 лет. Омары являются интересными объектами для изучения долголетия, старения и функций теломераз, так как могут содержать важную информацию о молекулярных механизмах, лежащих в основе таких необычных признаков долголетия. Однако опубликовано крайне ограниченное количество данных по этой модели (Louzon et al., 2019).

У омаров процесс старения протекает медленно, поэтому было интересно проанализировать активность теломеразы у этих организмов. В работе 1998 г. высокая активность теломеразы была обнаружена во всех органах лобстера *H. americanus*, на основании чего авторы сделали вывод о том, что активация теломеразы является консервативным механизмом, способствующим поддержанию долгосрочной способности клеток к пролиферации и предотвращению старения не только в клеточных моделях или на эмбриональных стадиях, но и у взрослых многоклеточных организмов (Klapper et al., 1998). Геном омара был изучен на наличие генов, способствующих стабильности ДНК. Анализ расширенных семейств генов у омаров по сравнению с короткоживущими членистоногими позволил обнаружить гены *Fancs* и *Ddb2*, которые участвуют в поддержании целостности генома (Polinski et al., 2021). Примечательно, что отсутствуют данные о корреляции между длиной теломер и возрастом омаров, что подчеркивает необходимость проведения дальнейших исследований.

Голый землекоп

Голый землекоп (*Heterocephalus glaber*) – еще одно уникальное животное, обладающее удивительно долгой жизнью, превышающей 38 лет. Классические признаки старения, такие как снижение репродуктивной функции, нейродегенеративные заболевания и рак, у этого организма проявляются лишь в незначительной степени (Yang et al., 2024). В ходе эксперимента была проанализирована длина теломер у голых землекопов в трех возрастных группах: молодых, взрослых и старых. Обнаружено, что длина теломер увеличивается с возрастом по сравнению с молодой категорией, хотя авторы отмечают, что размер выборки был небольшим. Проведенные наблюдения подтверждают гипотезу о сохранении теломер у этих животных с возрастом (Leonida et al., 2020). У голых землекопов зафиксирована низкая активность теломеразы (Seluanov et al., 2007) и в сравнительном анализе выявлена отрицательная корреляция между уровнями экспрессии теломеразы и размерами грызунов (Gomes et al., 2011). На сегодняшний день роль теломер в процессе старения остается неясной,

и голые землекопы могут быть интересным объектом для поиска новых подходов изучения взаимосвязей между теломерами и старением.

Крупные животные (слоны, киты и акулы)

Продолжительность жизни крупных млекопитающих во многом определяется условиями обитания, поведенческими стратегиями и физиологическими адаптациями. Например, лесные слоны (*Loxodonta cyclotis*), масса которых может составлять 2000–2500 кг, живут в среднем около 50 лет, тогда как африканские саванные (*L. africana*, вес 4000–7000 кг) и азиатские слоны (*Elephas maximus*, вес 2500–5500 кг) – до 60–70 лет. Такие межвидовые различия в долголетию создают удобную модель для изучения молекулярных механизмов старения, включая динамику теломер (Crawley et al., 2017; Chusyd et al., 2021).

Сопоставление данных о длине теломер у видов с контрастной продолжительностью жизни свидетельствует о том, что начальные показатели длины теломер могут играть роль в обеспечении долголетия. К примеру, у азиатских слонов выявлена относительно большая длина теломер в молодом возрасте по сравнению с чихуахуа – мелкой породой собак, отличающейся значительно меньшей продолжительностью жизни, чья масса не превышает 1–3 кг. Несмотря на это изначальное преимущество, темпы укорочения теломер у слонов и чихуахуа со временем сходны. Данный факт указывает на то, что, хотя изначальная длина теломер может частично определять максимальный возраст, сам процесс их сокращения с возрастом является относительно консервативным межвидовым признаком.

Важным аспектом, связанным с межвидовыми различиями в долголетье, считается активность теломеразы и ее связь с размером тела. Исследования показывают, что подавление активности теломеразы в соматических клетках крупных млекопитающих может быть эволюционным приспособлением, снижающим риск онкологических заболеваний, которые характерны для организмов с большей массой тела. Таким образом, ограничение активности теломеразы и более короткие теломеры у крупных и долгоживущих видов, по-видимому, выполняют роль дополнительного противоопухолевого барьера (Buddhachat et al., 2017).

Особая продолжительность жизни характерна не только для наземных представителей крупных млекопитающих, но и для обитателей морской среды. Среди китообразных (Cetacea), включающих парвотряды усатых китов (Mysticeti) и зубатых китов (Odontoceti), также наблюдается широкий диапазон долголетия. Многие виды китов, обладая значительной массой тела – от нескольких тонн у дельфинов до десятков и даже сотен тонн у крупнейших представителей, способны жить до впечатляющего возраста. Например, гренландский кит (*Balaena mysticetus*) из семейства Гладких китов (Balaenidae) известен тем, что может жить более 200 лет, что делает его одним из самых долгоживущих млекопитающих на планете (Buddhachat et al., 2021; Lagunas-Rangel, 2021).

В отличие от ряда наземных видов, для которых отмечена корреляция между изначальной длиной теломер и

потенциальной продолжительностью жизни, у китообразных данные выглядят более неоднозначно. С применением количественной ПЦР к образцам кожи 28 горбатых китов (*Megaptera novaeangliae*) возрастом от 0 до 26 лет было установлено, что длина теломер статистически коррелирует с возрастом. Однако вариабельность между особями одного возраста оказалась настолько велика, что этот показатель нельзя считать надежным инструментом определения возраста для свободно плавающих китов. Такая изменчивость может объясняться как методологическими факторами (точность измерений), так и биологическими причинами: наследственными особенностями, адаптациями к непредсказуемым условиям среды и стохастическими процессами распределения ресурсов (Olsen et al., 2014).

Дополнительные сравнительные исследования, охватывающие 23 вида морских млекопитающих, в том числе 4 вида Mysticeti и 19 видов Odontoceti, не выявили связи между относительной длиной теломер и максимальной продолжительностью жизни. Статистический анализ продемонстрировал, что долголетие значительно лучше коррелирует с размерами тела: масса взрослой особи и ее длина оказались надежными предикторами, тогда как относительная длина теломер не показала значимой связи (Buddhachat et al., 2021).

Другими морскими представителями, обладающими удивительной продолжительностью жизни, являются акулы, однако определить их возраст бывает особенно сложно. Например, гренландская акула (*Somniosus microcephalus*) была признана самым долгоживущим позвоночным на планете. Тем не менее многие аспекты ее биологии, физиологии и экологии остаются неразгаданными. Данный вид может доживать почти до 400 лет и достигает половой зрелости примерно в 150 лет. При этом ее вес колеблется от 700 до 1000 кг (Nielsen et al., 2016). Недавние исследования, проведенные на образцах гренландской акулы, позволили проанализировать РНК и выявить высоковыраженный длинный транскрипт, схожий с интерсперсным ядерным элементом (LINE-like) (Bartas et al., 2023). Авторы предполагают, что этот транскрипт может быть связан с увеличенной продолжительностью жизни и устойчивостью к возрастным заболеваниям, и выдвигают гипотезу о том, что данный фактор может способствовать улучшению механизма поддержания теломер. Однако научных подтверждений гипотезы пока нет, как и данных о длине теломер у этих животных (Bartas et al., 2023).

В исследовании, проведенном на других видах акул, таких как южная фонарная акула (*Etmopterus granulosus*), была проанализирована относительная длина теломер в зависимости от возраста, который определялся по массе тела (Nehmens et al., 2021). Результаты показали, что теломеры у *E. granulosus* действительно укорачиваются в зависимости от размера, однако с уверенностью утверждать, что возраст влияет на длину теломер, в данном случае затруднительно (Nehmens et al., 2021).

В заключение, хотя сведений пока недостаточно для окончательных выводов, можно предположить, что крупный размер тела является значимым фактором для упомянутых организмов и может отражать совокупность

эволюционных и физиологических стратегий, направленных на поддержание геномной стабильности, контроль клеточных делений и снижение риска онкологических процессов.

Закключение

В данном литературном обзоре мы обобщили уникальные характеристики различных альтернативных моделей животных, демонстрирующих фенотипы замедленного и ускоренного старения. Рассматриваемые виды обладают исключительной продолжительностью жизни, значительным потенциалом регенерации или устойчивостью к заболеваниям, связанным со старением. Тем не менее результаты исследований, касающихся связи между длиной теломер и возрастными заболеваниями, а также продолжительностью жизни, остаются довольно непоследовательными и противоречивыми. В этом контексте наиболее подходящими моделями для изучения механизмов сокращения теломер в процессах старения и долголетия представляются птицы и землекопы, тогда как летучие мыши и кораллы больше подходят для анализа влияния стрессовых факторов на длину теломер. Крупные долгожители, такие как слоны, киты и акулы, демонстрируют связь между длиной теломер и массой тела. Представители морских ежей и омаров вызывают особый интерес для исследования альтернативных механизмов старения, которые еще не были выявлены (рис. 2).

Безусловно, все упомянутые модели обладают уникальными механизмами продления жизни и поддержания длины теломер, которые не имеют аналогов в классических модельных организмах. Однако пока неясно, в какой мере знания о механизмах старения и долголетия, полученные на долгоживущих модельных организмах, могут быть применены к людям для обеспечения более долгой и здоровой жизни. В связи с этим важно оптимизировать использование этих моделей в прикладных исследованиях. Виды с постоянной длиной теломер и активной теломеразой (*Arctica islandica*, *Mesocentrotus franciscanus*, *Homarus americanus*) лучше всего подходят для детального изучения молекулярных механизмов экстремального долголетия и поиска потенциальных геропротекторных мишеней. Организмы, у которых длина теломер значительно варьирует под воздействием внешних факторов (летучие мыши рода *Myotis*, кораллы *Pocillopora* spp.), целесообразно использовать для оценки влияния экологического стресса, заболеваний или качества среды обитания на процессы старения. Совместное исследование морских ежей (*Stomatopneustes variolaris* и *Mesocentrotus franciscanus*) или кораллов (*Pocillopora* spp. и *Porites* spp.) позволит выявить факторы, влияющие на динамику теломер при различных сценариях продолжительности жизни. У крупномасштабных моделей (слоны, акулы, киты) отмечена корреляция длины теломер с массой тела и продолжительностью жизни, что может быть полезно для разработки биомаркеров здоровья популяций в дикой природе. Данные, полученные на видах с особой устойчивостью к возрастным патологиям (голый землекоп, летучие мыши рода *Myotis*), могут быть экстраполированы для поиска новых терапевтических мишеней при возрастных заболеваниях человека.

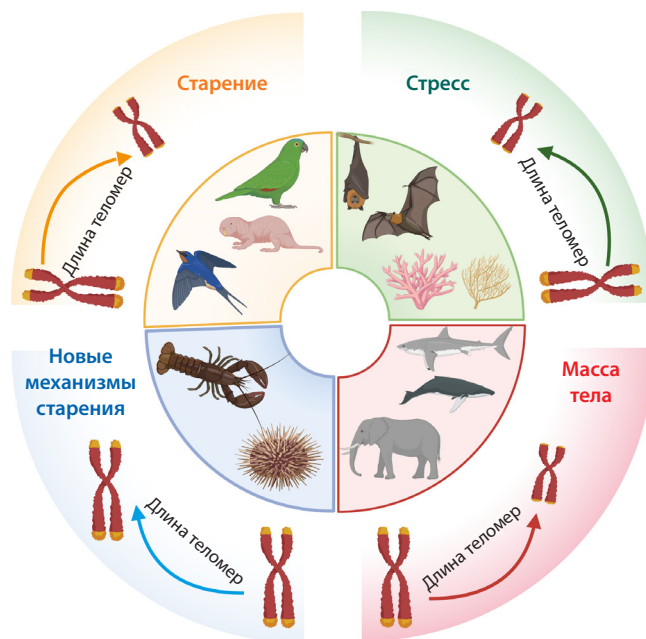


Рис. 2. Факторы, влияющие на длину теломер у различных долгоживущих организмов.

Таким образом, использование альтернативных видов с различными стратегиями старения и уникальными механизмами поддержания теломер не только расширяет возможности для проверки гипотезы о теломерах как универсальном биомаркере старения, но и позволяет более объективно оценить их вклад в процессы долголетия и возрастных патологий. Включение этих экстремальных моделей наряду с классическими организмами способствует более глубокому пониманию фундаментальных механизмов долголетия и открывает новые пути применения полученных знаний в медицине, экологии и охране редких видов, потенциально способствуя продлению активного и здорового периода жизни человека.

Список литературы / References

- Allsopp R.C., Chang E., Kashefi-Aazam M., Rogaev E.I., Piatyszek M.A., Shay J.W., Harley C.B. Telomere shortening is associated with cell division *in vitro* and *in vivo*. *Exp Cell Res*. 1995; 220(1):194-200. doi 10.1006/excr.1995.1306
- Arai Y., Martin-Ruiz C.M., Takayama M., Abe Y., Takebayashi T., Koyasu S., Suematsu M., Hirose N., von Zglinicki T. Inflammation, but not telomere length, predicts successful ageing at extreme old age: a longitudinal study of semi-supercentenarians. *EBioMedicine*. 2015;2(10):1549-1558. doi 10.1016/j.ebiom.2015.07.029
- Aramburu T., Plucinsky S., Skordalakes E. POT1-TPP1 telomere length regulation and disease. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020;18:1939-1946. doi 10.1016/j.csbj.2020.06.040
- Armstrong E., Boonekamp J. Does oxidative stress shorten telomeres *in vivo*? A meta-analysis. *Ageing Res Rev*. 2023;85:101854. doi 10.1016/j.arr.2023.101854
- Atzmon G., Cho M., Cawthon R.M., Budagov T., Katz M., Yang X., Siegel G., Bergman A., Huffman D.M., Schechter C.B., Wright W.E., Shay J.W., Barzilai N., Govindaraju D.R., Suh Y. Genetic variation in human telomerase is associated with telomere length in Ashkenazi centenarians. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(1):1710-1717. doi 10.1073/pnas.0906191106

- Bartas M., Červeň J., Valková N., Volná A., Dobrovolná M., Šislerová L., Baldvinsson H., Pečinka P., Brázda V. RNA analysis of the longest living vertebrate Greenland shark revealed an abundance of LINE-like elements in its transcriptome. *Czech Polar Rep.* 2023;13(2):210-227. doi 10.5817/CPR2023-2-17
- Basova L., Begum S., Strahl J., Sukhotin A., Brey T., Philipp E., Abele D. Age-dependent patterns of antioxidants in Arctic islandica from six regionally separate populations with different lifespans. *Aquat Biol.* 2012;14(2):141-152. doi 10.3354/ab00387
- Bernardes De Jesus B., Vera E., Schneeberger K., Tejera A.M., Ayuso E., Bosch F., Blasco M.A. Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Mol Med.* 2012;4(8):691-704. doi 10.1002/emmm.201200245
- Bowden T.J., Kraev I., Lange S. Extracellular vesicles and post-translational protein deimination signatures in haemolymph of the American lobster (*Homarus americanus*). *Fish Shellfish Immunol.* 2020; 106:79-102. doi 10.1016/j.fsi.2020.06.053
- Buddhachat K., Kriangwanich W., Kumoun I., Brown J.L., Chailangkarn S., Somgird C., Thitarom C., Prasitwattanaseree S., Nganvongpanit K. Telomeric attrition with increasing age in short- (Chihuahua dog) and long- (Asian elephant) life span animals. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2017;23(4):643-649. doi 10.9775/kvfd.2017.17504
- Buddhachat K., Brown J.L., Kaewkool M., Poommouang A., Kaewmong P., Kittiwattana Wong K., Nganvongpanit K. Life expectancy in marine mammals is unrelated to telomere length but is associated with body size. *Front Genet.* 2021;12:737860. doi 10.3389/fgene.2021.737860
- Bythell J.C., Brown B.E., Kirkwood T.B.L. Do reef corals age? *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2018;93(2):1192-1202. doi 10.1111/brv.12391
- Calado R.T., Dumitriu B. Telomere dynamics in mice and humans. *Semin Hematol.* 2013;50(2):165-174. doi 10.1053/j.seminhematol.2013.03.030
- Chusyd D.E., Ackermans N.L., Austad S.N., Hof P.R., Mielke M.M., Sherwood C.C., Allison D.B. Aging: what we can learn from elephants. *Front Aging.* 2021;2:726714. doi 10.3389/fragi.2021.726714
- Crawley J.A.H., Mumby H.S., Chapman S.N., Lahdenperä M., Mar K.U., Hutut W., Thura Soe A., Aung H.H., Lummaa V. Is bigger better? The relationship between size and reproduction in female Asian elephants. *J Evol Biol.* 2017;30(10):1836-1845. doi 10.1111/jeb.13143
- Criscuolo F., Dobson F.S., Schull Q. The influence of phylogeny and life history on telomere lengths and telomere rate of change among bird species: a meta-analysis. *Ecol Evol.* 2021;11(19):12908-12922. doi 10.1002/ece3.7931
- Domínguez-de-Barros A., Sifaoui I., Borecka Z., Dorta-Guerra R., Lorenzo-Morales J., Castro-Fuentes R., Córdoba-Lanús E. An approach to the effects of longevity, sexual maturity, and reproduction on telomere length and oxidative stress in different Psittacidae species. *Front Genet.* 2023;14:1156730. doi 10.3389/fgene.2023.1156730
- Domínguez-de-Barros A., Sifaoui I., Dorta-Guerra R., Lorenzo-Morales J., Castro-Fuentes R., Córdoba-Lanús E. Telomere- and oxidative stress dynamics in Psittacidae species with different longevity trajectories. *GeroScience.* 2024. doi 10.1007/s11357-024-01397-5
- Du C., Anderson A., Lortie M., Parsons R., Bodnar A. Oxidative damage and cellular defense mechanisms in sea urchin models of aging. *Free Radic Biol Med.* 2013;63:254-263. doi 10.1016/j.free-radbiomed.2013.05.023
- Ebert T.A. Negative senescence in sea urchins. *Exp Gerontol.* 2019; 122:92-98. doi 10.1016/j.exger.2019.04.018
- Foley N.M., Hughes G.M., Huang Z., Clarke M., Jebb D., Whelan C.V., Petit E.J., ... Kerth G., Rebelo H., Rodrigues L., Puechmaile S.J., Teeling E.C. Growing old, yet staying young: the role of telomeres in bats' exceptional longevity. *Sci Adv.* 2018;4(2):ea00926. doi 10.1126/sciadv.aao0926
- Foley N.M., Petit E.J., Brazier T., Finarelli J.A., Hughes G.M., Touzalin F., Puechmaile S.J., Teeling E.C. Drivers of longitudinal telomere dynamics in a long-lived bat species, *Myotis myotis*. *Mol Ecol.* 2020;29(16):2963-2977. doi 10.1111/mec.15395
- Foot C.G., Daunt F., González-Solis J., Nasir L., Phillips R.A., Monaghan P. Individual state and survival prospects: age, sex, and telomere length in a long-lived seabird. *Behav Ecol.* 2011;22(1): 156-161. doi 10.1093/beheco/arq178
- Francis N., Gregg T., Owen R., Ebert T., Bodnar A. Lack of age-associated telomere shortening in long- and short-lived species of sea urchins. *FEBS Lett.* 2006;580(19):4713-4717. doi 10.1016/j.febslet.2006.07.049
- Garg K.M., Lamba V., Sanyal A., Dovih P., Chattopadhyay B. Next generation sequencing revolutionizes organismal biology research in bats. *J Mol Evol.* 2023;91(4):391-404. doi 10.1007/s00239-023-10107-2
- Gomes N.M.V., Ryder O.A., Houck M.L., Charter S.J., Walker W., Forsyth N.R., Austad S.N., Venditti C., Pagel M., Shay J.W., Wright W.E. Comparative biology of mammalian telomeres: hypotheses on ancestral states and the roles of telomeres in longevity determination. *Aging Cell.* 2011;10(5):761-768. doi 10.1111/j.1474-9726.2011.00718.x
- Gruber H., Schaible R., Ridgway I.D., Chow T.T., Held C., Philipp E.E.R. Telomere-independent ageing in the longest-lived non-colonial animal, *Arctica islandica*. *Exp Gerontol.* 2014;51:38-45. doi 10.1016/j.exger.2013.12.014
- Gruber H., Wessels W., Boynton P., Xu J., Wohlgemuth S., Leeuwenburgh C., Qi W., Austad S.N., Schaible R., Philipp E.E.R. Age-related cellular changes in the long-lived bivalve *A. islandica*. *Age.* 2015;37(5):90. doi 10.1007/s11357-015-9831-8
- Harper J.M., Holmes D.J. New perspectives on avian models for studies of basic aging processes. *Biomedicine.* 2021;9(6):649. doi 10.3390/biomedicine9060649
- Hausmann M.F., Winkler D.W., Huntington C.E., Nisbet I.C.T., Vleck C.M. Telomerase expression is differentially regulated in birds of differing life span. *Ann NY Acad Sci.* 2004;1019(1):186-190. doi 10.1196/annals.1297.029
- Ineson K.M., O'Shea T.J., Kilpatrick C.W., Parise K.L., Foster J.T. Ambiguities in using telomere length for age determination in two North American bat species. *J Mammal.* 2020;101(4):958-969. doi 10.1093/jmammal/gyaa064
- Jenner L.P., Peska V., Fulnečková J., Sýkorová E. Telomeres and their neighbors. *Genes.* 2022;13(9):1663. doi 10.3390/genes13091663
- Kirkwood T.B.L. Evolution of ageing. *Nature.* 1977;270(5635):301-304. doi 10.1038/270301a0
- Kirkwood T.B.L., Rose M.R. Evolution of senescence: late survival sacrificed for reproduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1991;332(1262):15-24. doi 10.1098/rstb.1991.0028
- Klapper W., Kühne K., Singh K.K., Heidorn K., Parwaresch R., Krupp G. Longevity of lobsters is linked to ubiquitous telomerase expression. *FEBS Lett.* 1998;439(1-2):143-146. doi 10.1016/S0014-5793(98)01357-X
- Koliada A.K., Krasnenkov D.S., Vaiserman A.M. Telomeric aging: mitotic clock or stress indicator? *Front Genet.* 2015;6:82. doi 10.3389/fgene.2015.00082
- Koopman H.N., Westgate A.J., Siders Z.A. Declining fecundity and factors affecting embryo quality in the American lobster (*Homarus americanus*) from the Bay of Fundy. *Can J Fish Aquat Sci.* 2015; 72(3):352-363. doi 10.1139/cjfas-2014-0277
- Lagunas-Rangel F.A. Deciphering the whale's secrets to have a long life. *Exp Gerontol.* 2021;151:111425. doi 10.1016/j.exger.2021.111425
- Leonida S.R.L., Bennett N.C., Leitch A.R., Faulkes C.G. Patterns of telomere length with age in African mole-rats: new insights from quantitative fluorescence in situ hybridisation (qFISH). *PeerJ.* 2020;8:e10498. doi 10.7717/peerj.10498
- Lin J., Epel E. Stress and telomere shortening: insights from cellular mechanisms. *Ageing Res Rev.* 2022;73:101507. doi 10.1016/j.arr.2021.101507

- Louzon M., Coeurdassier M., Gimbert F., Pauget B., De Vaufléury A. Telomere dynamic in humans and animals: review and perspectives in environmental toxicology. *Environ Int.* 2019;131:105025. doi 10.1016/j.envint.2019.105025
- Miller R.A., Harper J.M., Dysko R.C., Durkee S.J., Austad S.N. Longer life spans and delayed maturation in wild-derived mice. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2002;227(7):500-508. doi 10.1177/15353702022700715
- Muñoz-Lorente M.A., Cano-Martin A.C., Blasco M.A. Mice with hyper-long telomeres show less metabolic aging and longer lifespans. *Nat Commun.* 2019;10(1):4723. doi 10.1038/s41467-019-12664-x
- Nehmens M.C., Varney R.M., Janosik A.M., Ebert D.A. An exploratory study of telomere length in the deep-sea shark, *Etmopterus granulosus*. *Front Mar Sci.* 2021;8:642872. doi 10.3389/fmars.2021.642872
- Nguyen T.H.D. Structural biology of human telomerase: progress and prospects. *Biochem Soc Trans.* 2021;49(5):1927-1939. doi 10.1042/BST20200042
- Nielsen J., Hedeholm R.B., Heinemeier J., Bushnell P.G., Christiansen J.S., Olsen J., Ramsey C.B., Brill R.W., Simon M., Steffensen K.F., Steffensen J.F. Eye lens radiocarbon reveals centuries of longevity in the Greenland shark (*Somniosus microcephalus*). *Science*. 2016;353(6300):702-704. doi 10.1126/science.aaf1703
- Olsen M.T., Robbins J., Bérubé M., Rew M.B., Palsbøll P.J. Utility of telomere length measurements for age determination of humpback whales. *NAMMCO Sci Publ.* 2014;10. doi 10.7557/3.3194
- Polinski J.M., Kron N., Smith D.R., Bodnar A.G. Unique age-related transcriptional signature in the nervous system of the long-lived red sea urchin *Mesocentrotus franciscanus*. *Sci Rep.* 2020;10(1):9182. doi 10.1038/s41598-020-66052-3
- Polinski J.M., Zimin A.V., Clark K.F., Kohn A.B., Sadowski N., Timp W., Ptitsyn A., Khanna P., Romanova D.Y., Williams P., Greenwood S.J., Moroz L.L., Walt D.R., Bodnar A.G. The American lobster genome reveals insights on longevity, neural, and immune adaptations. *Sci Adv.* 2021;7(26):eabe8290. doi 10.1126/sciadv.abe8290
- Polinski J.M., Castellano K.R., Buckley K.M., Bodnar A.G. Genomic signatures of exceptional longevity and negligible aging in the long-lived red sea urchin. *Cell Rep.* 2024;43(4):114021. doi 10.1016/j.celrep.2024.114021
- Puechmaile S.J., Frick W.F., Kunz T.H., Racey P.A., Voigt C.C., Wibbelt G., Teeling E.C. White-nose syndrome: is this emerging disease a threat to European bats? *Trends Ecol Evol.* 2011;26(11):570-576. doi 10.1016/j.tree.2011.06.013
- Roark E.B., Guilderson T.P., Dunbar R.B., Fallon S.J., Mucciarone D.A. Extreme longevity in proteinaceous deep-sea corals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(13):5204-5208. doi 10.1073/pnas.0810875106
- Rossello F., Jurk D., Passos J.F., d'Adda Di Fagnana F. Telomere dysfunction in ageing and age-related diseases. *Nat Cell Biol.* 2022;24(2):135-147. doi 10.1038/s41556-022-00842-x
- Rouan A., Pousse M., Tambutté E., Djerbi N., Zozaya W., Capasso L., Zoccola D., Tambutté S., Gilson E. Telomere dysfunction is associated with dark-induced bleaching in the reef coral *Stylophora pistillata*. *Mol Ecol.* 2022;31(23):6087-6099. doi 10.1111/mec.16199
- Rouan A., Pousse M., Djerbi N., Porro B., Bourdin G., Carradec Q., Hume B.C., ... Furla P., Voolstra C.R., Forcioli D., Lombard F., Gilson E. Telomere DNA length regulation is influenced by seasonal temperature differences in short-lived but not in long-lived reef-building corals. *Nat Commun.* 2023;14(1):3038. doi 10.1038/s41467-023-38499-1
- Sahm A., Bens M., Henning Y., Vole C., Groth M., Schwab M., Hoffmann S., Platzer M., Szafranski K., Dammann P. Higher gene expression stability during aging in long-lived giant mole-rats than in short-lived rats. *Aging.* 2018;10(12):3938-3956. doi 10.18632/aging.101683
- Sea Urchin Genome Sequencing Consortium; Sodergren E., Weinstock G.M., Davidson E.H., Cameron R.A., Gibbs R.A., Angerer R.C., ... Okwuonu G., Parker D., Pu L.-L., Thorn R., Wright R. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*. 2006;314(5801):941-952. doi 10.1126/science.1133609
- Seluanov A., Chen Z., Hine C., Sasahara T.H.C., Ribeiro A.A.C.M., Catania K.C., Presgraves D.C., Gorbunova V. Telomerase activity coevolves with body mass, not lifespan. *Aging Cell.* 2007;6(1):45-52. doi 10.1111/j.1474-9726.2006.00262.x
- Sergieiev P.V., Artemov A.A., Prokhortchouk E.B., Dontsova O.A., Berezkin G.V. Genomes of *Strongylocentrotus franciscanus* and *Lytechinus variegatus*: are there any genomic explanations for the two order of magnitude difference in the lifespan of sea urchins? *Aging.* 2016;8(2):260-271. doi 10.18632/aging.100889
- Smith A., Cook N., Cook K., Brown R., Woodgett R., Veron J., Saylor V. Field measurements of a massive *Porites* coral at Goolboodi (Orpheus Island), Great Barrier Reef. *Sci Rep.* 2021;11(1):15334. doi 10.1038/s41598-021-94818-w
- Smoom R., May C.L., Ortiz V., Tighe M., Kolev H.M., Rowe M., Reizel Y., Morgan A., Eyles N., Lichtental D., Skordalakes E., Kaestner K.H., Tzfati Y. Telomouse – a mouse model with human-length telomeres generated by a single amino acid change in RTE1. *Nat Commun.* 2023;14(1):6708. doi 10.1038/s41467-023-42534-6
- Terry D.F., Nolan V.G., Andersen S.L., Perls T.T., Cawthon R. Association of longer telomeres with better health in centenarians. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2008;63(8):809-812. doi 10.1093/gerona/63.8.809
- Tricola G.M., Simons M.J.P., Atema E., Boughton R.K., Brown J.L., Dearborn D.C., Divoky G., ... Wheelwright N.T., Winkler D.W., Young R., Vleck C.M., Haussmann M.F. The rate of telomere loss is related to maximum lifespan in birds. *Phil Trans R Soc B.* 2018;373(1741):20160445. doi 10.1098/rstb.2016.0445
- Tsuta H., Shinzato C., Satoh N., Hidaka M. Telomere shortening in the colonial coral *Acropora digitifera* during development. *Zoolog Sci.* 2014;31(3):129-134. doi 10.2108/zsj.31.129
- Vera E., Bernardes de Jesus B., Foronda M., Flores J.M., Blasco M.A. The rate of increase of short telomeres predicts longevity in mammals. *Cell Rep.* 2012;2(4):732-737. doi 10.1016/j.celrep.2012.08.023
- Yang W., Hu Y., Cui S. Fighting with aging: the secret for keeping health and longevity of naked mole rats. *Aging Dis.* 2024;16(1):137-145. doi 10.14336/AD.2024.0109
- Young A.J. The role of telomeres in the mechanisms and evolution of life-history trade-offs and ageing. *Phil Trans R Soc B.* 2018;373(1741):20160452. doi 10.1098/rstb.2016.0452
- Zade N.H., Khattar E. POT1 mutations cause differential effects on telomere length leading to opposing disease phenotypes. *J Cell Physiol.* 2023;238(6):1237-1255. doi 10.1002/jcp.31034
- Zaug A.J., Goodrich K.J., Song J.J., Sullivan A.E., Cech T.R. Reconstitution of a telomeric replicon organized by CST. *Nature.* 2022;608(7924):819-825. doi 10.1038/s41586-022-04930-8

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 19.11.2024. После доработки 26.12.2024. Принята к публикации 28.12.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-54

Особенности генетического картирования локусов, влияющих на образование эмбриогенного каллуса и регенерацию растений *in vitro* у зерновых и бобовых культур

Е.К. Потокина , А.С. Сущенко 

Сколковский институт науки и технологий (Сколтех), Москва, Россия
 e.potokina@skoltech.ru

Аннотация. Рекальцитрантность определяется как неспособность видов или отдельных генотипов растений к эффективной регенерации и/или трансформации в культуре *in vitro* и представляет собой самое существенное ограничение для геномного редактирования сельскохозяйственных культур. Для разработки протоколов генотип-независимой трансформации и регенерации культурных растений необходимы знания о генетических факторах, детерминирующих рекальцитрантность у различных видов растений в условиях *in vitro*. Поиск их путем классического картирования QTL для признаков эффективности каллусообразования, регенерации, трансформации в расщепляющихся популяциях считается сложным и трудоемким процессом из-за специфичной природы анализируемых фенотипов и сильной взаимосвязи «генотип – среда». В статье приводится обзор методологии, перспектив и наиболее ярких достижений «прямой» генетики в идентификации генетических детерминант рекальцитрантности у самых востребованных и одновременно наиболее трудных для работы *in vitro* зерновых и бобовых культур. Приведены примеры генетического картирования и успешного клонирования генов, отвечающих за разные аспекты рекальцитрантности у злаков. Так, установлено, что формирование быстро пролиферирующего эмбриогенного каллуса II типа у кукурузы определяется повышенной экспрессией гена *Wox2a*. Популярный в Японии сорт риса Koshihikari плохо регенерирует в культуре *in vitro* из-за нарушенного метаболизма нитратов, так как отличается низким уровнем экспрессии нитритредуктазы (*NiR*), преобразующей нитрит в аммиак. Побурение каллуса, встречающееся среди многих видов растений и приводящее к снижению регенерационной способности, у сортов риса (*Oryza sativa* ssp. *indica*) зависит от уровня экспрессии гена *Browning of Callus 1* (*BOC1*), который кодирует белок SRO (Similar to RCD One), регулирующий реакцию растения на окислительный стресс. Аналогичные работы по картированию локусов для признаков соматического эмбриогенеза у сои позволили обнаружить мажорные (major) QTL, объясняющие 45 и 26 % изменчивости признака. Исследования по генетическому картированию локусов, влияющих на эффективность регенерации и эмбриогенеза у рекальцитрантных видов растений, имеют очевидные перспективы в связи с появлением аннотированных референсных геномов, высокопроизводительного генотипирования и генетических карт с высоким разрешением.

Ключевые слова: растения; *in vitro*; генотип-зависимая регенерация; рекальцитрантность; генетический контроль; QTL морфогенетических признаков

Для цитирования: Потокина Е.К., Сущенко А.С. Особенности генетического картирования локусов, влияющих на образование эмбриогенного каллуса и регенерацию растений *in vitro* у зерновых и бобовых культур. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2025;29(4):508-516. doi 10.18699/vjgb-25-54

Финансирование. Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 24-26-00073).

Genetic mapping of loci affecting embryogenic callus formation and *in vitro* regeneration in cereals and leguminous crops

Е.К. Potokina , A.S. Sushchenko 

Skolkovo Institute of Science and Technology (Skoltech), Moscow, Russia
 e.potokina@skoltech.ru

Abstract. Recalcitrance is defined as the inability of plant species or individual genotypes to effectively regenerate and/or to be transformed in *in vitro* culture, and is the most significant limitation for genome editing of agricultural crops. To develop protocols for genotype-independent transformation and regeneration of cultivated plants, knowledge of the genetic factors that determine recalcitrance in various plant species under *in vitro* conditions is required. Their search by classical QTL mapping in populations segregating for callus formation efficiency, regeneration, and transformation is considered a complex and labor-intensive process due to a specific nature of the analyzed phenotypes and a strong genotype-environment relationship. The article provides an overview

of the methodology, prospects, and most outstanding achievements of “forward” genetics in identifying genetic determinants of recalcitrance in the most popular and at the same time most difficult to work with *in vitro* cereal and legume crops. Examples of genetic mapping and successful cloning of genes responsible for various aspects of recalcitrance in cereals are discussed. Thus, it was found that the formation of rapidly proliferating type II embryogenic callus in maize is determined by increased expression of the *Wox2a* gene. The Koshihikari rice variety, popular in Japan, poorly regenerates *in vitro* due to impaired nitrate metabolism, since it has a low expression level of nitrite reductase (*NiR*), which converts nitrite into ammonia. Callus browning, which occurs among many plant species and leads to a decrease in regenerative capacity and even to plant death, in rice varieties (*Oryza sativa* ssp. *indica*) depends on the expression level of the *Browning of Callus1* (*BOC1*) gene, which encodes the SRO protein (Similar to RCD One), regulating the plant response to oxidative stress. Similar studies on mapping loci for somatic embryogenesis traits in soybean have revealed major QTLs explaining 45 and 26 % of phenotypic variation. Studies on genetic mapping of loci affecting the efficiency of regeneration and embryogenesis in recalcitrant plant species have obvious prospects due to the emergence of annotated reference genomes, high-throughput genotyping and high-resolution genetic maps.

Key words: plants; *in vitro*; genotype-dependent regeneration; recalcitrance; genetic control; QTLs of morpho-genetic traits

For citation: Potokina E.K., Sushchenko A.S. Genetic mapping of loci affecting embryogenic callus formation and *in vitro* regeneration in cereals and leguminous crops. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(4):508-516. doi 10.18699/vjgb-25-54

Введение

Значительные достижения последних лет в области геномного редактирования растений способствовали росту числа новых форм, сортов и клонов с внесенными мутациями, представляющих интерес для сельскохозяйственной практики. В 2017 г. сообщалось о 20 возделываемых культурах, для совершенствования которых была использована технология CRISPR/Cas9 (Ricroch et al., 2017), к 2020 г. геномное редактирование было применено уже к 40 культурам в 25 странах с целью повышения их урожайности и устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам (Menz et al., 2020). Однако если классифицировать текущее состояние проектов по геномному редактированию культурных растений как пять последовательных этапов разработки и внедрения: 1) открытие; 2) доказательство концепции; 3) ранняя разработка; 4) продвинутая разработка; 5) коммерциализация, то к 2022 г. основная часть таких разработок была на стадии «ранних», и только геномное редактирование риса отнесилось к категории «продвинутой разработки» (Pixley et al., 2022). Отсутствие новых коммерческих сортов, усовершенствованных с использованием CRISPR/Cas9, объясняется не только ограничениями со стороны законодательства, но еще и тем, что у большинства видов культурных растений только малое количество протестированных генотипов оказывается способным к регулярному и эффективному развитию эмбрионных и регенерируемых тканей в стандартных условиях культивирования *in vitro* (Nam et al., 1997; Salvo et al., 2018; Nivya, Shah, 2023; Nagle et al., 2024).

Рекальцитрантность (recalcitrance) *in vitro* определяется как неспособность клеток, тканей и органов растения реагировать на манипуляции в культуре ткани (Benson, 2000). При этом рекальцитрантность касается не только регенерации, но и эффективности трансформации: иногда успешно регенерирующие клетки не удается трансформировать с использованием *Agrobacterium*, и наоборот, успешно трансформированные клетки не регенерируют. Неспособность растений к эффективной регенерации и/или трансформации – самое существенное ограничение

для трансгенеза и геномного редактирования сельскохозяйственных культур (Altpeter et al., 2016).

Традиционный подход преодоления рекальцитрантности растений в культуре *in vitro* – работа по оптимизации внешних факторов, включая состав базовой среды, pH, условия освещения, типы эксплантов и др. В большинстве случаев программа развития клеток растений изменяется путем добавления в среду регуляторов роста – ауксинов и цитокининов. При этом выбор регуляторов роста, их последовательность и время воздействия обычно определяются эмпирически для каждого вида и часто корректируются для каждого генотипа (Altpeter et al., 2016). В то же время в результате исследований, направленных на выявление генетических и эпигенетических механизмов, контролирующих соматический эмбриогенез и формирование каллуса, стало возможно более тонко манипулировать этими процессами с использованием гормональных сигналов (Maren et al., 2022).

В технологии трансформации однодольных и рекальцитрантных видов двудольных значительным достижением стало манипулирование так называемыми морфогенами (morphogenic genes) с целью перепрограммирования соматических клеток для инициации эмбриогенеза. К таким морфогенам относят, в частности, ключевые регуляторы развития и детерминации меристематических клеток, такие как *Baby Boom* (*BBM*), *Wuschel* (*WUS*) и *Wuschel-Related Homeobox* (*WOX*) (Chen Z. et al., 2022).

Развитие методов «обратной» генетики привело к тому, что на сегодняшний день известно несколько десятков морфогенов, регулирующих рост и развитие растений в культуре *in vitro*. В англоязычной научной литературе появился термин “fine-tuning”, означающий точную настройку уровня экспрессии ключевых морфогенов, обеспечивающую успешную трансформацию и регенерацию растений в культуре *in vitro* (Maren et al., 2022). Например, с помощью такой настройки экспрессии морфогенов *BBM* и *WUS2* удалось индуцировать соматический эмбриогенез и регенерировать из каллусов незрелого зародыша фертильные трансгенные растения кукурузы, сорго и сахар-

ного тростника (Lowe K. et al., 2016). В этом исследовании низкий уровень экспрессии гена *WUS2* под низкоэффективным у однодольных промотором нопалин-синтазы (Nos:ZmWUS2) комбинировался с повышенной экспрессией гена *BBM* под «сильным» промотором убиквитина кукурузы (ZmUbi:ZmBBM). В результате такого «тюнинга» экспрессии двух морфогенов у кукурузы удалось получить трансформированные фертильные растения из 40 % каллусов инбредной линии Pioneer PHN5G, которая ранее не поддавалась трансформации с использованием биобаллистики или агробактерии. Для кукурузы на сегодняшний день описано уже 53 потенциальных морфогена, влияющих на эффективность регенерации и трансформации, причем манипулирование наиболее эффективными из них – транскрипционными факторами ZmWIND1 и ERF/AP2 – позволяет повысить частоту каллусообразования на 60.22–47.85 % и трансформацию на 16.56–37.2 % в зависимости от генотипа (Jiang et al., 2024).

Десятки подобных примеров успешного манипулирования экспрессией морфогенов для эффективной трансформации сельскохозяйственных культур (кукурузы, риса, пшеницы, тритикале, ячменя, сорго, сои, свеклы, рапса, томата, перца, картофеля, репы, винограда) (Chen Z. et al., 2022) свидетельствуют о том, что разработка протоколов генотип-независимой трансформации и регенерации культурных растений со временем может стать не столько искусством, сколько технологией. Однако для этого необходимы знания о генетических факторах, влияющих на соматический эмбриогенез, формирование эмбрионного каллуса и регенерацию различных видов культурных растений *in vitro*. Поиск их путем классического картирования QTL для признаков эффективности каллусообразования, регенерации, трансформации в расщепляющихся популяциях считается сложным и трудоемким процессом из-за специфичной природы анализируемых фенотипов и сильной взаимосвязи «генотип – среда», влияющей на отзывчивость растения к манипуляциям в культуре *in vitro* (McFarland et al., 2023).

Цель настоящей работы – обзор методологии, перспектив и наиболее впечатляющих достижений «прямой» генетики (forward genetics) в идентификации генетических детерминант рекальцитрантности у самых востребованных и одновременно наиболее трудных для работы *in vitro* зерновых и бобовых культур.

Картирование локусов, негативно влияющих на регенерацию зерновых культур

Вопросам низкой регенерационной способности эксплантов *in vitro* и генотип-зависимой трансформации злаков в литературе уделяется основное внимание, потому что именно эти культуры обеспечивают большую часть калорий, потребляемых человечеством (Chen Z. et al., 2022). У многих важных зерновых, таких как рис, пшеница, ячмень и кукуруза, на протяжении нескольких десятилетий эмбриогенные, регенерирующие культуры каллусной ткани были присущи только нескольким генотипам, что ограничивало возможности селекции этих сельскохозяйственных культур с использованием биотехнологий (Kausch et al., 2021).

Показательным примером является поиск локусов, определяющих генотип-специфичную регенерационную способность инбредных линий кукурузы (McFarland et al., 2023). Несколько генотипов кукурузы, а именно H99 (Duncan et al., 1985), B104 (Frame et al., 2011) и LH244 (Altschul et al., 1990), способны в культуре *in vitro* образовывать медленно растущий, компактный, очень гетерогенный эмбрионный каллус I типа. С биотехнологической точки зрения гораздо предпочтительнее работать с эмбрионным каллусом II типа, более рыхлым, быстро пролиферирующим, с высокой эмбрионностью и способностью к регенерации. Этот тип каллуса был обнаружен у единственной инбредной линии A188 более 40 лет назад (Green, Phillips, 1975). С тех пор, несмотря на активный поиск новых подходящих для манипулирования в культуре *in vitro* линий кукурузы, высокоэмбрионный каллус II типа так и оставался особенностью единственного генотипа A188 и его производных (McFarland et al., 2023). Многочисленные попытки оптимизировать состав культуральной среды позволили несколько повысить эффективность каллусообразования и регенерацию фертильных трансгенных растений (Gordon-Kamm et al., 1990). Однако добиться эффективной регенерации трансгенных растений кукурузы удалось только для нескольких генотипов, которые не представляли интереса с агрономической точки зрения (McFarland et al., 2023).

Как ответ на вызов со стороны практической селекции уже в 1970-х годах была инициирована селекционная программа по созданию «культуральных» (culturable) линий кукурузы путем скрещивания уникальной линии A188 с инбредной линией B73, ценной с селекционной точки зрения, но рекальцитрантной в культуре *in vitro* (Russell, 1972). В результате серии рекуррентных беккроссов были получены линии с интрогрессивным фрагментом A188 на хромосоме 3, обуславливающей способность к регенерации (Armstrong et al., 1992). Еще десятилетие спустя путем дополнительных скрещиваний удалось получить «культуральные» линии, наследующие всего 15 % своего генома от A188 (Lowe B.A. et al., 2006). На этом этапе идентифицировать каузативный ген все еще не удавалось, но были обнаружены сцепленные с ним молекулярные маркеры. С опубликованием в 2009 г. референсного генома линии B73 кукурузы, а также с появлением инструментов высокопроизводительного генотипирования (Illumina 55k Maize SNP Chip) стало возможным провести более точное картирование QTL для признака «способность к образованию эмбрионного каллуса в культуре *in vitro*», при использовании все того же материала от скрещивания контрастных по признаку родителей A188 и B73, преобразованного в почти изогенные и дигаплоидные линии. В результате искомого интервала на хромосоме 3 удалось сузить до 3035 Гб (Salvo et al., 2018).

В 2023 г. после проведенной серии дополнительных беккроссов с использованием аннотированного референсного генома родительской линии B73 выявлено 93 потенциальных гена-кандидата. По результатам анализа их транскрипции методом RNAseq было идентифицировано три наиболее вероятных кандидата, повышенная экспрессия которых в эксплантах была достигнута с применением

векторов с «сильным» промотором убиквитина кукурузы (ZmUbi1). Это позволило оценить влияние уровня экспрессии потенциальных генов-кандидатов на развитие эмбрионного каллуса. Как итог впервые был идентифицирован ген *Wox2a*, детерминирующий QTL способности к образованию эмбрионного каллуса, который был картирован в популяции потомков от скрещивания инбредных линий кукурузы A188 и B73. Различия в структурной части гена *Wox2a* у контрастных родительских генотипов оказались минимальными, но промоторная область совпала только на 69 %. Был сделан вывод, что именно повышенная экспрессия гена *Wox2a*, вероятно, и стала причиной образования эмбрионного каллуса II типа у линии A188 (McFarland et al., 2023).

Пример успешного клонирования гена, влияющего на регенерацию и эмбриогенез, описан у риса, для которого эффективная система культуры *in vitro* ранее была разработана на модельных сортах, таких как Nipponbare (*Oryza sativa* ssp. *japonica*) и Kasalath (*O. sativa* ssp. *indica*). При этом многие ведущие сорта, используемые для производства продуктов питания в Японии, такие как, например, сорт Koshihikari, имели низкую способность к регенерации в культуре зрелых зародышей, что было серьезным препятствием для эффективного производства трансгенных растений (Nishimura et al., 2005). Рекальцитрантный генотип Koshihikari формировал каллусы, которые в культуре ткани неизменно приобретали коричневый оттенок и никогда не давали начало зеленым побегам. Контрастный генотип Kasalath, использованный для скрещивания с Koshihikari, наоборот отличался способностью формировать жизнеспособные каллусы, из которых успешно регенерировали новые побеги.

Признак «способность к регенерации» (число регенерировавших из каллуса побегов) был картирован в популяции 99 потомков поколения BC1F1 с применением 262 ПЦР-маркеров, равномерно распределенных по 12 хромосомам риса. Четыре достоверных QTL были картированы на хромосомах 1, 2, 3 и 6, и во всех этих локусах аллели Kasalath оказывали позитивный эффект на способность растений к регенерации. QTL на хромосоме 1 показал максимальный эффект, он был обозначен как *PSR1* (Promoter of Shoot Regeneration 1) и подвергнут более детальному генетическому картированию (fine map-based cloning) с использованием 3800 рекомбинантов поколения BC3F2. Искомый хромосомный интервал удалось сузить до 50.8 кб, но для идентификации гена *PSR1* потребовалось сконструировать ВАС (Bacterial Artificial Chromosome) библиотеку из геномной ДНК сорта Kasalath, в которой был найден клон BHAL15, покрывающий искомый участок генома. Далее несколько последовательностей, покрывающих возможные гены-кандидаты, были субклонированы из BHAL15 и использованы для трансформации каллусов рекальцитрантного генотипа Koshihikari. Один из таких фрагментов, размером 12.2 кб, перекрывающий последовательность гена-кандидата *NiR*, кодирующего ферредоксин-нитритредуктазу, восстанавливал регенерационную способность каллусов Koshihikari и на этом основании был идентифицирован как каузативный ген для рассматриваемого признака.

Сравнение последовательностей гена *NiR* у сортов Koshihikari и Kasalath выявило несколько SNP и вставок-делетий, особенно в промоторной области гена. Обнаруженные мутации в структурной части гена вели всего к двум консервативным аминокислотным заменам в кодируемом белке, с другой стороны, уровень экспрессии этого гена у рекальцитрантного сорта Koshihikari был в 2.5 раза ниже, чем у сорта Kasalath. Интересен также факт, что у сорта Koshihikari, помимо полноразмерного транскрипта *NiR*, был найден также транскрипт с удержанным (третьим) интроном. Пониженная экспрессия *NiR* у Koshihikari, по-видимому, приводила к нарушению метаболизма нитратов у этого сорта риса, так как в этом метаболическом пути нитратредуктаза катализирует восстановление нитратов до нитритов, а нитритредуктаза (NirBD) преобразует нитрит в аммиак. Нарушенный метаболизм нитратов, вероятно, послужил причиной низкой эмбриогенности каллусов сорта риса Koshihikari.

Еще один пример позиционного картирования (positional mapping) локусов рекальцитрантности у риса касается эффекта побурения каллуса в культуре *in vitro*, характерного для сортов широко распространенного подвида *O. sativa* ssp. *indica* (Zhang K. et al., 2020). Побурение каллуса встречается среди многих видов растений и приводит к снижению регенерационной способности, плохому росту *in vitro* и гибели растений (He et al., 2009). Использование антиоксидантов, адсорбирующих агентов, низких концентраций солей и регуляторов роста может в определенной степени уменьшить последствия побурения каллуса, но универсального решения этой проблемы не существует (Zhang K. et al., 2020).

Для поиска локусов, ответственных за побурение каллуса у риса, была создана популяция потомков от скрещивания генотипа YJCWR дикорастущего вида *O. rufipogon* Griff., относительно устойчивого к побурению каллуса (донор), и элитного сорта Teqing (*O. sativa* ssp. *indica*) (реципиент). В популяции гибридов была выделена линия YIL25, у которой показатели частоты и степени побурения каллусов были значительно ниже, чем у Teqing, при этом у линии YIL25 обнаружены интрогрессии от родителя-донора YJCWR на хромосомах 2, 3 и 5.

От беккроссирования линии YIL25 с родителем-реципиентом Teqing была получена популяция из 198 линий BC1F2, которая была генотипирована с помощью микросателлитных маркеров и использована для картирования QTL признака «степень побурения каллуса». QTL на хромосоме 3 объяснял 14 % наблюдаемой изменчивости. Для картирования этого QTL с более высоким разрешением фракция BC1F2 линий, гетерозиготных в интервале QTL, была подвергнута самоопылению, в результате чего получено 6377 рекомбинантов. Генотипирование этих рекомбинантов с применением SNP-маркеров позволило сузить интервал QTL до 18.6 кб, в котором была идентифицирована только одна кодирующая последовательность, LOC_Os03g12820, аннотированная с помощью референсного генома (The Rice Genome Annotation Project Database). Сравнение последовательности этого гена у контрастных по анализируемому признаку родительских линий Teqing и YIL25 не выявило полиморфизма в структурной части,

но в промоторной зоне у сорта Teqing были обнаружены делеция в 337 п. н., 1 п. н. и 3 SNP. Последовательность LOC_Os03g12820, таким образом, идентифицирована как ген-кандидат *Browning of Callus1 (BOC1)*, влияющий на побурение каллуса.

Сравнительный анализ уровня экспрессии *BOC1* у родительских генотипов YIL25 и Teqing показал различие почти в 2 раза, причем максимальных значений эта разница достигала, начиная с 21-го дня культивирования каллуса, а на более ранних стадиях не проявлялась. Дополнительные эксперименты на протопластах с конструкциями, представляющими собой различные варианты мутаций в промоторе *BOC1*, интегрированные в вектор pGreenII 0800-LUC, позволили оценить влияние этих мутаций на уровень экспрессии репортерного гена люциферазы (*LUC*) и установить, что именно инсерция 337 нуклеотидов в промоторе *BOC1* у генотипа YIL25, устойчивого к побурению каллуса, значительно повышает уровень экспрессии этого гена в каллусной культуре. Выяснилось также, что вставка 337 п. н. в промоторе гена *BOC1* является транспозоном (Tourist MITE), и присутствие этой вставки не только уменьшает побурение каллуса у сортов риса, но и повышает в 2.5 раза эффективность трансформации. *BOC1* кодирует белок SRO (Similar to RCD One), который регулирует ответную реакцию растения на окислительный стресс.

В период 2000–2020 гг. опубликовано как минимум 16 работ, посвященных генетическому картированию QTL признаков рекальцитрантности у злаков, но только шесть из них сообщают в виде конечного результата идентифицированные гены-кандидаты (QTG) (Lardon, Geelen, 2020). Для обнаружения последних не всегда использовался долгий кропотливый путь позиционного картирования генетических локусов с несколькими скрещиваниями и получением тысяч рекомбинантов. Например, у ячменя единственный поддающийся агробактериальной трансформации сорт – это Golden Promise (Hisano, Sato, 2016).

Для выявления локусов, обеспечивающих «культурабельность» данного сорта, проведено скрещивание Golden Promise и рекальцитрантного генотипа Haruna Nijo. Было выделено 3013 незрелых зародышей из зерновок F₂, которые были инокулированы *Agrobacterium tumefaciens* с плазмидой, несущей репортерный ген устойчивости к гидромидину *HPT (hygromycin phosphotransferase)*. Из 3013 инокулированных эксплантов 293 образовали каллусы на селективной среде, из 60 таких каллусов регенерировали полноценные растения (Hisano, Sato, 2016). Анализ ДНК этих 60 растений показал наличие трансгена *HPT*, а сам факт регенерации данных растений из каллуса свидетельствовал о том, что они унаследовали от Golden Promise аллели в локусах, критичных для процессов трансформации и регенерации, которыми не обладал родитель Haruna Nijo. Такие локусы *TFA* (transformation amenability) были идентифицированы на хромосоме 2 (*TFA2*, *TFA3*) и хромосоме 3 (*TFA1*), и доверительный интервал каждого из этих QTL в среднем составлял 40 сМ.

На следующем этапе был получен ответ на вопрос, не локализованы ли в этих обширных хромосомных интервалах уже известные для злаков гены транскрипционных

факторов *BBM* и *WUS2*. Для этого последовательности данных генов у кукурузы были использованы для поиска гомологичных последовательностей в геноме ячменя, и оказалось, что гомолог *BBM* ячменя попадает в интервал *TFA2*, а гомолог *WUS2* – в интервал *TFA1* (Hisano et al., 2017). Хотя в исследовании не приводилось прямых доказательств о влиянии морфогенов *BBM* и *WUS2* на эффективность трансформации ячменя, было показано, что интрогрессии участков хромосом 2 и 3, где локализованы эти гены, от сорта Golden Promise в желательный генотип ячменя помогают достичь трансформации уровня 15.5–23.7 %, что можно считать высоким результатом, так как для самого сорта Golden Promise эффективность трансформации составляет примерно 30 % (Hisano et al., 2017).

При использовании расщепляющихся популяций от скрещивания двух родителей удается картировать локусы, отличающиеся аллелями у конкретной родительской пары. С появлением высокопроизводительного генотипирования стало возможным проанализировать изменчивость признаков, связанных с образованием каллуса, регенерацией и соматическим эмбриогенезом, на больших выборках неродственных генотипов, с помощью анализа ассоциаций (genome wide association mapping, GWAS). Так, 510 генотипов риса было генотипировано с помощью нескольких тысяч SNP, найденных путем секвенирования этой глобальной выборки на Illumina HiSeq 2000 (Zhang Z. et al., 2019).

Был выполнен анализ ассоциаций локусов (SNP) и изменчивости трех признаков образования каллуса: частоты индукции каллуса (callus induction rate, CIR), скорости индукции каллуса (callus induction speed, CIS) и времени первого появления каллуса (time of the first callus appearance, T0). Первые два признака, CIR и CIS, коррелировали между собой ($r^2 = 0.881$), корреляция между T0 и двумя другими признаками была низкой (–0.337 и 0.286). В результате идентифицировано 88 достоверно сцепленных локусов: 33 локуса для CIR, 31 для CIS, и 24 для T0, причем выявленные локусы для трех признаков не перекрывались. Из 88 обнаруженных локусов 21 был идентифицирован в пределах интервалов QTL, ранее картированных для риса в других исследованиях. Среди прочих для частоты индукции каллуса были предложены гены-кандидаты *CRL1*, *OsBMM1* и *OsSET1*, являющиеся ортологами генов *LBD17/LBD29*, *BBM* и *SWN* у арабидопсиса, у которого роль этих генов в формировании каллуса была доказана ранее (Boutillier et al., 2002; Chanvivattana et al., 2004; Fan et al., 2012).

Аналогичное исследование полногеномных ассоциаций проведено для признака «частота индукции каллуса» на 110 образцах риса (ssp. *indica*), генотипированных с 2385475 SNP-маркерами (Kamolsukyeunyoung et al., 2024). Особенностью этого исследования было то, что признак тестировался на трех культуральных средах: B5 (Гамборга), MS (Мурасиге–Скуга) и N6 (CHU). Примечательно, что на разных средах на индукцию каллуса влияли различные локусы: для среды B5 такой QTL был картирован на хромосоме 6, для среды MS – на хромосомах 2 и 6, на среде N6 на индукцию каллуса влияли четыре QTL, два на хромосоме 6, еще два QTL – на хромосомах 7 и 11. Как и

в предыдущем исследовании, интервалы картированных QTL не перекрывались. Это означало, что на разных культуральных средах на успешную индукцию каллуса влияют разные гены. Этот яркий пример отчасти объясняет, почему картирование QTL для признаков, связанных с индукцией каллусов и последующим получением фертильных трансгенных растений, не является сегодня популярным направлением исследований, – слишком много факторов, которые могут повлиять на воспроизводимость результатов.

Еще одна сложность анализа ассоциаций состоит в том, что GWAS позволяет найти интересные закономерности, касающиеся физиологических механизмов изучаемых признаков, однако редко заканчивается идентификацией каузативных генов. Чаще для последующего детального исследования предлагаются гены в непосредственной близости с достоверно ассоциированным SNP или гаплотипы в обнаруженном участке хромосомы, различающиеся по проявлению признака.

Картирование локусов эффективности трансформации и способности к каллусогенезу у зернобобовых культур

Широко распространенные зернобобовые культуры трибы Phaseoleae (соя, фасоль, вигна), а также горох и новая культура – гуар, относятся к рекальцитрантным в культуре *in vitro* растениям, в отличие от представителей некоторых других бобовых – люцерны и лядвенца (Nivya, Shah, 2023). У наиболее популярной культуры – сои – эффективность регенерации и трансформации зависит от конкретного генотипа и приемлема для немногих сортов, таких как, например, Jack (Yang et al., 2009) или Williams, Williams79 и Williams82 (Xu et al., 2022).

Сообщается о двух особенностях поведения бобовых культур в условиях *in vitro* (Nivya, Shah, 2023). Во-первых, эффективность регенерации может быть достаточно высокой, но при условии отсутствия каких-либо попыток трансформации, подразумевающей селективный прессинг. Причины этого явления неизвестны, хотя оптимизация протоколов трансформации может улучшить ситуацию (Bekalu et al., 2023). Во-вторых, в большинстве опубликованных экспериментов по бобовым не удалось показать наследование трансгенов или отредактированных генов в поколении T1 (Nivya, Shah, 2023). Причина этой низкой наследуемости трансгенов, скорее всего, – химерность регенерантов, у которых остаются нетрансформированными клетки меристемы цветка, дающие начало гаметам, что в конечном итоге также объясняется низкой эффективностью трансформации.

Несмотря на очевидные трудности с преодолением рекальцитрантности бобовых *in vitro*, работы по картированию морфогенов для этой группы культурных растений весьма редки и не сопоставимы по масштабам с аналогичными исследованиями у злаков.

Так, например, соя является популярным объектом «обратной» генетики морфогенов (Chen F. et al., 2019; Nao et al., 2019), однако известно всего два исследования по картированию QTL в двуродительских (biparental) популяциях – для признаков эффективности соматического эмбриогенеза (Song et al., 2010) и индукции каллуса (Yang

et al., 2011). В первом исследовании была создана популяция из 126 рекомбинантных инбредных линий (RIL) от скрещивания сорта Peking (более высокая способность к соматическому эмбриогенезу) и сорта Keburi (низкая способность). Популяция была генотипирована микросателлитными маркерами, и для признака «частота соматического эмбриогенеза» на хромосоме C2(6) были картированы весьма достоверные QTL, объясняющие очень высокий процент наблюдаемой изменчивости – 45.2 % (Satt307) и 25.97 % (Satt286). Такой значимый эффект может указывать на присутствие так называемых мажорных генов (major loci) в этих интервалах хромосомы 6 у сои. Дополнительные QTL с менее выраженным эффектом (6–7 %) были идентифицированы на хромосомах “H” и “G”, что соответствует хромосомам 12 и 18, согласно современной номенклатуре (https://www.soybase.org/about/lgs_and_chromosomes/). Второе исследование по картированию QTL для признака «частота индукции каллуса, CIF» было выполнено на популяции RIL от скрещивания сортов Kefeng (CIF = 0.69) и Nannong (CIF = 0.86). Самый значимый QTL для этого признака был картирован на хромосоме 14 (B2) и объяснял 16.6 % наблюдаемой изменчивости (Song et al., 2010).

Пример поиска ассоциаций (GWAS) для признаков, связанных с культурой *in vitro* у бобовых, показан для арахиса (Luo et al., 2024). Для того чтобы выявить образцы, потенциально способные к регенерации, D. Luo с коллегами сравнили результаты генотипирования 353 образцов арахиса из 26 стран с их способностью образовывать в культуре *in vitro* эмбриогенный каллус. Зародыши, изолированные из стерилизованных семян, были помещены на MS-среду с витаминами; субкультивирование эксплантов на свежую среду производилось каждые 4 недели. Сообщается, что после шестого пассажа физиологическое состояние каллуса начало стабилизироваться, и количество каллусов регистрировалось в каждой из седьмой, восьмой и девятой субкультур (T7, T8 и T9 соответственно).

Картируемый признак «частота каллусообразования» вычислялся как отношение количества образовавшихся каллусов к исходному количеству эксплантов для каждого пассажа отдельно. Для генотипирования популяции были использованы 864 179 SNP и 71 052 InDel. Коэффициент корреляции между частотой каллусообразования в субкультурах T7, T8 и T9 варьировал от 0.56 до 0.61. В результате проведения GWAS обнаружено 23 достоверно ассоциированных SNP для субкультуры T7, 30 SNP – для T8 и 8 SNP – для T9. Важный факт – в этом исследовании для всех трех пассажей идентифицирован один и тот же интервал на хромосоме 13, содержащий несколько SNP, ассоциированных с признаком. Этот факт может свидетельствовать о присутствии локуса со значимым эффектом (major QTL) на хромосоме 13 у арахиса. Самый достоверный SNP в этом участке хромосомы обнаружен в гене, кодирующем пероксисомальный ABC-транспортер 1, влияющий на процессы роста и развития растений (Baker et al., 2015).

Еще один SNP из того же интервала вносил аминокислотную замену в ген *Arahy.MLX90M*, кодирующий фактор ответа на ауксин (auxin response factor 19). В доверительный интервал на хромосоме 13 попали также

SNP в непосредственной близости от гена, кодирующего MYB транскрипционный фактор. У кукурузы гены этого семейства задействованы в формировании эмбрионного каллуса посредством передачи сигнала гиббереллина (Ge et al., 2016).

Проблемы и перспективы поиска генетических детерминант рекальцитрантности у растений с использованием генетического картирования

Картирование QTL, контролирующее способность к регенерации и трансформации, на сегодняшний день трудно назвать широко распространенным исследовательским подходом для преодоления рекальцитрантности *in vitro* у растений. Основная причина заключается в том, что картированные QTL часто специфичны для конкретных условий эксперимента, – результаты зависят от конкретной культуральной среды, на которой выращиваются экспланты, или от конкретной стадии развития экспланта, на которой начинает проявляться изменчивость признака. Часто обнаруженные QTL отражают полиморфизм, присущий только конкретной родительской паре, и не всегда картирование QTL заканчивается идентификацией гена-кандидата.

Тем не менее очевидно, что низкая эффективность регенерации и трансформации многих видов культурных растений сильно ограничивает возможности, которые предоставляет технология CRISPR-Cas для улучшения агрономических показателей сельскохозяйственных культур. Опыт показывает, что знания о ключевых генах «глобальных» транскрипционных факторов, экспрессия которых способна стимулировать пролиферацию клеток, позволяют решить эту проблему биотехнологическими методами. Примером такого подхода служит работа J.M. Debernardi с коллегами (2020), в которой создана конструкция, экспрессирующая химерный белок, сочетающий транскрипционный фактор Growth-Regulating Factor 4 (GRF4) пшеницы и его кофактор GRF-Interacting Factor 1 (GIF1). Факторы GRF опосредуют взаимодействие между белками, между белками и ДНК, а гены *GRF* высококонсервативны у покрытосеменных, голосеменных и мхов, что свидетельствует об их фундаментальном значении для процессов роста и развития (Omidbakhshfar et al., 2015).

Экспрессия химерного белка GRF4–GIF1 в каллусах тетраплоидной пшеницы позволила повысить регенерацию в 7.8 раза и существенно сокращала сроки получения регенерантов. Такой же эффект наблюдался при трансформации той же конструкцией *GRF4–GIF1* каллусов тритикале и риса (Debernardi et al., 2020), а также в экспериментах с ячменем (Timonova et al., 2023). J.M. Debernardi с коллегами выявили, что гомологи пшеничных генов *GRF4–GIF1*, экспрессируемые в эпикотиле цитруса Carrizo (гибрид *Citrus triptera* × *C. sinensis*), также повышали регенерацию в 4.7 раза по сравнению с эксплантами, трансформированными с вектором без вставки *GRF–GIF* (Debernardi et al., 2020). Это показывает, что такой подход может быть использован и для преодоления рекальцитрантности у видов двудольных, в частности у бобовых.

У сои, например, на сегодняшний день идентифицировано 22 гена семейства *GmGRFs* (*Glycine max* GRFs), локализованных на 14 хромосомах (Chen F. et al., 2019). Еще одно семейство транскрипционных факторов, WUSCHEL-related homeobox (WOX), представлено у сои 33 генами, причем из 19 хромосом сои эти гены отсутствуют только на одной хромосоме 16 (Hao et al., 2019). В связи с этим эксперименты по картированию QTL эффективности регенерации и трансформации помогли бы выяснить, экспрессия каких именно генов этих семейств «глобальных» транскрипционных факторов обладает наибольшим эффектом на регенерацию растений в культуре. Так, например, приведенное выше исследование по картированию у сои QTL, объясняющего 26 % изменчивости частоты соматического эмбриогенеза (Song et al., 2010), указывает на присутствие возможных генов-кандидатов на хромосоме 6 в районе расположения микросателлитного маркера Satt286 (физическая позиция ~16171913 п.н.). Один из генов семейства *GRF* – *GmGRF5* (Glyma.06G134600) – расположен на физическом расстоянии ~5 Мб от маркера Satt286, в позиции ~11067587 п.н. Учитывая, что среднее генетическое расстояние между маркерами на использованной карте составляло 28.4 сМ, можно предположить сцепление между маркером Satt286 и геном *GmGRF5*.

Генетическое картирование – далеко не единственный способ идентификации морфогенетических регуляторов. Для их поиска также используются мультиомиксные подходы. Например, X. Liu с коллегами (2023) идентифицировали 446 ключевых транскрипционных факторов, регулирующих индукцию каллуса у пшеницы, комбинируя сразу три омиксных подхода: RNA-seq, ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing) и CUT&Tag (Cleavage Under Targets and Tagmentation). По результатам профилирования транскриптома и анализа динамики эпигенетических изменений, сопровождающих процесс регенерации из ткани незрелых зародышей пшеницы сорта Fielder, X. Liu с коллегами выявили два новых гена, *TaDOF5.6* и *TaDOF3.4*, сверхэкспрессия которых достоверно повышала индукцию каллусогенеза и эффективность трансформации у сортов пшеницы Fielder, JM22 и Kenong 199.

В настоящее время исследователи, исходя из имеющихся ресурсов, имеют возможность выбирать между мультиомиксным подходом для поиска факторов, влияющих на эффективность регенерации и трансформации растений, с которыми они работают, и классическим методом картирования этих факторов в расщепляющихся популяциях. Последний все еще представляется менее затратным, поэтому исследования по генетическому картированию локусов эффективности регенерации и эмбриогенеза у рекальцитрантных видов имеют очевидную перспективу.

Заключение

Аннотированные референсные геномы, доступные для многих видов культурных растений, а также современные возможности генотипирования и построения генетических карт высокого разрешения могут существенно упростить поиск генов, уровень экспрессии или аллельный полиморфизм которых влияет на поведение растений в культуре *in vitro*.

Список литературы / References

- Altpeter F., Springer N.M., Bartley L.E., Blechl A.E., Brutnell T.P., Citovsky V., Conrad L.J., Gelvin S.B., Jackson D.P., Kausch A.P., Lemaux P.G., Medford J.I., Orozco-Cárdenas M.L., Tricoli D.M., Van Eck J., Voytas D.F., Walbot V., Wang K., Zhang Z.J., Stewart C.N. Advancing crop transformation in the era of genome editing. *Plant Cell*. 2016;28(7):1510-1520. doi 10.1105/tpc.16.00196
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215(3):403-410. doi 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Armstrong C.L., Romero-Severson J., Hodges T.K. Improved tissue culture response of an elite maize inbred through backcross breeding, and identification of chromosomal regions important for regeneration by RFLP analysis. *Theor Appl Genet*. 1992;84(5-6):755-762. doi 10.1007/BF00224181
- Baker A., Carrier D.J., Schaedler T., Waterham H.R., van Roermund C.W., Theodoulou F.L. Peroxisomal ABC transporters: functions and mechanism. *Biochem Soc Trans*. 2015;43(5):959-965. doi 10.1042/BST20150127
- Bekalu Z.E., Panting M., Bæksted Holme I., Brinch-Pedersen H. Opportunities and challenges of *in vitro* tissue culture systems in the era of crop genome editing. *Int J Mol Sci*. 2023;24(15):11920. doi 10.3390/ijms241511920
- Benson E.E. Special symposium: *In vitro* plant recalcitrance: an introduction. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 2000;36:141-148. doi 10.1007/s11627-000-0029-z
- Boutillier K., Offringa R., Sharma V.K., Kieft H., Ouellet T., Zhang L., Hattori J., Liu C.M., van Lammeren A.A., Miki B.L., Custers J.B., van Lookeren Campagne M.M. Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell*. 2002;14:1737-1749. doi 10.1105/tpc.001941
- Chanvivattana Y., Bishopp A., Schubert D., Stock C., Moon Y.H., Sung Z.R., Goodrich J. Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in *Arabidopsis*. *Development*. 2004;131(21):5263-5276. doi 10.1242/dev.01400
- Chen F., Yang Y., Luo X., Zhou W., Dai Y., Zheng C., Liu W., Yang W., Shu K. Genome-wide identification of GRF transcription factors in soybean and expression analysis of *GmGRF* family under shade stress. *BMC Plant Biol*. 2019;19(1):269. doi 10.1186/s12870-019-1861-4
- Chen Z., Debernardi J.M., Dubcovsky J., Gallavotti A. Recent advances in crop transformation technologies. *Nat Plants*. 2022;8(12):1343-1351. doi 10.1038/s41477-022-01295-8
- Debernardi J.M., Tricoli D.M., Ercoli M.F., Hayta S., Ronald P., Palatnik J.F., Dubcovsky J. A GRF-GIF chimeric protein improves the regeneration efficiency of transgenic plants. *Nature Biotechnol*. 2020;38(11):1274-1279. doi 10.1038/s41587-020-0703-0
- Duncan D.R., Williams M.E., Zehr B.E., Widholm J.M. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. *Planta*. 1985;165(3):322-332. doi 10.1007/BF00392228
- Fan M., Xu C., Xu K., Hu Y. LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factors direct callus formation in *Arabidopsis* regeneration. *Cell Res*. 2012;22(7):1169-1180. doi 10.1038/cr.2012.63
- Frame B., Main M., Schick R., Wang K. Genetic transformation using maize immature zygotic embryos. In: Thorpe T., Yeung E. (Eds) Plant Embryo Culture. Methods in Molecular Biology. Vol. 710. Humana Press, 2011;327-341. https://doi 10.1007/978-1-61737-988-8_22
- Ge F., Luo X., Huang X., Zhang Y., He X., Liu M., Lin H., Peng H., Li L., Zhang Z., Pan G., Shen Y. Genome-wide analysis of transcription factors involved in maize embryonic callus formation. *Physiol Plant*. 2016;158(4):452-462. doi 10.1111/ppl.12470
- Gordon-Kamm W., Spencer T.M., Mangano M.L., Adams T.R., Daines R.J., Start W.G., O'Brien J.V., Chambers S.A., Adams W.R. Jr., Willetts N.G., Rice T.B., Mackey C.J., Krueger R.W., Kausch A.P., Lemaux P.G. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell*. 1990;2(7):603-618. doi 10.1105/tpc.2.7.603
- Green C.E., Phillips R.L. Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop Sci*. 1975;15(3):417-421. doi 10.2135/cropsci1975.0011183X001500030040x
- Hao Q., Zhang L., Yang Y., Shan Z., Zhou X.A. Genome-wide analysis of the WOX gene family and function exploration of GmWOX18 in soybean. *Plants*. 2019;8(7):215. doi 10.3390/plants8070215
- He Y., Guo X., Lu R., Niu B., Pasapula V., Hou P., Cai F., Xu Y., Chen F. Changes in morphology and biochemical indices in browning callus derived from *Jatropha curcas* hypocotyls. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2009;98:11-17. doi 10.1007/s11240-009-9533-y
- Hisano H., Sato K. Genomic regions responsible for amenability to *Agrobacterium*-mediated transformation in barley. *Sci Rep*. 2016;6(1):37505. doi 10.1038/srep37505
- Hisano H., Meints B., Moscou M.J., Cistue L., Echávarri B., Sato K., Hayes P.M. Selection of transformation-efficient barley genotypes based on *TFA* (transformation amenability) haplotype and higher resolution mapping of the *TFA* loci. *Plant Cell Rep*. 2017;36(4):611-620. doi 10.1007/s00299-017-2107-2
- Jiang Y., Wei X., Zhu M., Zhang X., Jiang Q., Wang Z., Cao Y., An X., Wan X. Developmental regulators in promoting genetic transformation efficiency in maize and other plants. *Curr Plant Biol*. 2024;40:100383. doi 10.1016/j.cpb.2024.100383
- Kamolsukyeunyong W., Dabbhadatta Y., Jaiprasert A., Thunnon B., Poncheewin W., Wanchana S., Ruanjaichon V., Toojinda T., Burns P. Genome-wide association analysis identifies candidate loci for callus induction in rice (*Oryza sativa* L.). *Plants*. 2024;13(15):2112. doi 10.3390/plants13152112
- Kausch A.P., Wang K., Kaeppler H.F., Gordon-Kamm W. Maize transformation: history, progress, and perspectives. *Mol Breed*. 2021;41(6):38. doi 10.1007/s11032-021-01225-0
- Lardon R., Geelen D. Natural variation in plant pluripotency and regeneration. *Plants*. 2020;9(10):1261. doi 10.3390/plants9101261
- Lowe B.A., Way M.M., Kumpf J.M., Rout J., Warner D., Johnson R., Armstrong C.L., Spencer M.T., Chomet P.S. Marker assisted breeding for transformability in maize. *Mol Breed*. 2006;18:229-239. doi 10.1007/s11032-006-9031-4
- Lowe K., Wu E., Wang N., Hoerster G., Hastings C., Cho M.J., Scelonge C., Lenderts B., Chamberlin M., Cushatt J., Wang L., Ryan L., Khan T., Chow-Yiu J., Hua W., Yu M., Banh J., Bao Z., Brink K., Igo E., Rudrappa B., Shamseer P.M., Bruce W., Newman L., Shen B., Zheng P., Bidney D., Falco C., Register J., Zhao Z.Y., Xu D., Jones T., Gordon-Kamm W. Morphogenic regulators *Baby boom* and *Wuschel* improve monocot transformation. *Plant Cell*. 2016;28(9):1998-2015. doi 10.1105/tpc.16.00124
- Liu X., Bie X.M., Lin X., Li M., Wang H., Zhang X., Yang Y., Zhang C., Zhang X.S., Xiao J. Uncovering the transcriptional regulatory network involved in boosting wheat regeneration and transformation. *Nat Plants*. 2023;9(6):908-925. doi 10.1038/s41477-023-01406-z
- Luo D., Shi L., Sun Z., Qi F., Liu H., Xue L., Li X., Liu H., Qu P., Zhao H., Dai X., Dong W., Zheng Z., Huang B., Fu L., Zhang X. Genome-wide association studies of embryogenic callus induction rate in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Genes*. 2024;15(2):160. doi 10.3390/genes15020160
- Maren N.A., Duan H., Da K., Yencho G.C., Ranney T.G., Liu W. Genotype-independent plant transformation. *Hortic Res*. 2022;9:uhac047. doi 10.1093/hr/uhac047
- McFarland F.L., Collier R., Walter N., Martinell B., Kaeppler S.M., Kaeppler H.F. A key to totipotency: *Wuschel*-like *homeobox 2a* unlocks embryogenic culture response in maize (*Zea mays* L.). *Plant Biotechnol J*. 2023;21(9):1860-1872. doi 10.1111/pbi.14098
- Menz J., Modrzejewski D., Hartung F., Wilhelm R., Sprink T. Genome edited crops touch the market: a view on the global development and regulatory environment. *Front Plant Sci*. 2020;11:586027. doi 10.3389/fpls.2020.586027

- Nagle M.F., Yuan J., Kaur D., Ma C., Peremyslova E., Jiang Y., Niño de Rivera A., Jawdy S., Chen J.G., Feng K., Yates T.B., Tuskan G.A., Muchero W., Fuxin L., Strauss S.H. GWAS supported by computer vision identifies large numbers of candidate regulators of *in planta* regeneration in *Populus trichocarpa*. *G3*. 2024;14(4):jkae026. doi 10.1093/g3journal/jkae026
- Nam J., Matthyse A.G., Gelvin S.B. Differences in susceptibility of Arabidopsis ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration. *Plant Cell*. 1997;9:317-333. doi 10.1105/tpc.9.3.317
- Nishimura A., Ashikari M., Lin S., Takashi T., Angeles E.R., Yamamoto T., Matsuoka M., Khush G.S. Isolation of a rice regeneration quantitative trait loci gene and its application to transformation systems. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(33):11940-11944. doi 10.1073/pnas.0504220102
- Nivya V.M., Shah J.M. Recalcitrance to transformation, a hindrance for genome editing of legumes. *Front Genome Ed*. 2023;5:1247815. doi 10.3389/fgeed.2023.1247815
- Omidbakhshfard M.A., Proost S., Fujikura U., Mueller-Roeber B. Growth-regulating factors (GRFs): a small transcription factor family with important functions in plant biology. *Mol Plant*. 2015;8(7):998-1010. doi 10.1016/j.molp.2015.01.013
- Pixley K.V., Falck-Zepeda J.B., Paarlberg R.L., Phillips P.W., Slamet-Loedin I.H., Dhugga K.S., Campos H., Gutterson N. Genome-edited crops for improved food security of smallholder farmers. *Nat Genet*. 2022;54(4):364-367. doi 10.1038/s41588-022-01046-7
- Ricroch A., Clairand P., Harwood W. Use of CRISPR systems in plant genome editing: toward new opportunities in agriculture. *Emerg Top Life Sci*. 2017;1(2):169-182. doi 10.1042/etls20170085
- Russell W.A. Registration of B70 and B73 parental lines of maize (Reg. Nos. PL16 and PL17). *Crop Sci*. 1972;12:721. doi 10.2135/cropsci1972.0011183X001200050085x
- Salvo S., Cook J., Carlson A.R., Hirsch C.N., Kaeppler S.M., Kaeppler H.F. Genetic fine-mapping of a quantitative trait locus (QTL) associated with embryogenic tissue culture response and plant regeneration ability in maize (*Zea mays* L.). *Plant Genome*. 2018;11(2):170111. doi 10.3835/plantgenome2017.12.0111
- Song X., Han Y., Teng W., Sun G., Li W. Identification of QTL underlying somatic embryogenesis capacity of immature embryos in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Plant Cell Rep*. 2010;29(2):125-131. doi 10.1007/s00299-009-0804-1
- Timonova E.M., Kiseleva A.A., Bereznaia A.A., Nesterov M.A., Adonina I.G., Kochetov A.V., Salina E.A. Modification of agricultural traits in cultivated varieties of barley and wheat. *Ecol Genet*. 2023;21:24-25. doi 10.17816/ecogen568184
- Xu H., Guo Y., Qiu L., Ran Y. Progress in soybean genetic transformation over the last decade. *Front Plant Sci*. 2022;13:900318. doi 10.3389/fpls.2022.900318
- Yang C., Zhao T., Yu D., Gai J. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Chinese soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) – impacts of mannitol, abscisic acid, and explant age. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 2009;45:180-188. doi 10.1007/s11627-009-9205-y
- Yang C., Zhao T., Yu D., Gai J. Mapping QTLs for tissue culture response in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Mol Cells*. 2011;32(4):337-342. doi 10.1007/s10059-011-0063-1
- Zhang K., Su J., Xu M., Zhou Z., Zhu X., Ma X., Hou J., Tan L., Zhu Z., Cai H., Liu F., Sun H., Gu P., Li C., Liang Y., Zhao W., Sun C., Fu Y. A common wild rice-derived BOC1 allele reduces callus browning in indica rice transformation. *Nat Commun*. 2020;11(1):443. doi 10.1038/s41467-019-14265-0
- Zhang Z., Zhao H., Li W., Wu J., Zhou Z., Zhou F., Chen H., Lin Y. Genome-wide association study of callus induction variation to explore the callus formation mechanism of rice. *J Integr Plant Biol*. 2019;61(11):1134-1150. doi 10.1111/jipb.12759

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 31.10.2024. После доработки 26.11.2024. Принята к публикации 05.12.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-55

Оптимизация этапов технологии получения ДН-растений капусты белокочанной

А.И. Минейкина , К.С. Стебницкая , М.Г. Фомичева , Л.Л. Бондарева, А.С. Домблидес, Е.А. Домблидес  

Федеральный научный центр овощеводства, пос. ВНИИССОК, Одинцовский район, Московская область, Россия

 edomblides@mail.ru

Аннотация. Одна из экономически важных сельскохозяйственных культур среди представителей рода *Brassica* L. – капуста белокочанная. Для создания высокопродуктивных F_1 гибридов с улучшенными показателями необходима генетически разнообразная база выровненного материала, получение которого занимает продолжительную часть селекционного процесса. Ускорить этот этап селекции можно за счет получения удвоенных гаплоидов (ДН-растений). Отсутствие стандартизированных, эффективных и воспроизводимых протоколов для культивирования *in vitro* разных видов растений, охватывающих несколько факторов и их взаимодействие, часто препятствует практической реализации метода. Растительный материал, условия культивирования и состав питательных сред являются определяющими факторами эффективности эмбриогенеза. В результате проведенного исследования оптимизирован протокол получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* для капусты белокочанной позднеспелого срока созревания. Оптимальный размер бутонов позднеспелой капусты белокочанной для введения в культуру *in vitro* варьировал от 3.5 до 5.0 мм. Для изученных генотипов капусты белокочанной совместное влияние высокотемпературного стресса при 32 °C в течение 48 ч и pH питательной среды 5.8 способствовало наибольшему выходу эмбриоидов. За счет использования платформы-шейкера при режиме 40 об./мин достигнуто ускорение развития эмбриоидов до семядольной стадии на 7–10 суток. Благодаря подобранному комплексу условий для успешного эмбриогенеза из микроспор капусты белокочанной достигнут выход эмбриоидов до 273.6 ± 32.2 шт./чашку Петри. Применение проточной цитометрии позволило отделить удвоенные гаплоиды (69.8 %) от гаплоидов (8.4 %), триплоидов (1.5 %) и тетраплоидов (20.3 %) на ранней стадии развития. Молекулярно-генетический анализ с использованием микросателлитных маркеров (SSR-анализ) подтвердил гаплоидное происхождение диплоидных растений-регенерантов.

Ключевые слова: капуста белокочанная; *Brassica oleracea* L.; ДН-растения; культура микроспор *in vitro*; андрогенез; удвоенные гаплоиды; кислотность питательной среды; платформа-шейкер; метод проточной цитометрии клеточных ядер; SSR-анализ

Для цитирования: Минейкина А.И., Стебницкая К.С., Фомичева М.Г., Бондарева Л.Л., Домблидес А.С., Домблидес Е.А. Оптимизация этапов технологии получения ДН-растений капусты белокочанной. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(4):517-529. doi 10.18699/vjgb-25-55

Благодарности. Авторы выражают большую благодарность канд. с.-х. наук Г.А. Костенко за предоставленные селекционные образцы капусты белокочанной позднеспелого срока созревания.

Optimization of technology steps for obtaining white cabbage DH-plants

A.I. Mineykina , K.S. Stebnitskaia , M.G. Fomicheva , L.L. Bondareva, A.S. Domblides, E.A. Domblides  

Federal Scientific Vegetable Center, VNIISOK, Odintsovo district, Moscow region, Russia

 edomblides@mail.ru

Abstract. White cabbage is one of the economically important crops among the representatives of the genus *Brassica* L. To create highly productive F_1 hybrids with improved characteristics, the breeders need genetically diverse breeding material, which takes a long time to produce. It is possible to significantly accelerate this stage of breeding by obtaining doubled haploids (DH-plants). The lack of standardized, efficient and reproducible protocols for *in vitro* cultivation of different plant species, covering several factors and their interactions, often hinders the practical implementation of the method. Plant material, cultivation conditions and composition of nutrient media are determinants of embryogenesis efficiency. As a result of this study, the protocol for obtaining doubled haploids in *in vitro* culture of isolated microspores was optimized for late maturing white cabbage. The optimal bud size for introduction into *in vitro* culture varied from 3.5 to 5.0 mm. For the studied genotypes, the combined effect of high-temperature stress

at 32 °C for 48 h and pH 5.8 stimulated the highest embryoid yield. The use of 3.5 g/L phytogel as a gelling agent was not effective. The use of flow cytometry allowed for separation of doubled haploids (69.8 %) from haploids (8.4 %), triploids (1.5 %) and tetraploids (20.3 %) at an early stage of development. Molecular genetic analysis with polymorphic microsatellite loci (SSR-analysis) confirmed the haploid origin of the diploid regenerant plants.

Key words: white cabbage; *Brassica oleracea* L.; DH-plants; *in vitro* microspore culture; androgenesis; doubled haploids; acidity of nutrient medium; shaker platform; flow cytometry; SSR-analysis

For citation: Mineykina A.I., Stebnitskaia K.S., Fomicheva M.G., Bondareva L.L., Domblides A.S., Domblides E.A. Optimization of technology steps for obtaining white cabbage DH-plants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(4):517-529. doi 10.18699/vjgb-25-55

Введение

Среди представителей овощных культур рода *Brassica* L. наиболее распространенной и востребованной у потребителей является капуста белокочанная (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*): в Российской Федерации под данную культуру занято 14.3 % от всех посевных площадей овощных культур в открытом грунте. В последние годы импортозамещение – актуальная проблема, а в стратегическом плане Доктрины продовольственной безопасности Российской Федерации (документ утвержден Указом Президента РФ от 21.01.2020 № 20) стоит задача по наращиванию экспортного потенциала в отрасли овощеводства. В связи с чем у производителей овощных культур существует большая потребность в гибридах F₁, поскольку они экономически выгодны для выращивания по качеству товарной продукции и устойчивости к неблагоприятным факторам среды.

Генетическая однородность линий для создания гибридов – необходимое требование. Она достигается за счет инбридинга в течение нескольких поколений. Так как капуста белокочанная – перекрестноопыляемая культура с двухлетним циклом развития, то для получения выровненной линии традиционным методом селекции необходимо затратить 12–14 лет.

Культура изолированных микроспоров *in vitro* – один из передовых биотехнологических инструментов получения гомозиготных линий (удвоенных гаплоидов). Использование такой технологии позволяет достичь гомозиготности в одном поколении. Из-за генетической однородности удвоенные гаплоиды могут применяться не только в практической селекции, но и в других фундаментальных исследованиях, в том числе в генетической трансформации и индуцированном мутагенезе.

Первые успешные исследования в культуре микроспоров капустных культур проведены в начале 1980-х годов (Lichter, 1982). Затем был разработан базовый протокол культуры микроспоров рапса, который служит основой DH-технологии для растений рода *Brassica* (Pechan, Keller, 1988). В настоящее время эта технология активно развивается, но для полноценного включения в селекционный процесс необходим высокий уровень ее эффективности. Генотип растения, условия культивирования и ингредиенты питательной среды – определяющие факторы качества и количества получаемого растительного материала в любом протоколе культивирования клеток *in vitro*. В мировой практике реализовано множество стратегий для улучшения протоколов культивирования клеток растений семейства Brassicaceae. Важные достижения отмечены у всех

основных представителей рода *Brassica*. За счет высокой отзывчивости некоторых видов были изучены основные факторы, влияющие на индукцию эмбриогенеза у *B. napus* (Weber et al., 2005), *B. rapa* (Ferrie et al., 1995; Gu et al., 2003; Shumilina et al., 2020), *B. carinata* (Barro et al., 2003), *B. juncea* (Prem et al., 2008). Для капусты белокочанной такие исследования единичны в связи с меньшей отзывчивостью генотипов и низким выходом эмбриоидов (Cao et al., 1990; Rudolf et al., 1999; Bhatia et al., 2018).

Известно, что в основе метода культуры изолированных микроспоров *in vitro* – способность микроспоров переходить с гаметофитного пути на спорофитный под влиянием определенных факторов. Для растений рода *Brassica* такой способностью обладают микроспоры на поздней одноклеточной стадии и пыльцевые зерна ранней двухклеточной стадии развития (Pechan, Keller, 1988; Kott, 1998). В последующих исследованиях доказано, что жизнеспособность микроспоров и влияние ее на выход эмбриоидов зависят от размера бутонов, что, в свою очередь, помогает сократить время на отбор в случае большого количества растительного материала (Takahata, Keller, 1991; Bhatia et al., 2018; Kozar et al., 2022). Именно правильный подбор размера бутонов, обеспечивающих однородность популяции микроспоров на оптимальной стадии развития, – ключевой фактор для успеха методики (Cristea et al., 2020).

К основополагающим факторам, влияющим на индукцию эмбриогенеза, относятся холодовая предобработка бутонов и тепловой шок микроспоров в первые дни культивирования (Takahata, Keller, 1991; Bhatia et al., 2018). Во всех изученных протоколах шоковое повышение температуры при культивировании инициировало деление микроспоров. По данным исследований (Pechan, Smykal, 2001), температурная обработка при 32 °C в течение 1–4 суток является абсолютным условием индукции микроспоров у *B. napus*. Так, сочетание предварительной обработки холодом (4 °C) на протяжении 1 или 2 суток и теплового шока (32.5 °C) в течение 1 суток значительно усилило эмбриогенез микроспоров у брокколи (Yuan et al., 2012), а 32.5 °C в течение 1 или 2 суток было оптимально для капусты белокочанной (Yang et al., 2013).

Жидкая питательная среда для культивирования NLN с 13 % содержанием сахарозы разработана еще в 1982 г. (Lichter, 1982) и применяется в протоколах культивирования микроспоров для множества культур. Но, как показали исследования, существенное влияние на успешность эмбриогенеза оказывает кислотность среды, для различных генотипов капустных культур она варьирует в пределах 5.6–6.6 (Yuan et al., 2012). Также для повышения жизне-

способности индуцированных микроспор и развивающихся эмбриоидов целесообразно добавлять в среду активированный уголь (Prem et al., 2008).

Однозначно положительная реакция отмечена при применении платформы-шейкера от 40 до 50 об./мин при культивировании микроспор на жидкой среде; его использование позволило увеличить образование эмбриоидов *Brassica rapa* L. ssp. *chinensis* на 11.6–69.37 %, а также сократить время культивирования на 1–4 суток и ускорить регенерацию растений (Yang et al., 2013). Также важно поддерживать дальнейшее развитие эмбриоидов и растений из них. Для размножения чаще всего используется твердая среда Мурасиге–Скуга (MS) (Murashige, Skoog, 1962), а для укоренения S. Yuan с коллегами (2012) применяли среду 1/2 MS с 50 % содержанием солей (Yang et al., 2013).

Процедура получения ДН-линий включает два основных этапа: индукцию эмбриогенеза и удвоение хромосом. Второй этап необходим для практического применения полученных регенерантов, так как до удвоения генома растения стерильны. В настоящее время механизм, лежащий в основе спонтанного удвоения хромосом, во многих случаях неясен, а его эффективность сильно различается у разных видов и внутри сортообразцов одного вида (Kasha, 2005). В исследовании J.C. da Silva Dias и его группы (da Silva Dias, 2003) обнаружено 43–88 % спонтанных диплоидов у брокколи и 7–91 % спонтанных диплоидов у других видов капусты. Поскольку среди регенерантов могут встречаться растения с различной ploидностью, необходимо анализировать уровень ploидности всех полученных растений.

Ранние научные работы показали, что способность к эмбриогенезу у капустных культур, как правило, – количественно наследуемый признак, контролируемый несколькими генами, варьирует в зависимости от сортов и генетических групп (Zhang et al., 2003; Kitashiba et al., 2016; Ji et al., 2023). Таким образом, подобранные оптимальные факторы успешного культивирования микроспор *in vitro* подходят для определенного генотипа и нет универсального протокола культивирования. Выявление и модификация потенциально взаимодействующих факторов на этот процесс, способствуют повышению выхода эмбриоидов, что особенно важно для низкоотзывчивых генотипов.

Цель настоящего исследования – модернизация базового протокола культуры изолированных микроспор для позднеспелых генотипов капусты белокочанной за счет подбора оптимальных условий культивирования.

Материалы и методы

Материал и условия выращивания. В работе использовано 8 сортообразцов капусты белокочанной (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) позднеспелого срока созревания из коллекции ООО «Агрофирма Поиск» (№ 2403, 2404, 2405, 2406, 2407) и ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства» (№ 127, 303, 360). Все генотипы имели срок созревания от 160 до 180 суток от всходов и представляли ценные селекционные образцы различного генетического происхождения, выделенные по хозяйственно ценным признакам.

Донорные растения выращивали в климатической камере при температуре 19 °С, освещенности 65 мкмоль · м⁻² · с⁻¹ и фотопериоде 16 ч – день, 8 ч – ночь. Яровизацию растений проводили при 6 °С в темноте в течение трех месяцев. По окончании яровизации на этапе акклиматизации вегетационные сосуды с растениями устанавливали в климатическую камеру для получения цветоноса. В течение 15–35 суток постепенно повышали температуру от +8 до 16 ± 2 °С при режиме 16 ч – день, 8 ч – ночь и освещении 65 мкмоль · м⁻² · с⁻¹.

Культура изолированных микроспор *in vitro*. На первом этапе отбирали по линейному размеру бутоны, содержащие максимальное количество микроспор на потенциально способных к эмбриогенезу стадиях от поздней одноядерной до ранней двухъядерной. Идентификацию стадий проводили на основе окрашивания содержимого пыльников дифференциальным красителем (Alexander, 1969) с использованием микроскопа Axio Imager A2 (Zeiss, Германия). Из отобранных бутонов готовили суспензию микроспор из расчета 1 бутон на 1 мл среды NLN (Lichter, 1982) с 13 % сахарозой и pH 5.8; 6.0; 6.1; 6.2; 6.4 в зависимости от опыта. Для этого в начале цветения донорных растений собирали бутоны и стерилизовали 30 с в 96 % этаноле, далее в течение 15 мин – в хлорсодержащем водном растворе коммерческого препарата «Белизна» (Россия) со стерильной дистиллированной водой в соотношении 1:1 и с добавлением Tween 20 (Panreac, Испания) (1 капля на 100 мл раствора) с последующим трехкратным промыванием в стерильной дистиллированной воде.

Стерильные бутоны помещали в среду NLN и измельчали в стеклянных бюксах с помощью магнитов на магнитной мешалке (BioSan, Латвия). Полученную суспензию микроспор пропускали через нейлоновый фильтр с размером ячеек 40 мкм, а затем осаждали 5 мин на центрифуге Eppendorf 5804R (Германия) при 920 g. Промывку микроспор проводили дважды. Микроспоры после выделения и промывки помещали в чашки Петри диаметром 60 мм. Предварительно в каждую чашку добавляли 3–4 капли стерильного раствора активированного угля и агарозы (Sigma-Aldrich, США), расплавленной в микроволновой печи (1 г активированного угля на 100 мл 0.5 % раствора агарозы). Далее чашки Петри инкубировали в темноте при шоковой температуре 32 °С в течение 1, 2, 3 суток, затем при 25 °С непрерывно в темноте в шейкере-инкубаторе при 40 об./мин (New Brunswick Innova® 44/44R Eppendorf, Германия) до достижения эмбриоидами семядольной стадии развития. Все опыты закладывались в трехкратной повторности.

Регенерация растений. Эмбриоиды, достигшие семядольной стадии развития, переносили на твердую питательную среду MS с 2 % сахарозой и 0.7 % агаром, pH 5.8, с добавлением 1 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП), 0.1 мг/л 1-нафтилуксусной кислоты (НУК) или 0.1 мг/л гиббереллиновой кислоты (ГК). Субкультивирование побегов осуществляли каждые 4 недели на ту же среду без добавления гормонов. Культивирование проводили на стеллажах при смешанном освещении двух типов люминесцентных ламп: OSRAM Fluora L36W/77 (преимущественно синего и красного спектра) и Philips 36W/54-765 (преимущественно белого спектра), при суммарной освещенности 10000 лк.

ценности $24 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ при 16 ч днем/8 ч ночью и $24 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Адаптация растений к условиям *in vivo*. Сформировавшиеся растения-регенеранты с развитой листовой, стеблевой и корневой системами для адаптации к условиям *in vivo* пересаживали в горшки с торфом с добавлением перлита (7:3) диаметром 8 см. Для улучшения адаптации и поддержания высокой влажности в течение первой недели после пересадки в грунт растения-регенеранты накрывали перфорированными пластиковыми прозрачными стаканами, плотно прилегающими к земле, постепенно приподнимая стаканчик. Адаптация происходила в климатической комнате с теми же параметрами, что и для донорных растений.

Выделение ДНК для ПЦР-анализа из растений-регенерантов капусты белокочанной. Ткань молодых листьев каждого растения размалывали в 200 мкл СТАВ-буфера с применением шариков из карбида вольфрама (диаметром 3 мм) и гомогенизатора TissueLyser II (Qiagen, Германия) (1560 колебаний/мин, продолжительность 1.7 мин) до состояния суспензии. После измельчения к каждому образцу добавляли 15 мкл протеиназы К. Дальнейшую экстракцию ДНК выполняли СТАВ-методом с использованием набора реагентов Сорб-ГМО-Б («Синтол», Россия) согласно протоколу производителя. Конечную чистоту и концентрацию тотальной ДНК определяли спектрофотометрически (Smart Spec Plus, Bio-Rad, США). Полученное соотношение $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.6\text{--}1.8$ соответствовало чистому раствору ДНК. Препараты выделенной ДНК хранили в холодильнике при $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Проведение ПЦР-анализа растений-регенерантов капусты белокочанной. Для выполнения микросателлитного анализа было использовано 9 микросателлитных локусов (табл. 1) с известными последовательностями праймеров для амплификации, показывающих при ана-

лизе PIC праймера не менее 0.5 (Tonguç, Griffiths, 2004; Louarn et al., 2007).

Базовую постановку ПЦР проводили в объеме 25 мкл, включая 1х ПЦР буфер Б, 2.5 mM MgCl_2 , 0.25 mM каждого dNTP, 0.3 мкМ каждого праймера, 1.5 единиц Taq ДНК-полимеразы («Синтол», Россия) и 3 мкл ДНК каждого исследуемого растительного образца. Для выполнения амплификации использовали прибор C1000 Touch (Bio-Rad). Стандартная процедура амплификации состояла из шага денатурации 2–5 мин при $92\text{--}95 \text{ }^{\circ}\text{C}$; шага отжига 30 с при температуре от 52 до $58 \text{ }^{\circ}\text{C}$; шага элонгации 30 с – 1 мин при $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Программа была рассчитана на 35 циклов амплификации.

ПЦР-продукты разделяли методом вертикального электрофореза с помощью системы Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) в 6 % полиакриламидном геле. После электрофореза гели окрашивали красителем для гелей SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя и документировали с использованием системы ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad).

Размеры амплифицированных фрагментов определяли в сравнении с маркером молекулярных масс Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Литва). Полученные цифровые фотографии продуктов амплификации анализировали с помощью программы ImageLab 3.0 (Bio-Rad).

Определение плоидности с помощью проточной цитометрии клеточных ядер. Молодые здоровые листья измельчались лезвием бритвы в 300 мкл буфера Гэлбрейта (45 mM MgCl_2 , 20 mM MOPS, 30 mM цитрата натрия, 0.1 % Triton X-100, pH 7.0) на льду с добавлением 50 мкг/мл РНКазы I («Синтол», Россия). Затем образец фильтровали через 30 мкм нейлоновый фильтр и добавляли пропидий иодид (Sigma, США) до конечной концентрации 50 мкг/мл. Содержание ДНК определяли

Таблица 1. Характеристики микросателлитных локусов

Маркер/ обозначение в GenBank	Последовательность праймеров	Мотив	Тотж., $^{\circ}\text{C}$	Размер фрагмента/ диапазон	Известное число аллелей
BoDCTD1/ AF458409	AGAAAGCAGACGGGA TGGTTAAAGCGAAAGTGTGC	(aga) ₆	55.7	166/ 133–168	5
BoPLD2/ AF113918	GACCACCGACTCCGATCTC AGACAAGCAAATGCAAGGAA	(ct) ₇ (at) ₇₋₁	56.4	267/ 258–273	11
BoAP1/ U67451	GGAGGAACGACCTTGATT GCCAAAATATACTATGCGTCT	(at) ₉₋₁	56	138/ 136–150	6
BoCAM1/ AJ427337	GCTGATGTTGATGGTGATGG GCCGAAGCAGACAAATAAAC	(ga) ₅	56	206/ 187–212	3
BoABI1/ AF180355	TATCAGGGTTTCTGGGTTG GTGAACAAGAAGAAAGAGAGCC	(tc) ₁₆	55	172/ 164–190	2
BoKAN45TR/ BZ523957	ATTATGACGCCTGGTTTTA ATTGGTTAGAAGTTATGGGAAC	(ttg) ₆	50	269/ 231–272	5
BoIAB19TF/ CC969431	AAGCCACCTCACCTTAGCC GAAATCCCAGAGACTGAAAACC	(ga) ₆	55	258/ 237–272	13
BoCALa/ AF241115 (1)	TTGTAAATGTAACAAAGGGG CAAAATGAACAATTCTCAGGG	(at) ₅ (ta) ₆	53	204/ 202–237	6
BoCALb/ AF241115 (2)	GTAATTCCTTGATAATTGC TCTGATTGGTTTGATGTGTCC	(ta) ₆₋₁	46	236/ 237–242	2

по интенсивности флюоресценции пропидия иодида в ядрах на проточном цитометре Beckman Coulter CytoFLEX в комплектации B2-RO-V2 (Beckman Coulter, США) с лазерным источником излучения с длиной волны 532 нм.

Визуализацию и обработку гистограмм проводили в программном обеспечении CytExpert 2.4 (Beckman Coulter).

Для оценки плоидности и содержания ДНК в качестве внешнего стандарта использовали диплоидные образцы донорных растений. Плоидность определяли по индексу разницы между пиками диплоидного стандарта того же вида и образца:

$$\text{Индекс} = \frac{\text{среднее пика образца}}{\text{среднее пика стандарта}}.$$

Содержание ДНК (2C, пг) рассчитывали по формуле

$$2C = \frac{\text{среднее пика образца}}{\text{среднее пика стандарта}} \times 2C \text{ стандарта}.$$

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью дисперсионного анализа (one-way, two-way ANOVA), а средние значения сравнивали с применением множественного критерия Дункана (DMRT) с вероятностью 95 %. Статистический анализ выполняли с использованием программы Statistica 8.0 (Statsoft, www.statsoft.com).

Результаты

Этапы эмбриогенеза капусты белокочанной

После выделения микроспоры капусты белокочанной были подвергнуты высокотемпературному стрессу при 32 °C в течение 1–2 суток, по окончании которых наблюдалось начало их деления (рис. 1, а, б). Для всех изученных образцов капусты белокочанной позднеспелого

срока созревания на 15-е сутки культивирования можно было видеть многоклеточные структуры, дальнейшее развитие которых могло происходить различными путями формирования эмбриоидов. Наиболее распространенный путь – формирование делящимися клетками глобул. Далее, подобно зиготическим эмбрионам *in vivo*, при переходе в сердцевидную стадию происходит смена радиальной симметрии на биполярную с закладкой двух будущих семядолей (рис. 2). Другой путь формирования эмбриоидов – через суспензороподобные структуры. В таких структурах отмечено поперечное деление дочерних клеток, что приводило к образованию суспензора в виде длинной нити (см. рис. 1, е). Более подробно такие пути формирования эмбриоидов изучены для других культур семейства Brassicaceae X. Tang с коллегами (2013) и E.V. Kozar с коллегами (2021).

Наряду с нормально развитыми эмбриоидами в культуре у всех генотипов мы наблюдали и аномально развитые эмбриоиды, которые характеризовались отсутствием семядолей и гипокотили (рис. 3, а, б), а также различные близнецовые формы (см. рис. 3, в–е). Доля таких аномальных эмбриоидов составляла от 1 до 15 % в зависимости от количества образовавшихся эмбриоидов на чашку Петри (выход эмбриоидов). В вариантах с высокоотзывчивыми генотипами процент аномальных эмбриоидов повышался.

Влияние размера бутонов

на эффективность эмбриогенеза

Преобладающая в культуре стадия развития микроспор и, следовательно, размер бутонов были определяющим фактором эффективности эмбриогенеза капусты белокочанной. Нами отмечено, что нельзя определить один оптимальный размер бутонов для всех генотипов. Перед

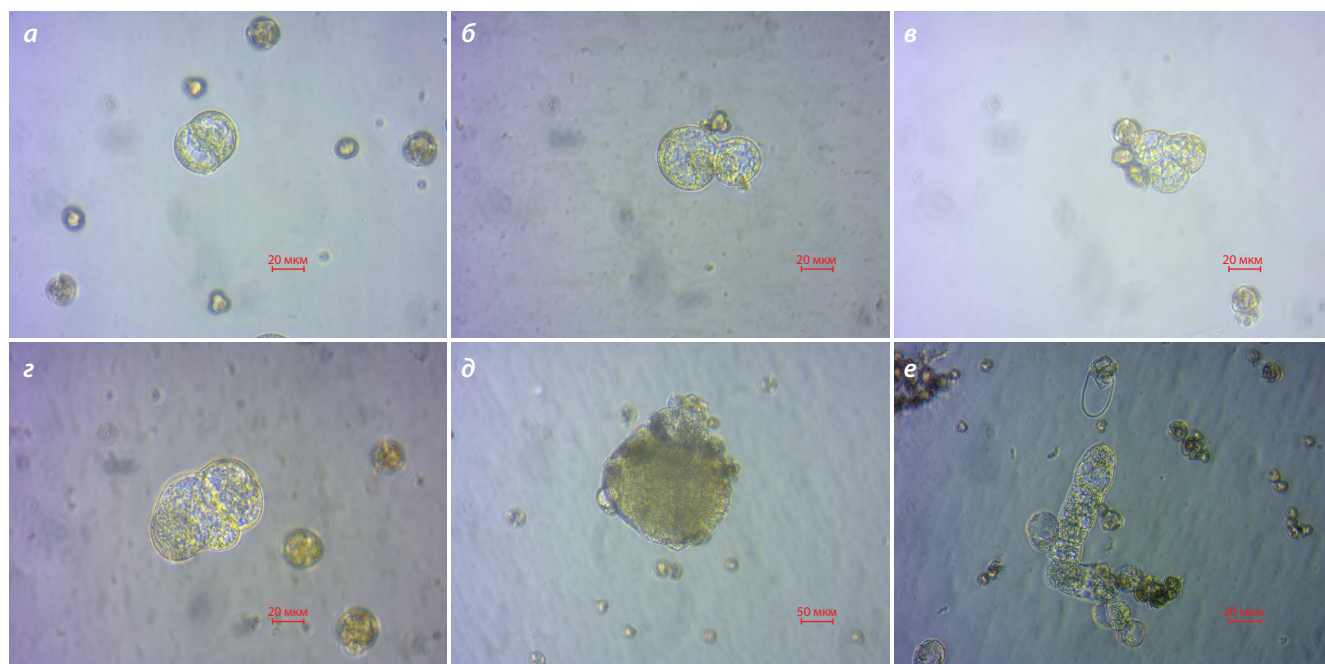


Рис. 1. Деление микроспор и формирование эмбриоидов капусты белокочанной в культуре *in vitro*.

а – первое деление микроспор – 1 сутки; б – 2 суток; в – 3 суток; г – 6 суток; д – формирование глобулы (14 суток); е – суспензороподобная структура.

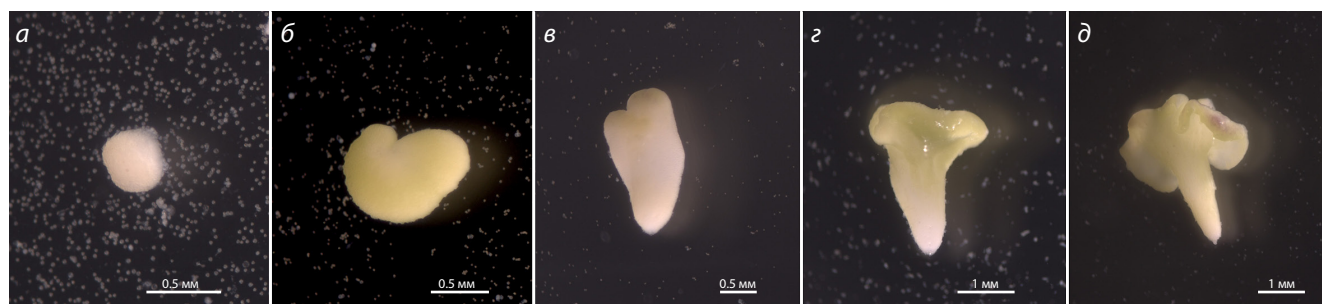


Рис. 2. Рост и развитие эмбриоида капусты белокочанной в культуре микроспор *in vitro*.

a – глобулярная стадия на 16-е сутки культивирования; *б* – сердечковидная стадия на 20-е сутки культивирования; *в* – сердечковидная стадия на 25-е сутки; *г* – эмбриоид на семядольной стадии на 30-е сутки; *д* – эмбриоид с разросшимися семядолями после 30-х суток культивирования.

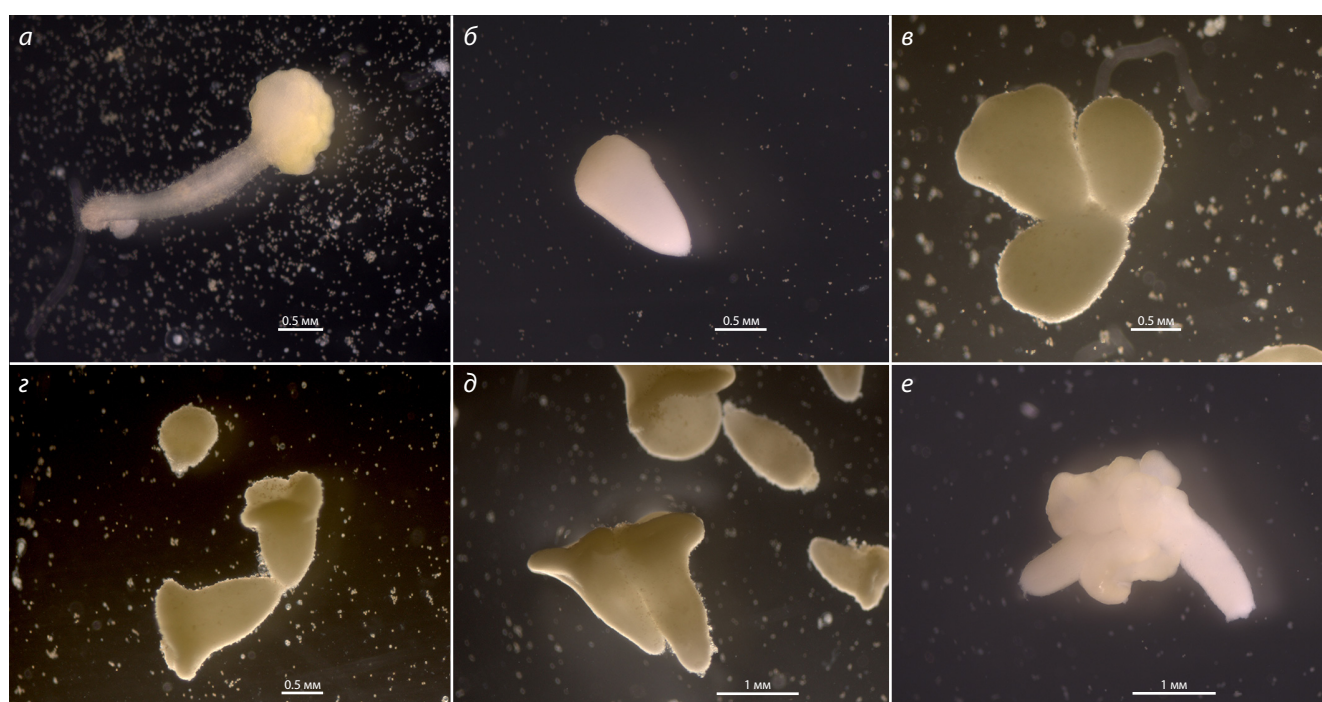


Рис. 3. Аномальное развитие эмбриоидов капусты белокочанной в культуре микроспор *in vitro*.

a – эмбриоид без явно выраженного гипокотыля; *б* – эмбриоид без сформированных семядолей; *в-е* – сросшиеся близнецовые формы эмбриоидов.

введением в культуру *in vitro* необходимо проводить рекогносцировочное определение линейных размеров бутонов каждого генотипа для сравнения наличия максимального количества микроспор на оптимальных для индукции андрогенеза стадиях развития с длиной бутона, так как генотипы имеют разные фенотипические особенности, проявляющиеся в том числе и в форме бутона. Округлая либо вытянутая форма бутона будет оказывать существенное влияние, отражающееся на диапазоне длин бутонов, подходящих для изоляции из них микроспор.

В предварительных экспериментах было определено, что выход эмбриоидов/чашку Петри существенно снижался вплоть до полного ингибирования эмбриогенеза, если в выборке бутонов диапазон длин превышал 1 мм. Это происходило за счет того, что в культуру *in vitro* попадало много микроспор/пыльцы, которые к 10–14-му дню культивирования погибали, оказывая токсическое действие на

культуру. Оптимальные для эмбриогенеза стадии развития мужского гаметофита содержались в выборках бутонов, варьирующих по длине в пределах 0.5 мм.

В эксперименте было выделено несколько групп, различающихся по длине бутонов, на которых был изучен выход эмбриоидов у восьми генотипов (табл. 2). Для всех генотипов максимальный выход эмбриоидов был получен только в какой-то одной из групп, что подтверждает необходимость отбирать бутоны по размеру с варьированием не более 0.5 мм в выборке. Только для генотипа № 2404 оптимальным оказался размер бутонов 3.5–3.9 мм. Для двух генотипов (№ 2403 и 303) оптимальным был размер 3.9–4.5 мм, а для пяти (№ 2405, 2406, 2407, 127, 360) – бутоны с размером в диапазоне 4.5–5.0 мм. Наибольший выход эмбриоидов достигнут для генотипа № 2406 из бутонов длиной 4.5–5.0 мм и составил в среднем $273.56 \pm \pm 32.21$ шт./чашку Петри (см. табл. 2).

Таблица 2. Выход эмбрионидов капусты белокочанной в культуре микроспор *in vitro* в зависимости от размера бутон

Генотип	Количество эмбрионидов, шт./чашку Петри (среднее $\pm$ SE)*			
	3.5–3.9	3.9–4.5	4.5–5.0	5.0–5.5
2403	0a	10.85 $\pm$ 0.69c	0.50 $\pm$ 0.29b	–
2404	16.00 $\pm$ 4.00c	2.00 $\pm$ 1.08b	0a	–
2405	–	0a	2.43 $\pm$ 1.04b	0.11 $\pm$ 0.11a
2406	–	22.25 $\pm$ 4.91b	273.56 $\pm$ 32.21c	0.25 $\pm$ 0.25a
2407	–	0a	1.33 $\pm$ 0.88b	0a
127	–	136.50 $\pm$ 17.97b	265.00 $\pm$ 5.11c	2.50 $\pm$ 0.50a
360	–	16.75 $\pm$ 0.75b	136.25 $\pm$ 3.84c	1.00 $\pm$ 0.71a
303	0a	38.50 $\pm$ 0.65c	4.00 $\pm$ 1.58b	–

Примечание. «–» – в вариантах исследования отсутствовали микроспоры на оптимальной стадии развития.

* Здесь и в табл. 3: значения, за которыми следует одна и та же буква (a–c), существенно не различаются с вероятностью 95 %, согласно множественному критерию Дункана.

Влияние температурной обработки, pH среды и их взаимодействия на эмбриогенез микроспор

В вариантах эксперимента при культивировании микроспор при постоянной температуре 25 °C у всех включенных в исследование генотипов эмбрионидов не образовывалось. Кратковременная шоковая температурная обработка при 32 °C для всех изученных генотипов капусты белокочанной оказалась решающим фактором перепрограммирования микроспор на спорофитный путь развития с образованием эмбрионидов. При этом продолжительность температурной обработки оказала существенное влияние на выход эмбрионидов. Максимальный выход эмбрионидов для генотипа № 2406 достигнут при 48-часовой обработке. Температурная обработка в течение 1 суток также инициировала эмбриогенез, но оказалась недостаточной для большинства потенциально эмбриогенных микроспор у изученного генотипа (Приложение, рис. S1)¹. Для генотипов № 127 и 360 значимость между выходом эмбрионидов при высокотемпературной обработке в течение 24 и 48 ч была незначительна. При увеличении времени обработки до 3 суток происходило значительное снижение выхода эмбрионидов для всех изученных генотипов капусты белокочанной (рис. 4). При этом было отмечено, что у генотипов, отличающихся низкой отзывчивостью в этом варианте эксперимента, эмбрионидов не получено (табл. S1).

В результате серии экспериментов на четырех генотипах капусты белокочанной с применением сред с различным уровнем pH показано значительное влияние кислотности питательной среды на выход эмбрионидов. При этом все генотипы по-разному реагируют на значение данного показателя (табл. 3). В наших опытах использованы питательные среды с наиболее распространенными для культивирования *in vitro* (Yuan, 2012) показателями pH (5.8; 6.1; 6.4). Внутри каждого генотипа мы наблюдали существенное смещение выхода эмбрионидов относительно pH среды. Для генотипов № 2403, 2405, 2407 при pH среды 5.8 достигнут наибольший выход эмбрионидов. Однако для генотипа № 2404, напротив, среда с pH 6.1 и 6.4

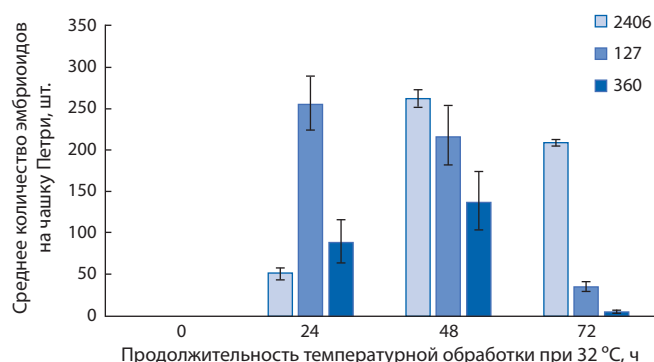


Рис. 4. Влияние продолжительности шоковой температурной обработки микроспор капусты белокочанной высокоотзывчивых генотипов № 2406, 127 и 360 при 32 °C на выход эмбрионидов (слева направо: 25 °C постоянно, 24 ч – 32 °C, 48 ч – 32 °C, 72 ч – 32 °C).

Таблица 3. Выход эмбрионидов капусты белокочанной в культуре микроспор *in vitro* в зависимости от pH питательной среды

Генотип	Количество эмбрионидов, полученных при различных уровнях pH, шт./чашку Петри (среднее $\pm$ SE)		
	5.8	6.1	6.4
2403	13.0 $\pm$ 1.0a	3.5 $\pm$ 2.5b	1.0 $\pm$ 0.0c
2404	9.5 $\pm$ 2.5b	21.0 $\pm$ 8.0a	18.0 $\pm$ 1.0a
2405	4.5 $\pm$ 2.5a	2.3 $\pm$ 0.9a	0.7 $\pm$ 0.3b
2407	0.5 $\pm$ 0.3a	0.5 $\pm$ 0.3a	0b

повысила эффективность эмбриогенеза более чем в 2 раза. В то же время питательная среда с pH 5.8 для этого генотипа также способствовала выходу эмбрионидов, но в меньшем количестве.

Для генотипа № 2403 был проведен эксперимент по совместному влиянию кислотности среды и высокотемпературной обработки на эмбриогенез. Проведенный двухфакторный дисперсионный анализ показал, что и фактор

¹ Табл. S1, S2 и рис. S1, S2 Приложения см. по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx17.pdf>

кислотности питательной среды, и фактор индукционной высокотемпературной обработки, а также взаимодействие обоих факторов оказывают существенное влияние на выход эмбриоидов (табл. S2). При этом фактор индукционной температурной обработки является основным (доля влияния – 45 %) и, по-видимому, именно он запускает эмбриогенез в культуре изолированных микроспор. Это подтверждается отсутствием эмбриоидов во всех трех вариантах опыта с различной кислотностью питательной среды, если микроспоры не подвергались высокотемпературному стрессу и культивировались при 25 °С. Температурная обработка при 32 °С способствовала перепрограммированию микроспор на путь спорофитного развития и индукции эмбриогенеза во всех вариантах кислотности питательной среды. Наибольший выход эмбриоидов был достигнут при продолжительности высокой температурной обработки в течение 48 ч и pH среды 5.8. Также увеличение продолжительности температурной обработки до 2 суток способствовало повышению выхода эмбриоидов и при pH среды 6.1, но в меньшем количестве. Однако при более высоком значении pH, 6.4, продолжительность температурной обработки не оказала существенного влияния на выход эмбриоидов (см. табл. S2).

Регенерация DH-растений из эмбриоидов

Эмбриоиды с семядольными листьями, находящиеся в жидкой среде, пересаживали сначала на твердую сре-

ду MS (рис. 5, а) с добавлением 20 г/л сахарозы, 7 г/л агар, БАП (1 мг/л), НУК (0.1 мг/л) и ГК (0.1 мг/л) для индукции побегообразования. Через 1 месяц образовавшиеся адвентивные побеги пересаживали для укоренения на два варианта твердой безгормональной среды MS, содержащей 20 г/л сахарозы и 7 г/л агара либо 3.5 г/л фитогеля (см. рис. 5, б). При посадке на среду с фитогелем отмечалось разрастание каллуса у основания побега, а корни не образовывались. На питательных средах, где в качестве гелеобразующего агента использован агар, побеги достаточно быстро (в течение 7–10 суток) образовывали хорошо развитую корневую систему (см. рис. 5, в).

Идентификация плоидности растений-регенерантов

Плоидность растений-регенерантов капусты белокочанной определяли на стадии рассады (5–8 листьев) с помощью метода проточной цитометрии клеточных ядер (рис. S2). Исследования показали, что в выборке 163 проанализированных растений-регенерантов изученных шести генотипов капусты белокочанной, успешно прошедших этап адаптации, в среднем было определено: гаплоидов – 8.4 %, удвоенных гаплоидов – 69.8 %, триплоидов – 1.5 %, тетраплоидов – 20.3 %. При этом между генотипами наблюдалась существенная разница по процентному соотношению выявленных уровней плоидности среди растений-регенерантов, полученных из определенного генотипа (табл. 4).

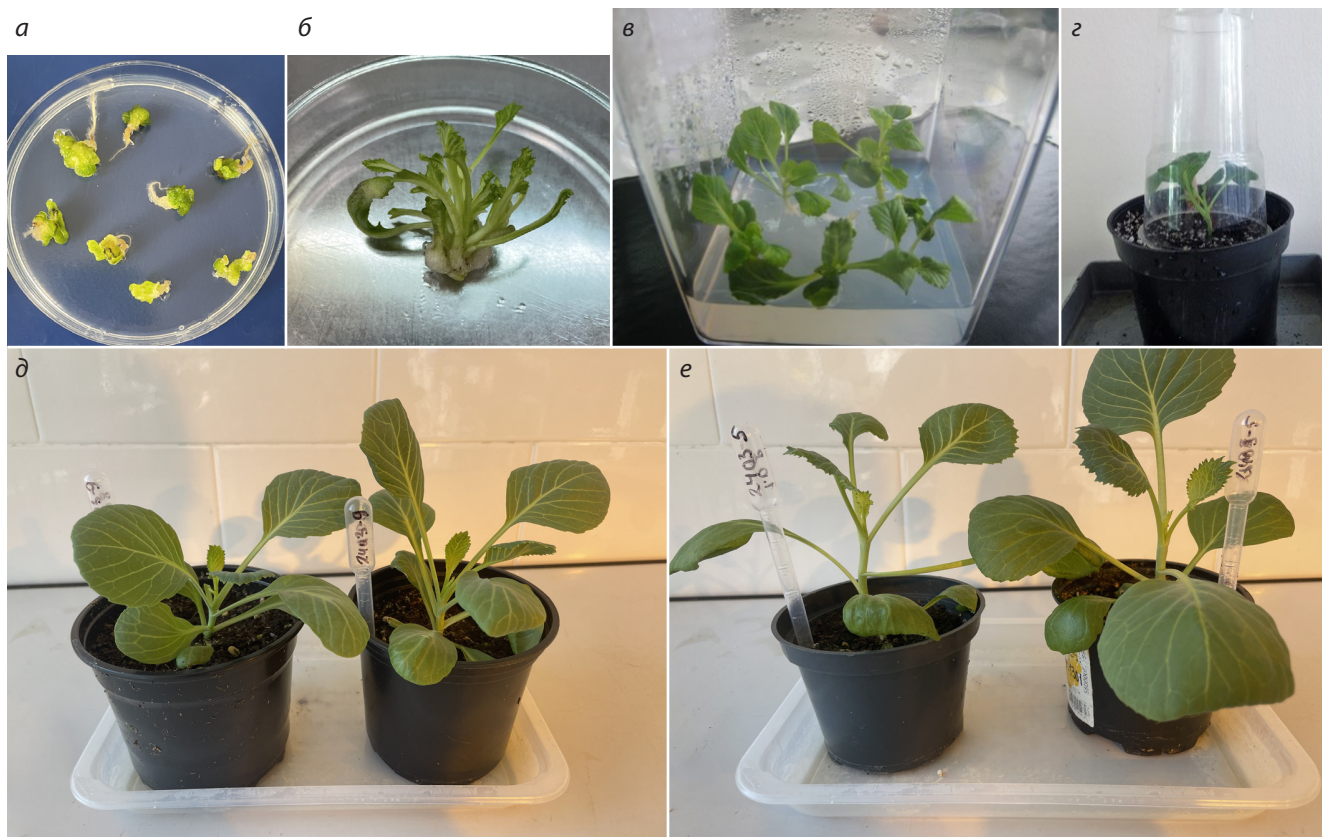


Рис. 5. Регенерация растений капусты белокочанной № 2403 из эмбриоидов и адаптация к условиям *ex vitro*.

а – разрастание эмбриоидов на среде MS; б – вторичный эмбриогенез; в – ризогенез; з – адаптация к условиям *ex vitro*; д – внешний вид диплоидных растений (2n), полученных из генотипа № 2403; е – внешний вид тетраплоидных растений (4n), полученных из генотипа № 2403.

Таблица 4. Определение уровня пloidности растений-регенерантов капусты белокочанной

Генотип	Количество проанализированных растений, шт.	Диагностированный уровень пloidности, %			
		<i>n</i>	2 <i>n</i>	3 <i>n</i>	4 <i>n</i>
2403	50	0.0	88.0	0.0	12.0
2406	25	0.0	64.0	0.0	36.0
2404	13	7.8	46.1	0.0	46.1
127	20	5.0	70.0	5.0	20.0
303	30	30.0	66.7	0.0	3.3
360	25	8.0	84.0	4.0	4.0
Итого	163	8.4	69.8	1.5	20.3

Подтверждение гаплоидного происхождения растений-регенерантов капусты белокочанной

Для подтверждения гаплоидного происхождения диплоидных растений-регенерантов из четырех образцов, № 2403, 2406, 303, 360, полученных через культуру изолированных микроспор, протестировано девять микросателлитных локусов, которые ранее были успешно использованы для генотипирования капусты белокочанной: AJ427337, AF180355, AF241115(1), AF241115(2), AF458409, AF113918, BZ5223957, CC969431, U67451 (Tonguç, Griffiths, 2004; Louarn et al., 2007; Домблидес и др., 2020). Генетических различий между растениями-регенерантами и исходными донорными генотипами не обнаружено по локусам AJ427337, AF180355 и AF241115(1), где был получен только один аллель для всех включенных в исследование генотипов донорных растений. Более четырех аллелей амплифицировалось с праймерами для локуса CC969431, что превышало ожидаемое число, и

поэтому данный маркер не был использован при оценке различий между изучаемыми образцами. Праймеры для локусов BZ5223957 и AF241115(2) позволяли обнаружить полиморфизм между донорными растениями и полученными растениями-регенерантами только у генотипов № 2406 и 303.

Амплификация с локусами AF458409, AF113918 и U67451 выявляла полиморфизм у всех четырех генотипов. Так, например, в результате амплификации локуса AF458409 у донорных растений обнаружено три аллеля для образца № 2403 и два аллеля для образца № 2406, тогда как у диплоидных растений-регенерантов наблюдали всего по одному аллелю (рис. 6).

Локус U67451 показал при анализе два аллеля у донорных растений образцов № 2406, 303 и 360 и три аллеля у донорных растений образца № 2403, в то время как у растений-регенерантов отмечено лишь по одному из аллелей (рис. 7).

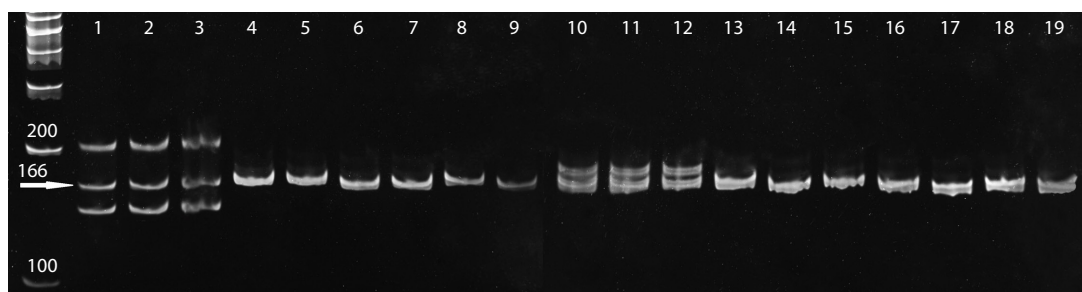


Рис. 6. Электрофореграмма результатов амплификации ДНК растений капусты белокочанной по микросателлитному локусу AF458409.

Здесь и на рис. 7: 1–3 – образцы донорных растений генотипа № 2406; 4–9 – диплоидные растения-регенеранты, полученные через культуру изолированных микроспор из образца № 2406; 10–12 – образцы донорных растений генотипа № 2403; 13–19 – диплоидные растения-регенеранты, полученные через культуру изолированных микроспор из образца № 2403.

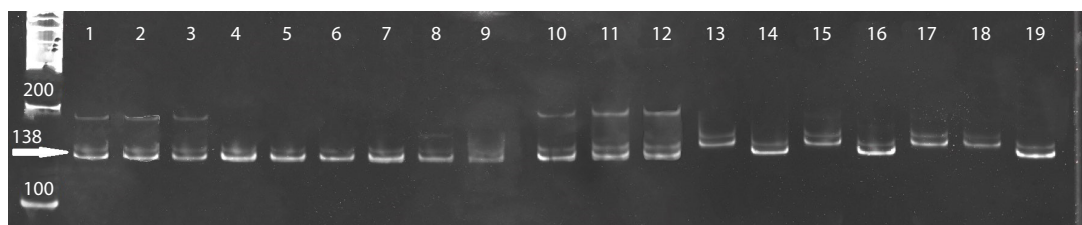


Рис. 7. Электрофореграмма результатов амплификации ДНК растений капусты белокочанной по микросателлитному локусу U67451.

Отсутствие идентичности в спектрах донорных растений с полученными из них растениями-регенерантами капусты белокочанной наблюдали и по микросателлитному локусу AF113918: у растений-регенерантов на спектрах присутствовало всегда уменьшенное относительно донорного растения количество аллелей.

Таким образом, молекулярно-генетический анализ с применением микросателлитных маркеров позволил подтвердить гаплоидное происхождение растений-регенерантов из микроспор. При анализе спектров трех микросателлитных локусов, AF458409, AF113918 и U67451, показано отсутствие сходства в спектрах донорных растений с растениями-регенерантами, а также отмечено присутствие меньшего числа аллелей у DH-растений капусты белокочанной. В случае использования для получения DH-растений культуры изолированных пыльников *in vitro* данный этап технологии должен быть обязательным, и только он со 100 % точностью даст возможность отделить истинные удвоенные гаплоиды от диплоидных растений-регенерантов, имеющих происхождение из соматических тканей пыльника.

Обсуждение

За последние десятилетия в развитии клеточных технологий растений рода *Brassica* были достигнуты значительные успехи. Они базируются на оптимизации условий культивирования и применении манипуляций, повышающих выход эмбриоидов.

Отбор бутонов на оптимальной стадии развития микроспор определяет успешность эмбриогенеза в любом протоколе культивирования *in vitro*. Согласно литературным данным, микроспоры на поздней одноядерной и ранней двухклеточной стадиях имеют наибольшую вероятность формирования эмбриоидов *in vitro* (Kott et al., 1988; Pechan, Keller, 1988). При этом стадия развития микроспор коррелирует с размером бутонов, что позволяет проводить отбор материала по этому признаку (Fan et al., 1988; Huang et al., 1990). Исследования для разных представителей рода *Brassica* продемонстрировали, что оптимальный размер бутонов варьирует между генотипами внутри каждого вида, зависит от межвидового различия растений и индивидуальных фенотипических особенностей. Так, опытным путем были установлены оптимальные размеры бутонов изучаемых генотипов: для брокколи 4–5 мм (Takahata, Keller, 1991), капусты цветной 4–6 мм (Gu et al., 2014), капусты краснокочанной 4.1–5.0 мм (Mineykina et al., 2021), горчицы сарептской 3.0–3.1 мм (Ali et al., 2008), капусты белокочанной 2.5–3.5 мм (Yuan et al., 2012; Tuncer et al., 2016), капусты белокочанной индонезийского происхождения 4.5–4.6 мм (Winarto, da Silva, 2011).

В ранних исследованиях показано, что большая доля незембрионных микроспор при совместном культивировании приводит к повышению уровня аутоксина в среде, влияющих на развитие эмбриоидов. При этом негативное действие токсина коррелировало с наличием в культуре двухъядерных микроспор (Kott et al., 1988). В более поздних исследованиях (Duijs et al., 1992) получены хорошие результаты в вариантах с содержанием в бутоне от 10 до 40 % двухъядерной пыльцы. Нами было отмечено, что стадия развития микроспор является ли-

митирующим фактором в культуре *in vitro* капусты белокочанной. Поскольку у капусты отмечено выраженное асинхронное развитие микроспор в пределах бутона, то их отбор с определенным пределом варьирования размера позволяет максимально охватить потенциально эмбрионные микроспоры.

В работе R. Lighter (1989) проведена модификация протокола культивирования микроспор для культур семейства Brassicaceae. Добавление в культивируемую среду активированного угля и использование шейкера в культуре микроспор способствовали минимизации факторов, влияющих на разрушение клеток и подавление их деления. Исследования J.C. da Silva Dias (1999) также указывают на повышение эмбриогенеза у различных генотипов капустных культур при использовании активированного угля в культуральной среде. Сокращение времени культивирования на 1–4 суток при применении платформы-шейкера отмечалось при культивировании микроспор капусты китайской на жидкой среде (Yuan et al., 2012).

В наших исследованиях для повышения уровня выживаемости микроспор капусты белокочанной и ингибирования продуктов окисления, негативно влияющих на деление клеток, мы применяли активированный уголь во всех вариантах как неотъемлемый элемент протокола. Использование платформы-шейкера позволило ускорить развитие эмбриоидов, тем самым повысить эффективность протокола за счет сокращения времени культивирования эмбриоидов в жидкой питательной среде. Это дало возможность большему количеству эмбриоидов на 7–10-е сутки быстрее достичь семядольной стадии развития, что особенно важно для высокоотзывчивых генотипов, где созревание эмбриоидов происходит неравномерно.

Стресс – самое важное условие при переходе микроспор с гаметофитного пути на спорофитный с образованием эмбриоидов (Touraev et al., 1996). Тип воздействия стрессом может применяться как *in vivo*, так и *in vitro*. Наиболее распространенные типы стресса для капустных культур – воздействие низкими положительными температурами на бутоны и соцветия (Gu et al., 2014) и кратковременный тепловой шок микроспор в культуре *in vitro* (Custers et al., 1994).

Предварительная обработка низкими положительными температурами не способствует перепрограммированию развития микроспор, однако эффективно поддерживает их жизнеспособность (Žur et al., 2009). Чаще всего как индуцирующий фактор эмбриогенеза используют тепловую обработку выделенных микроспор от 30 до 40 °C с различной временной экспозицией от 1 до 3 суток (Takahata, Keller, 1991; Duijs et al., 1992; Ferrie, Caswell, 2011). Некоторые исследователи указывают на влияние продолжительности высокотемпературной обработки на количество образующихся эмбриоидов (Telmer et al., 1992; Custers et al., 1994; Cordewener et al., 1995; Simmonds, Keller, 1999). Для капусты белокочанной индонезийского происхождения (Winarto, da Silva, 2011) было установлено успешное влияние 30.5 °C при воздействии в течение 48 ч, а затем непрерывное культивирование при 25 °C. Ограничением данного исследования было образование 30 % эмбриоидов с аномальным развитием семядолей и отсутствием гипокотилей. В. Tuncer с коллегами (2016) изучили влия-

ние температурного шока на индукцию эмбриогенеза и развитие эмбриоидов у *B. oleraceae* турецкого происхождения. Они отмечают положительное влияние 32 и 35 °C в течение 2 суток на индукцию эмбриогенеза, однако развитие эмбриоидов было затруднено, растения капусты белокочанной не были регенерированы.

Для понимания молекулярной регуляции эмбриогенеза, индуцированного высокотемпературной обработкой, Н. Су с коллегами (2020) провели протеомное исследование и на основании анализа обнаружили взаимодействие этих процессов. Высокотемпературный шок при 32 °C в течение 24 ч вызывал изменения в экспрессии специфических белков в культуре изолированных микроспор *in vitro* капусты.

Помимо того, что высокотемпературный стресс является эффективным триггером переключения развития микроспор по спорофитному пути, он также оказывает негативное влияние на процесс деления клеток. Исследования А. Zeng с коллегами (2015) указывают на массовую гибель микроспор капусты белокочанной (80–90 %) после 3 суток культивирования *in vitro*. Они зафиксировали начало гибели микроспор после 24 ч шоковой температурной обработки при 32.5 °C, предположительно, вызванное повышением уровня активных форм кислорода (АФК) и связанное с ним окислительным стрессом, влияющим на жизнеспособность клеток и их метаболизм. По результатам исследований I. Žig с коллегами (2009), летальный эффект высокой температуры при индукции эмбриогенеза микроспор тритикале связан с резким снижением ферментативной активности всех изученных антиоксидантов. Они предполагают, что высокотемпературный стресс индуцировал состояние окислительного стресса и клетки в среде, вызывающей азотно-углеводное голодание (Куо, Нарата, 1986), не могли активировать защитные реакции. Снижению уровня АФК способствовало применение в культуре микроспор аскорбиновой кислоты как специфического антиоксиданта (Zeng et al., 2015). Однако использование аскорбиновой кислоты в культуре *in vitro* не всегда оказывает положительный эффект и зависит от ее концентрации (Rodriguez-Serrano et al., 2012; Hoseini et al., 2014).

I. Varinova с коллегами (2004) при культивировании микроспор табака наблюдали влияние углеводного стресса, вызванного высокими значениями pH среды. В результате анализа метаболизма сахарозы при различных значениях pH было показано, что активность инвертазы (ЕС 3.2.1.26) в микроспорах была максимальной при pH 5.0 и сильно снижалась при более высоких pH, что приводило к замедлению расщепления сахарозы. Полученные данные позволили предположить, что изолированные микроспоры не способны к метаболизму углеводов при более высоких значениях pH и подвергаются голодному стрессу, который, в свою очередь, запускает спорофитное развитие.

Наши исследования подтверждают индуцирующее действие высокотемпературного стресса 32 °C на развитие микроспор капусты белокочанной по спорофитному пути. А влияние кислотности питательной среды на выход эмбриоидов определяется продолжительностью высокотемпературной обработки микроспор.

Среди применяемых для получения удвоенных гаплоидов технологий только при использовании культуры изолированных микроспор можно быть уверенным, что образовавшиеся эмбриоиды имеют происхождение из гаплоидных клеток, в то время как при культивировании пыльников и неопыленных семян в культуру *in vitro* попадают и соматические ткани. Процесс образования каллуса и эмбриоидов, а впоследствии и растений-регенерантов из соматических (диплоидных) тканей стенок пыльника является общеизвестным фактом. Для того чтобы отличить истинные удвоенные гаплоидные линии, происходящие из гамет, от растений-регенерантов, имеющих соматическое происхождение, с успехом применяется молекулярный анализ. Из литературы известно об использовании скрининга с помощью молекулярных маркеров биотехнологических форм растений перца, полученных через культуру *in vitro* (Gyulai et al., 2000). В работе (Cousin, Nelson, 2009) использование восьми микросателлитных маркеров подтвердило гомозиготность и происхождение из гаплоидных клеток растений-регенерантов рапса, полученных в культуре микроспор.

SSR-анализ также успешно был применен для оценки гетерозиготности и определения происхождения (гаметофитного или соматического) у лимона (Yahyaoui, Germanà, 2021), огурца (Diao et al., 2009), дыни (Malik et al., 2011) и капусты пекинской (Adamus et al., 2021). Наши результаты также позволили подтвердить гаметофитное происхождение растений-регенерантов с использованием микросателлитных маркеров, были показаны отсутствие сходства в спектрах донорных растений с растениями-регенерантами и уменьшение числа аллелей у DH-растений капусты белокочанной.

Закключение

В результате проведенных исследований оптимизирован протокол получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* для капусты белокочанной позднеспелого срока созревания, позволяющий достичь выхода эмбриоидов до 273.6 ± 32.2 шт./чашку Петри. Для достижения результата нужно использовать многофакторный подход, учитывающий особенности генотипа. Перед введением в культуру *in vitro* необходимо обязательно проводить рекогносцировочное определение линейных размеров бутонов, содержащих преимущественно микроспоры на оптимальной для индукции эмбриогенеза стадии развития с диапазоном длин в выборке не более 0.5 мм. На конечный выход эмбриоидов капусты белокочанной существенную долю влияния оказывают продолжительность индукционной температурной обработки и кислотность питательной среды. Культивирование индуцированных микроспор в темноте на платформе-шейкере при режиме 40 об./мин дает возможность значительно ускорить достижение эмбриоидами семядольной стадии развития и сократить этот этап технологии на 7–10 суток. Использование проточной цитометрии позволяет достаточно быстро ранжировать полученные растения-регенеранты по уровню пloidности на ранней стадии развития. В выборке полученных растений отмечались: гаплоиды (8.4 %), удвоенные гаплоиды (69.8 %), триплоиды (1.5 %) и тетраплоиды (20.3 %).

Анализ с микросателлитными маркерами подтвердил гаплоидное происхождение диплоидных растений-регенерантов. На примере трех микросателлитных локусов, AF458409, AF113918 и U67451, показано отсутствие идентичности в спектрах донорных растений с растениями-регенерантами капусты белокочанной, а также отмечено присутствие меньшего числа аллелей у DH-растений.

Список литературы / References

- Домблides А.С., Бондарева Л.Л., Пивоваров В.Ф. Оценка генетического разнообразия образцов капусты кочанной (*Brassica oleracea* L.) с использованием SSR маркеров. *Сельскохозяйственная биология*. 2020;55(5):890-900. doi 10.15389/agrobiology.2020.5.890rus
- [Domblides A.S., Bondareva L.L., Pivovarov V.F. Assessment of genetic diversity among headed cabbage (*Brassica oleracea* L.) accessions by using SSR markers. *Sel'skokhozyajstvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2020;55(5):890-900. doi 10.15389/agrobiology.2020.5.890rus (in Russian)]
- Adamus A., Szklarczyk M., Kielkowska A. Haploid and doubled haploid plant production in *Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* via microspore culture. *Methods Mol Biol*. 2021;2288:181-199. doi 10.1007/978-1-0716-1335-1_11
- Alexander M.P. Differential staining of aborted and non-aborted pollen. *Stain Technol*. 1969;44(3):117-122. doi 10.3109/10520296909063335
- Ali M.M., Khaleque M.A., Custers J.B.M., Khurram M.M.H. Microspore culture and the performance of microspore derived doubled haploid in *Brassica juncea* (L.). *Bangladesh J Agric. Res*. 2008; 33(4):571-578. doi 10.3329/bjar.v33i4.2290
- Barinova I., Clément C., Martiny L., Baillieu F., Soukupova H., Heberle-Bors E., Touraev A. Regulation of developmental pathways in cultured microspores of tobacco and snapdragon by medium pH. *Planta*. 2004;219(1):141-146. doi 10.1007/s00425-003-1202-5
- Barro F., Fernández-Escobar J., De La Vega M., Martín A. Modification of glucosinolate and erucic acid contents in doubled haploid lines of *Brassica carinata* by UV treatment of isolated microspores. *Euphytica*. 2003;129(1):1-6. doi 10.1023/A:1021578318098
- Bhatia R., Dey S.S., Parkash C., Sharma K., Sood S., Kumar R. Modification of important factors for efficient microspore embryogenesis and doubled haploid production in field grown white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) genotypes in India. *Sci Hortic*. 2018;233:178-187. doi 10.1016/j.scienta.2018.01.017
- Cao M.Q., Charlot F., Dore C. Embryogenesis and plant regeneration in sauerkraut cabbage (*Brassica oleracea* L. subsp. *capitata*) by *in vitro* culture of isolated microspores. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III*. 1990;310:203-209. doi 10.1007/BF00231964
- Cordewener J.H.G., Hause G., Görgen E., Busink R., Hause B., Dons H.J.M., Van Lammeren A.A.M., Van Lookeren Campagne M.M., Pechan P. Changes in synthesis and localization of members of the 70-kDa class of heat-shock proteins accompany the induction of embryogenesis in *Brassica napus* L. microspores. *Planta*. 1995;196:747-755. doi 10.1007/BF01106770
- Cousin A., Nelson M.N. Twinned microspore-derived embryos of canola (*Brassica napus* L.) are genetically identical. *Plant Cell Rep*. 2009;28(5):831-835. doi 10.1007/s00299-009-0677-3
- Cristea T.O., Iosob G.A., Brezeanu C., Brezeanu P.M. Effect of chemical composition of nutritive medium and explant size over androgenetic response in microspore culture of *Brassica oleracea* L. *Rev Chim*. 2020;71(10):131-136. doi 10.37358/RC.20.10.8357
- Custers J.B.M., Cordewener J.H.G., Nöllen Y., Dons H.J.M., Van Lookeren Campagne M.M. Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. *Plant Cell Rep*. 1994;13(5):267-271. doi 10.1007/BF00233317
- da Silva Dias J.C. Effect of activated charcoal on *Brassica oleracea* microspore culture embryogenesis. *Euphytica*. 1999;108:65-69. doi 10.1023/A:1003634030835
- da Silva Dias J.C. Protocol for broccoli microspore culture. In: *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. Springer Netherlands, 2003; 195-204. doi 10.1007/978-94-017-1293-4_30
- Diao W.P., Jia Y.Y., Song H., Zhang X.Q., Lou Q.F., Chen J.F. Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenerants using SSR markers. *Sci Hortic*. 2009; 119(3):246-251. doi 10.1016/j.scienta.2008.08.016
- Duijs J.G., Voorrips R.E., Visser D.L., Custers J.B.M. Microspore culture is successful in most crop types of *Brassica oleracea* L. *Euphytica*. 1992;60:45-55. doi 10.1007/BF00022257
- Fan Z., Armstrong K.C., Keller W.A. Development of microspores *in vivo* and *in vitro* in *Brassica napus* L. *Protoplasma*. 1988;147: 191-199. doi 10.1007/BF01403347
- Ferrie A.M.R., Caswell K.L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2011;104:301-309. doi 10.1007/s11240-010-9800-y
- Ferrie A.M.R., Epp D.J., Keller W.A. Evaluation of *Brassica rapa* L. genotypes for microspore culture response and identification of a highly embryogenic line. *Plant Cell Rep*. 1995;14(9):580-584. doi 10.1007/BF00231942
- Gu H.H., Zhou W.J., Hagberg P. High frequency spontaneous production of doubled haploid plants in microspore cultures of *Brassica rapa* ssp. *chinensis*. *Euphytica*. 2003;134:239-245. doi 10.1023/B:EUPH.0000004945.01455.6d
- Gu H., Zhao Z., Sheng X., Yu H., Wang J. Efficient doubled haploid production in microspore culture of loose-curd cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Euphytica*. 2014;195:467-475. doi 10.1007/s10681-013-1008-x
- Gyulai G., Gemesne J.A., Sagi Zs., Venczel G., Pinter P., Kristof Z., Torjek O., Heszky L., Bottka S., Kiss J., Zatyko L. Doubled haploid development and PCR-analysis of F₁ hybrid derived DH-R₂ paprika (*Capsicum annuum* L.) lines. *J Plant Physiol*. 2000;156(2):168-174. doi 10.1016/S0176-1617(00)80302-8
- Hoseini M., Ghadimzadeh M., Ahmadi B., da Silva J.A. Effects of ascorbic acid, alpha-tocopherol, and glutathione on microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 2014;50:26-35. doi 10.1007/s11627-013-9579-8
- Huang B., Bird S., Kemble R., Simmonds D., Keller W., Miki B. Effects of culture density, conditioned medium and feeder cultures on microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. *Plant Cell Rep*. 1990;8(10):594-597. doi 10.1007/BF00270061
- Ji J., Su H., Cao W., Zhang X., Li H., Fang Z., Yang L., Zhang Ya., Zhuang M., Wang Yo., Taranov V., Lv H. Genetic analysis and mapping of QTLs for isolated microspore embryogenesis in cabbage. *Scientia Horticulturae*. 2023;313:111897. doi 10.1016/j.scienta.2023.111897
- Kasha K.J. Chromosome doubling and recovery of doubled haploid plants. In: Don Palmer C., Keller W.A., Kasha K.J. (Eds) *Haploids in Crop Improvement II. Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 56. Springer, 2005;123-152. doi 10.1007/3-540-26889-8_7
- Kitashiba H., Taguchi K., Kaneko I., Inaba K., Yokoi S., Takahata Y., Nishio T. Identification of loci associated with embryo yield in microspore culture of *Brassica rapa* by segregation distortion analysis. *Plant Cell Rep*. 2016;35(10):2197-2204. doi 10.1007/s00299-016-0292-4. Epub 2016 Jul 20.
- Kott L.S. Application of doubled haploid technology in breeding of oilseed *Brassica napus*. *AgBiotech News Inf*. 1998;10:69N-73N. doi 10.1533/9781908818478.183
- Kott L.S., Polsoni L., Beversdorf W.D. Cytological aspects of isolated microspore culture of *Brassica napus*. *Can J Bot*. 1988;66(8):1658-1664. doi 10.1139/b88-226
- Kozar E.V., Domblides E.A., Soldatenko A.V. Embryogenesis of European radish (*Raphanus sativus* L. subsp. *sativus* convar. *radicula*) in

- culture of isolated microspores in vitro. *Plants*. 2021;10(10):2117. doi 10.3390/plants10102117
- Kozar E.V., Kozar E.G., Domblides E.A. Effect of the method of microspore isolation on the efficiency of isolated microspore culture in vitro for Brassicaceae family. *Horticulturae*. 2022;8(10):864. doi 10.3390/horticulturae8100864
- Kyo M., Harada H. Control of the developmental pathway of tobacco pollen in vitro. *Planta*. 1986;168:427-432. doi 10.1007/BF00392260
- Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. 1982;105(5):427-434. doi 10.1016/S0044-328X(82)80040-8
- Lighter R. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different Brassicaceae species. *Plant Breeding*. 1989;103(2):119-123. doi 10.1111/j.1439-0523.1989.tb00359.x
- Louarn S., Torp A.M., Holme I.B., Andersen S.B., Jensen B.D. Database derived microsatellite markers (SSRs) for cultivar differentiation in *Brassica oleracea*. *Genet Resour Crop Evol*. 2007;54(8):1717-1725. doi 10.1007/s10722-006-9181-6
- Malik A.A., Cui L., Zhang S., Chen J. Efficiency of SSR markers for determining the origin of melon plantlets derived through unfertilized ovary culture. *Hort Sci*. 2011;38(1):27-34. doi 10.17221/47/2010-HORTSCI
- Minейкина А., Бондарева Л., Soldatenko А., Домблидес Е. Androgenesis of red cabbage in isolated microspore culture in vitro. *Plants*. 2021;10(9):1950. doi 10.3390/plants10091950
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 1962;15(3):473. doi 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Pechan P.M., Keller W.A. Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiol Plant*. 1988;74(2):377-384. doi 10.1111/j.1399-3054.1988.tb00646.x
- Pechan P.M., Smykal P. Androgenesis: affecting the fate of the male gametophyte. *Physiol Plant*. 2001;111(1):1-8. doi 10.1034/j.1399-3054.2001.1110101.x
- Prem D., Gupta K., Sarkar G., Agnihotri A. Activated charcoal induced high frequency microspore embryogenesis and efficient doubled haploid production in *Brassica juncea*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2008;93:269-282. doi 10.1007/s11240-008-9373-1
- Rodriguez-Serrano M., Bárány I., Prem D., Coronado M.-J., Risueño M.C., Testillano P.S. NO, ROS, and cell death associated with caspase-like activity increase in stress-induced microspore embryogenesis of barley. *J Exp Bot*. 2012;63(5):2007-2024. doi 10.1093/jxb/err400
- Rudolf K., Bohanec B., Hansen M. Microspore culture of white cabbage, *Brassica oleracea* var. *capitata* L.: genetic improvement of non-responsive cultivars and effect of genome doubling agents. *Plant Breed*. 1999;118(3):237-241. doi 10.1046/j.1439-0523.1999.118003237.x
- Shumilina D., Korniyukhin D., Domblides E., Soldatenko A., Artemyeva A. Effects of genotype and culture conditions on microspore embryogenesis and plant regeneration in *Brassica rapa* ssp. *rapa* L. *Plants*. 2020;9(2):278. doi 10.3390/plants9020278
- Simmonds D.H., Keller W.A. Significance of preprophase bands of microtubules in the induction of microspore embryogenesis of *Brassica napus*. *Planta*. 1999;208:383-391. doi 10.1007/s004250050573
- Su H., Chen G., Yang L., Zhang Y., Wang Y., Fang Z., Lv H. Proteomic variations after short-term heat shock treatment reveal differentially expressed proteins involved in early microspore embryogenesis in cabbage (*Brassica oleracea*). *PeerJ*. 2020;8:e8897. doi 10.7717/peerj.8897
- Takahata Y., Keller W.A. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L. *Plant Sci*. 1991;74(2):235-242. doi 10.1016/0168-9452(91)90051-9
- Tang X., Liu Y., He Y., Ma L., Sun M. Exine dehiscing induces rape microspore polarity, which results in different daughter cell fate and fixes the apical-basal axis of the embryo. *J Exp Bot*. 2013;64(1):215-228. doi 10.1093/jxb/ers327
- Telmer C.A., Simmonds D.H., Newcomb W. Determination of developmental stage to obtain high frequencies of embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiol Plant*. 1992;84(3):417-424. doi 10.1111/j.1399-3054.1992.tb04685.x
- Tonguç M., Griffiths P.D. Genetic relationships of *Brassica* vegetables determined using database derived simple sequence repeats. *Euphytica*. 2004;137(2):193-201. doi 10.1023/B:EUPH.0000041577.84388.43
- Touraei A., Pfosser M., Vicente O., Heberle-Bors E. Stress as the major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores: towards a unified model of induction of microspore/pollen embryogenesis. *Planta*. 1996;200:144-152. doi 10.1007/BF00196662
- Tuncer B., Çğ A., Yanmaz R., Yaşar F. Effect of heat shock treatment on microspore embryogenesis in *Brassica oleracea* species. *J Agric Sci (Belihuloya)*. 2016;22(4):548-554. doi 10.1501/Tarimbil_0000001413
- Weber M., Davies J.J., Wittig D., Oakeley E.J., Haase M., Lam W.L., Schuebeler D. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet*. 2005;37(8):853-862. doi 10.1038/ng1598
- Winarto B., da Silva J.A.T. Microspore culture protocol for Indonesian *Brassica oleracea*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2011;107(2):305-315. doi 10.1007/S11240-011-9981-Z/TABLES/6
- Yahyaoui E., Germanà M.A. Microspore embryogenesis in *Citrus*. In: Segui-Simarro J.M. (Ed.) Doubled Haploid Technology. Methods in Molecular Biology. Vol. 2289. New York, NY: Humana, 2021;149-166. doi 10.1007/978-1-0716-1331-3_10
- Yang S., Liu X., Fu Y., Zhang X., Li Y., Liu Z., Feng H. The effect of culture shaking on microspore embryogenesis and embryonic development in Pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*). *Sci Hortic*. 2013;152:70-73. doi 10.1016/j.scienta.2013.01.019
- Yuan S., Su Y., Liu Y., Fang Z., Yang L., Zhuang M., Zhang Y., Sun P. Effects of pH, MES, arabinogalactan-proteins on microspore cultures in white cabbage. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 2012;110(1):69-76. doi 10.1007/s11240-012-0131-z
- Zeng A., Yan J., Song L., Gao B., Li J. Effects of ascorbic acid and embryogenic microspore selection on embryogenesis in white cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*). *J Hortic Sci Biotechnol*. 2015;90(6):607-612. doi 10.1080/14620316.2015.11668722
- Zhang F.L., Aoki S., Takahata Y. RAPD markers linked to microspore embryogenic ability in *Brassica* crops. *Euphytica*. 2003;131(2):207-213. doi 10.1023/A:1023955131523
- Żur I., Dubas E., Golemic E., Szechyńska-Hebda M., Gołębiowska G., Wędzony M. Stress-related variation in antioxidative enzymes activity and cell metabolism efficiency associated with embryogenesis induction in isolated microspore culture of triticale (*x Triticosecale* Wittm.). *Plant Cell Rep*. 2009;28(8):1279-1287. doi 10.1007/s00299-009-0730-2

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.11.2024. После доработки 27.02.2025. Принята к публикации 04.03.2025.

doi 10.18699/vjgb-25-56

Устойчивость к засухе фотосинтетического аппарата линий пшеницы *Triticum aestivum* L. с интрогрессиями от *Aegilops tauschii* Coss. в хромосоме 2D

С.В. Осипова ^{1, 2} , А.В. Пермяков ¹, А.В. Рудиковский ¹, Е.Г. Рудиковская ¹, Т.А. Пшеничникова ³

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

² Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

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

 svetlanaosipova2@mail.ru

Аннотация. Улучшение эффективности фотосинтеза в изменяющихся климатических условиях является одним из способов повышения стабильности урожая сельскохозяйственных растений. Для этого применяют различные генетические стратегии, в частности маркер-ориентированную селекцию, а также привлекают генетический потенциал диких сородичей пшеницы. Ранее, используя интрогрессивные линии пшеницы, содержащие различные сегменты хромосомы 2D от *Aegilops tauschii* в генетическом фоне пшеницы *Triticum aestivum* сорта Чайниз Спринг (ЧС), мы картировали QTL, ассоциированные с вариабельностью биомассы побега и газообмена в контрастных условиях водоснабжения. В данной работе путем «дробления» первичных интрогрессий мы получили вторичные интрогрессивные линии пшеницы ЧС с более короткими сегментами интрогрессий от *Ae. tauschii*. Целью исследования было изучить устойчивость фотосинтетического аппарата к дефициту воды в почве у вторичных интрогрессивных линий, содержащих редуцированные интрогрессии от *Ae. tauschii* в коротком и длинном плечах хромосомы 2D. Мы оценили размер эффекта засухи на биомассу побега, параметры газообмена, содержание фотосинтетических пигментов, параметры медленной и быстрой флуоресценции хлорофилла и параметры быстрых световых кривых. Результаты показали, что у линии 1004 с участком интрогрессии в хромосоме 2DS, ограниченном микросателлитными локусами *Xgwm296* и *Xgwm261*, засуха незначительно влияла на соотношение хлорофиллы *a+b*/каротиноиды и первичные процессы фотосинтеза. У линии 1005 с участком интрогрессии в районе маркера *Xgwm261* при дефиците воды значительно снижались соотношение хлорофиллы *a+b*/каротиноиды и показатели функциональной активности фотосистем. У линии 1034 с интрогрессией в хромосоме 2DL в районе локусов *Xgwm1419* и *Xgwm157* соотношение хлорофиллы *a+b*/каротиноиды, скорость ассимиляции CO₂ и параметры флуоресценции хлорофилла при засухе оставались стабильными. У линии 1021 с участком интрогрессии в районе маркера *Xgwm539* на этой же хромосоме мы наблюдали сильное негативное влияние засухи на скорость ассимиляции CO₂ и показатели функциональной активности фотосистем. Маркеры *Xgwm1419* и *Xgwm296* можно рекомендовать для использования в маркер-ориентированной селекции на засухоустойчивость мягкой пшеницы в случаях, когда донором генетического материала выступает *Ae. tauschii*.

Ключевые слова: мягкая пшеница; почвенная засуха; биомасса побега; газообмен; флуоресценция хлорофилла; интрогрессии; молекулярные маркеры

Для цитирования: Осипова С.В., Пермяков А.В., Рудиковский А.В., Рудиковская Е.Г., Пшеничникова Т.А. Устойчивость к засухе фотосинтетического аппарата линий пшеницы *Triticum aestivum* L. с интрогрессиями от *Aegilops tauschii* Coss. в хромосоме 2D. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2025;29(4):530-538. doi 10.18699/vjgb-25-56

Финансирование. Работа выполнена в рамках базового проекта Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН № 0277-2022-0006 и базового проекта Института цитологии и генетики СО РАН № FWNR-2022-0017.

Благодарности. Исследования проведены на оборудовании центра «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН, г. Иркутск, Россия. Мы благодарны М.Д. Пермяковой за техническую помощь и Е.В. Морозовой за молекулярный анализ растений.

Drought tolerance of the photosynthetic apparatus of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) lines with introgressions in chromosome 2D from *Aegilops tauschii* Coss.

S.V. Osipova ^{1, 2} , A.V. Permyakov ¹, A.V. Rudikovskii ¹, E.G. Rudikovskaya ¹, T.A. Pshenichnikova ³

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

² Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

³ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

 svetlanaosipova2@mail.ru

Abstract. One of the ways to increase yield stability of bread wheat under changing climatic conditions is through improving the photosynthesis efficiency. For this purpose, various genetic strategies are used. They include marker-assisted selection and the use of the genetic potential of wild wheat relatives. Previously, using introgression wheat lines carrying different segments of chromosome 2D from *Aegilops tauschii* in the genetic background of the wheat (*Triticum aestivum*) variety Chinese Spring (CS), we mapped QTLs associated with variability in shoot biomass and gas exchange under contrasting water supply conditions. In this work, by “splitting” the primary introgressions, we obtained secondary introgression CS lines with reduced segments of *Ae. tauschii* introgressions in the short and long arms of chromosomes 2D. The aim of this study was to investigate the tolerance of the photosynthetic apparatus to soil water deficit in these lines. We estimated the size of drought effect on shoot biomass, gas exchange parameters, photosynthetic pigment content, slow and fast chlorophyll fluorescence parameters, and fast light curve parameters. The results showed that line 1004 with an introgression in chromosome 2DS limited by microsatellite loci *Xgwm296* and *Xgwm261* was little affected by drought in respect of the chlorophyll (*a+b*)/carotenoid ratio and primary photosynthetic processes. In line 1005 with a single introgression in the region of the *Xgwm261* marker, the chlorophyll (*a+b*)/carotenoid ratio and indicators of the functional activity of photosystems significantly decreased under water deficiency. The chlorophyll (*a+b*)/carotenoid ratio, CO₂ assimilation rate, and chlorophyll fluorescence parameters remained stable in line 1034 with an introgression in chromosome 2DL near the *Xgwm1419* and *Xgwm157* loci. In line 1021 with an introgression in the region of the *Xgwm539* marker on the same chromosome, we observed a strong negative effect of drought on the rate of CO₂ assimilation and indicators of the functional activity of photosystems. The *Xgwm1419* and *Xgwm296* markers can be recommended for use in marker-assisted breeding for drought tolerance of bread wheat in the cases where *Ae. tauschii* acts as a donor of genetic material.

Key words: bread wheat; soil drought; shoot biomass; gas exchange; chlorophyll fluorescence; introgressions; molecular markers

For citation: Osipova S.V., Permyakov A.V., Rudikovskii A.V., Rudikovskaya E.G., Pshenichnikova T.A. Drought tolerance of the photosynthetic apparatus of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) lines with introgressions in chromosome 2D from *Aegilops tauschii* Coss. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(4):530-538. doi 10.18699/vjgb-25-56

Введение

Улучшение эффективности фотосинтеза – одно из важнейших направлений селекционной работы по повышению продуктивности и устойчивости мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. к неблагоприятным факторам. Для достижения этой цели эффективны различные генетические стратегии, в том числе привлечение генетического потенциала диких сородичей пшеницы и маркер-ориентированная селекция (Reynolds et al., 2012).

Мягкая пшеница имеет ограниченное генетическое разнообразие. Ценный генофонд для ее улучшения при решении задач современной селекции представляют дикие сородичи мягкой пшеницы. Различные виды рода *Aegilops* L., наиболее близкого к роду *Triticum* L., считаются источником полезных аллелей для повышения устойчивости мягкой пшеницы к абиотическим стрессам, вредителям и болезням (Przewieslik-Allen et al., 2019; Pour-Aboughadareh et al., 2021). Одним из таких видов является *Ae. tauschii*, известный как донор генома D в мягкую пшеницу и содержащий благоприятные аллельные вариации генов, связанных с реакциями на стресс (Jia et al., 2013). Его гомология с субгеномом D мягкой пшеницы упрощает процесс интрогрессии с целью селекционного и генетического анализа. Поэтому *Ae. tauschii* активно вовлекают в исследования, направленные на повышение продуктивности и стабильности пшениц в разнообразных климатических условиях (Nyine et al., 2021; Ma et al., 2023).

Промежуточным звеном в передаче генетического разнообразия из этого генома являются синтетические пшеницы-гексаплоиды с геномом ВВАADD, гомологичным мягкой пшенице. Первый такой синтетик под названием Synthetic 6x (Син6х) (McFadden, Sears, 1946) был использован для получения однохромосомных замещенных линий Чайниз Спринг (ЧС)(Син6х) (Nicholson et al., 1993).

Впоследствии на основе замещенных линий по хромосомам субгенома D были созданы интрогрессивные линии – носители сегментов хромосом от *Ae. tauschii* разных размеров (Pestsova et al., 2001). С помощью этого набора из восьмидесяти интрогрессивных линий ЧС(Син6х) мы картировали локусы количественных признаков (major QTL), ассоциированные с вариабельностью биомассы побега (БП) и параметров газообмена при дефиците воды в почве, в двух регионах хромосомы 2D пшеницы сорта ЧС (Osipova et al., 2016). Один из регионов был расположен на коротком плече между микросателлитными маркерами *Xgdm5* и *Xgwm296*, а второй фланкирован маркерами *Xgwm539* и *Xgwm1419* на длинном плече. Размеры первого района составляли 11.4 сМ, второго – 10.5 сМ (Röder et al., 1998).

Дальнейшее уточнение положения на хромосоме 2D локусов, ассоциированных с вариабельностью фотосинтеза, и поиск предполагаемых генов-кандидатов стали возможны путем получения линий, имеющих более короткие сегменты интрогрессий от *Ae. tauschii* в ранее выявленных районах этой хромосомы, и изучения стабильности функционирования фотосинтетического аппарата в новых генотипах. Надежным источником информации о физиологическом состоянии фотосинтетического аппарата растений считаются параметры флуоресценции хлорофилла (Хл) (Goltsev et al., 2016). Они успешно использовались при скрининге на засухоустойчивость взрослых растений мягкой пшеницы в полевых условиях и у проростков пшеницы в лабораторных условиях (Botyanszka et al., 2020; Peršić et al., 2022).

Целью нашего исследования было изучение устойчивости фотосинтетического аппарата к дефициту воды в почве у интрогрессивных линий, содержащих короткие интрогрессии от *Ae. tauschii*.

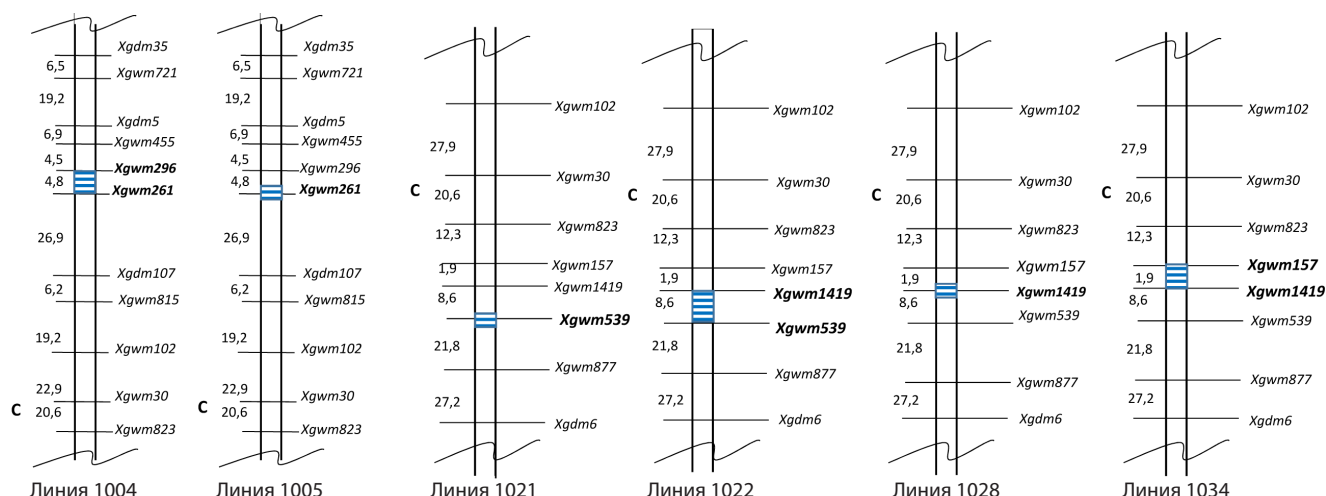


Рис. 1. Схематическое расположение участков интрогрессий в хромосоме 2D у вторичных интрогрессивных линий ЧС(Син6х 2D-4) (линии 1004 и 1005) и ЧС(Син6х 2D-6) (линии 1021, 1022, 1028 и 1034).

Полужирным шрифтом выделены микросателлитные маркеры хромосомы 2D, представленные аллельными вариантами от Син6х и маркирующие ранее выявленные районы локализации кластеров QTL, связанных с реакцией на засуху (Osipova et al., 2016). Последовательность расположения маркеров и расстояния между ними (без учета масштаба) представлены по картам из работ (Röder et al., 1998; Pestsova et al., 2001).

Материалы и методы

Генетический материал, молекулярный анализ и условия эксперимента. В работе использовали мягкую пшеницу сорта Чайниз Спринг и две группы вторичных интрогрессивных линий (ВИЛ), созданных на основе интрогрессивных замещенных линий ЧС(Син6х 2D-4) и ЧС(Син6х 2D-6) (Pestsova et al., 2001). Для сужения участков интрогрессий в этих линиях был использован подход «дробления», состоящий в гибридизации двух первичных интрогрессивных линий (ИЛ) с сортом-реципиентом Чайниз Спринг. Вторичные ИЛ были получены путем однократного беккроссирования на сорт-реципиент с последующим самоопылением в F_2 . Далее растения анализировали по составу микросателлитных маркеров. Отбирали те растения, которые демонстрировали аллельные различия на участках хромосомы 2D, где ранее были обнаружены кластеры локусов QTL, ассоциированных с реакцией на засуху (Osipova et al., 2016).

Выделение ДНК проводили согласно протоколу (Plaschke et al., 1995). Полученные продукты ПЦР разделяли в 3 % агарозном геле и фотографировали в УФ-свете с использованием системы Molecular Imager® Gel DocTM XR+ (Bio-Rad Laboratories, Inc., Калифорния, США). Две линии под номерами 1004 и 1005 были отобраны среди растений F_2 от скрещивания ЧС с ИЛ ЧС(Син6х 2D-4) (рис. 1). Эти линии отличались только по аллельному состоянию маркера *Xgwm296*. Аллельные варианты данного маркера, полученные с помощью ПЦР-реакции, представлены на рис. S1 Приложения¹.

Четыре линии под номерами 1021, 1022, 1028 и 1034 были отобраны среди растений F_2 от скрещивания ЧС с ИЛ ЧС(Син6х 2D-6). Они различаются аллельным состоянием маркеров *Xgwm1419*, *Xgwm157* и *Xgwm539* (рис. S2). Растения росли в контролируемых условиях климатической камеры CLF PlantMaster (CLF Plant Climatic GMBH,

Германия), установленной на фитотроне СИФИБР СО РАН, с 16-часовым фотопериодом, температурой 23 °C днем и 16 °C ночью, влажностью воздуха 60 % и интенсивностью света 300 мкмоль·м⁻²·с⁻¹. По десять зерен каждого генотипа высевали в два сосуда Митчерлиха, наполненные смесью перегноя, песка и торфа (1:1:1). Содержание влаги в почве в одном сосуде поддерживалось на оптимальном уровне (60 % от полной влагоемкости почвы). Во втором сосуде начиная со стадии третьего листа полив снижали в два раза, до 30 % от полной влагоемкости почвы. Водный режим поддерживали гравиметрическим методом. На стадии цветения у растений измеряли параметры газообмена и флуоресценции хлорофилла, а также массу главного побега и отбирали навески для определения содержания фотосинтетических пигментов.

Газообмен, флуоресценция хлорофилла и содержание фотосинтетических пигментов. Скорость нетто-фотосинтеза (A), устьичную проводимость (Gs) и скорость транспирации (E) измеряли с помощью портативной системы изучения газообмена листьев GFS-3000 (Heinz Walz, Германия). Были установлены следующие значения: интенсивность света 800 мкмоль·м⁻²·с⁻¹, концентрация CO₂ 400 мкмоль·моль⁻¹, относительная влажность 60 %, температура 26 °C, скорость воздушного потока 750 мкмоль/с. Эффективность использования воды (ЭИВ) рассчитывали как A/E. Средние значения и стандартные отклонения для параметров газообмена приведены в табл. S1.

С помощью флуориметра PAM 2500 (Heinz Walz, Германия), интегрированного с программным обеспечением PamWin 3.50, измеряли: кинетику индукции медленной флуоресценции Хл; параметры быстрых световых кривых; кинетику индукции быстрой флуоресценции Хл (ОЖР тест). Для регистрации минимального выхода флуоресценции Хл в адаптированном к темноте состоянии (F₀) листья затемняли на 30 мин, а затем освещали модулированным измерительным светом низкой частоты

¹ Рис. S1–S3 и табл. S1, S2 Приложения см. по адресу: <https://vavilov-jcg.ru/download/pict-2025-29/appx18.xlsx>

(5 Гц) и низкой интенсивности (630 нм). Интенсивность флуоресценции Хл в условиях закрытых реакционных центров (F_m) измеряли после воздействия импульса света высокой интенсивности: $25\,000\text{ мкмоль фотонов}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$, длина волны 630 нм, 0.1 с. Для поддержания фотосинтеза и достижения устойчивого состояния (F) использовали красный актиничный свет ($677\text{ мкмоль фотонов}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$). На основании измеренных значений параметров флуоресценции хлорофилла программа PamWin 3.50 рассчитывала другие параметры. Мы оценивали реакцию на быстрое увеличение освещенности (каждые 30 с), подвергая листья воздействию света интенсивностью от 0 до $1935\text{ мкмоль}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ фотонов ФАР, и учитывали начальный наклон кривой быстрого светового отклика (α), максимальную скорость переноса электронов (ETR_{max}) и минимальное насыщающее излучение (I_k). Флуоресценцию Хл, индуцированную сильным световым импульсом, оцифровывали в диапазоне от 0.1 до 300 мс в режиме прибора «Просмотр» на вкладке «Быстрая кинетика» (Chen K. et al., 2013; Srivastava et al., 2021). Все параметры флуоресценции Хл, измеренные и рассчитанные в ходе исследования, а также размер эффекта засухи на каждый параметр, приведены и описаны в табл. S2.

Определение содержания фотосинтетических пигментов. Получение и измерение оптической плотности экстрактов, содержащих фотосинтетические пигменты, проводили по описанной ранее методике (Osipova et al., 2024). Для расчетов содержания хлорофилла *a* (Хл *a*), хлорофилла *b* (Хл *b*) и каротиноидов (Кар) в листьях пользовались формулами, приведенными в работе (Wettstein, 1957).

Поиск координат маркеров на хромосоме 2D и генов-кандидатов, которые могут участвовать в формировании засухоустойчивости пшеницы. Для поиска координат маркеров *Xgwm261* и *Xgwm157* использовали доступные на информационном ресурсе GrainGenes (<https://wheat.pw.usda.gov/GG3>) последовательности праймеров. Для маркера *Xgwm1419* последовательности праймеров были предоставлены М. Ганалом (TraitGenetics GmbH). С помощью программы BLASTN для них определяли координаты в геномной сборке пшеницы Chinese Spring IWGSC RefSeq v2. Координаты маркеров *Xgwm296* и *Xgwm539* указаны в этой сборке (<https://wheat.pw.usda.gov>, послед-

нее обращение 05.02.2025). В регионах, ограниченных данными маркерами, проводили поиск наиболее вероятных кандидатных генов. Рассматривали кандидатные гены, аннотированные Международным консорциумом по секвенированию генома пшеницы (IWGSC, 2018) с высокой степенью надежности.

Статистика. За биологическую повторность принимали отдельное растение. На стадии цветения у шести растений каждого генотипа на каждом водном режиме измеряли параметры газообмена и у трех растений каждого генотипа – параметры флуоресценции Хл, после чего у девяти растений каждого генотипа надземную часть главного побега срезали и взвешивали. По три навески, отобранные с флаговых листьев трех растений, замораживали жидким азотом и хранили при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ для дальнейшего определения содержания пигментов (в мг/г сырой массы листа). Результаты представлены как средние значения $\pm$ стандартные отклонения. Влияние дефицита воды в почве на флуоресценцию хлорофилла, содержание пигментов и биомассу побега оценивали с помощью показателя «размер эффекта засухи» (РЭЗ) (Hedges, Olkin, 1985). Формулы расчета РЭЗ приведены в работе (Osipova et al., 2024). Чем выше величина эффекта, тем больше увеличение показателя в условиях засухи по сравнению с контролем. Отрицательные значения свидетельствуют об уменьшении показателя по сравнению с контролем.

Все расчеты, включая средние значения, объединенное стандартное отклонение, скорректированное значение РЭЗ и построение диаграмм, выполнялись в Microsoft Excel, версия 14.0.7268.5000 (Microsoft Corporation, 2010). Значимость различий оценивали с помощью коэффициента Стьюдента. Пул флуоресцентных данных был обработан методом неметрического многомерного шкалирования в программе Past, версия 3.01 (Hammer et al., 2001).

Результаты

Биомасса побега и содержание фотосинтетических пигментов в листьях

Биомасса главного побега у линий варьировала от 2.6 до 3.5 г в контроле и от 1.5 до 2.0 г в условиях почвенной засухи (табл. 1). В условиях нормального полива только одна линия, 1005, превышала сорт-реципиент по этому

Таблица 1. Биомасса побега (г) в фазе цветения у сорта Чайниз Спринг и изученных линий пшеницы в контроле и при водном дефиците, размер эффекта засухи на биомассу побега

Генотип	Номер линии	Контроль	Засуха	Размер эффекта засухи
Чайниз Спринг		3.0 ± 0.3	$1.7 \pm 0.1^{***}$	-4.74
Вторичные интрогрессивные линии				
ЧС(Син6х 2D-4)	1004	2.8 ± 0.7	$1.6 \pm 0.4^{***}$	-1.96
	1005	3.5 ± 0.3^{aa}	$1.6 \pm 0.3^{***}$	-7.06
ЧС(Син6х 2D-6)	1021	2.6 ± 0.6	$1.5 \pm 0.1^{***}$	-1.69
	1022	2.9 ± 0.5	$1.5 \pm 0.1^{***}$	-3.82
	1028	2.7 ± 0.3	$2.0 \pm 0.2^{a**}$	-2.85
	1034	2.9 ± 0.5	$1.9 \pm 0.1^{a***}$	-3.04

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ – значимость различий между БП каждого генотипа в контроле и на засухе; $a\ p < 0.05$, $aa\ p < 0.01$ – значимость различий между БП у ЧС и линий.

Таблица 2. Содержание фотосинтетических пигментов (мг/г сырой массы) в листьях сорта Чайниз Спринг и изученных линий пшеницы (*n* = 9) в контроле и при водном дефиците, размер эффекта засухи на содержание пигментов

Показатель	Чайниз Спринг	1004	1005	1021	1022	1028	1034
Контроль							
Хлорофилл <i>a</i>	2.4 ± 0.2	2.9 ± 0.1	2.9 ± 0.1	2.7 ± 0.2	2.6 ± 0.1	–	2.3 ± 0.1
Хлорофилл <i>b</i>	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.0	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	–	1.1 ± 0.1
Каротиноиды	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.0	–	0.4 ± 0.1
Хлорофиллы <i>a+b</i> /Каротиноиды	5.6 ± 0.3	11.6 ± 4.4	7.8 ± 0.3 ^a	6.9 ± 0.2 ^a	5.8 ± 0.3	–	10.6 ± 3.7
Засуха							
Хлорофилл <i>a</i>	2.2 ± 0.1	3.4 ± 0.2 ^{**a}	2.9 ± 0.1	3.1 ± 0.1 ^a	2.9 ± 0.2	3.1 ± 0.2 ^a	2.8 ± 0.2 [*]
Хлорофилл <i>b</i>	1.0 ± 0.0	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.0 ^a	1.4 ± 0.1 ^a	1.0 ± 0.1	1.4 ± 0.1 ^a	1.2 ± 0.1
Каротиноиды	0.6 ± 0.0 [*]	0.7 ± 0.0 ^a	0.6 ± 0.0 [*]	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.6 ± 0.0 ^{**}
Хлорофиллы <i>a+b</i> /Каротиноиды	5.7 ± 0.1	6.9 ± 0.1 ^a	6.6 ± 0.2 ^{**}	7.1 ± 0.7 ^a	5.8 ± 0.4	6.3 ± 0.5	7.2 ± 0.1 ^a
Размер эффекта засухи							
Хлорофилл <i>a</i>	–1.2	3.2	0	2.2	2.2	–	3.0
Хлорофилл <i>b</i>	–1.3	1.2	2.1	1.8	–2.0	–	1.2
Каротиноиды	–3.3	1.7	3.8	1.4	–0.5	–	5.3
Хлорофиллы <i>a+b</i> /Каротиноиды	0.3	–0.1	–4.4	0.4	0.0	–	–0.1

* *p* < 0.05, ** *p* < 0.01 – значимость различий между содержанием пигментов в листьях каждого генотипа на засухе и в контроле; ^a *p* < 0.05 – значимость различий между содержанием пигментов в листьях пшеницы сорта ЧС и линий.

признаку, а самое низкое значение БП было у линии 1021. В условиях дефицита воды биомасса побега у двух линий, 1028 и 1034, превышала значения этого признака у ЧС, тогда как у линий 1021 и 1022, напротив, не достигала значений БП у ЧС. Размер эффекта засухи был отрицательным у всех изученных генотипов, однако величина этого показателя варьировала от –1.69 у линии 1021 до –7.06 у линии 1005. Линия 1021 выделялась сниженными значениями БП как при оптимальных условиях полива, так и в условиях засухи. У линии 1005 высокая биомасса побега в контроле существенно снижалась при засухе. Линия 1004 была стабильнее линии 1005 по этому признаку.

В условиях засухи содержание Хл *a*, Хл *b* и Кар у ЧС снижалось, а влияние засухи на отношение Хл *a+b*/Кар было близким к нулю (табл. 2). Количество пигментов в листьях линий изменялось по-разному. У линий 1004 и 1034 содержание Хл *a* на засухе значимо повышалось. У всех линий, за исключением 1022, повышался также уровень Кар. Наибольшее положительное влияние засухи на Кар в листьях наблюдалось (в порядке увеличения) у линий 1004, 1005 и 1034. Отношение Хл *a+b*/Кар незначительно изменялось у всех генотипов, за исключением линии 1005. Негативное влияние засухи на этот признак у линии 1005 было обусловлено тем, что содержание Хл *a* оставалось стабильным в разных условиях, а количество Кар увеличивалось.

Газообмен и флуоресценция хлорофилла

На рис. 2 показаны значения РЭЗ на параметры газообмена для сорта ЧС и шести вторичных интрогрессивных линий. Из всех изученных генотипов наиболее стабильным по параметрам газообмена был реципиент ЧС, у которого, тем не менее, значимо снижалась при засухе скорость нетто-фотосинтеза. Линии с интрогрессиями в коротком

плече хромосомы 2D показали сходные изменения параметров газообмена. У них значимо снижались *E* и *G*_s, в меньшей степени скорость нетто-фотосинтеза, в результате чего ЭИВ на засухе повышалась. Линии с интрогрессиями в длинном плече хромосомы 2D отличались разнообразными изменениями параметров газообмена. У линии 1021 все параметры газообмена, как и ЭИВ, были существенно снижены. Линии 1022 и 1028 демонстрировали нетипичные устьичные эффекты, повышенные значения *E*, *G*_s и скорости нетто-фотосинтеза в условиях засухи. Линия 1034 показала классическую адаптивную реакцию на дефицит воды. У нее снижались *E* и *G*_s, при этом скорость нетто-фотосинтеза была стабильной, в результате ЭИВ на засухе существенно повышалась.

Чтобы выявить влияние интрогрессий на изменения параметров флуоресценции Хл в условиях дефицита воды, мы применили многомерное неметрическое шкалирование показателей РЭЗ на 39 параметров флуоресценции Хл (рис. S3). Три линии (1004, 1022 и 1028) образовали вместе с ЧС плотный кластер, что свидетельствует о незначительных различиях в РЭЗ на флуоресценцию Хл у этих генотипов. Это предполагает незначительное влияние имеющихся интрогрессий на структурные и функциональные характеристики фотосинтетического аппарата под влиянием засухи. Три другие линии (1005, 1021 и 1034) располагались на значительном расстоянии от ЧС, что указывало на существенные отличия в реакциях фотосинтетического аппарата этих линий от генотипов, включенных в кластер.

Далее мы сравнили размер эффекта засухи на параметры флуоресценции Хл у сорта-реципиента ЧС и линий 1004 и 1005 с интрогрессиями в коротком плече хромосомы 2D (рис. 3, *a*) и линий 1021 и 1034 с интрогрессиями в длинном плече той же хромосомы (см. рис. 3, *б*). У сорта

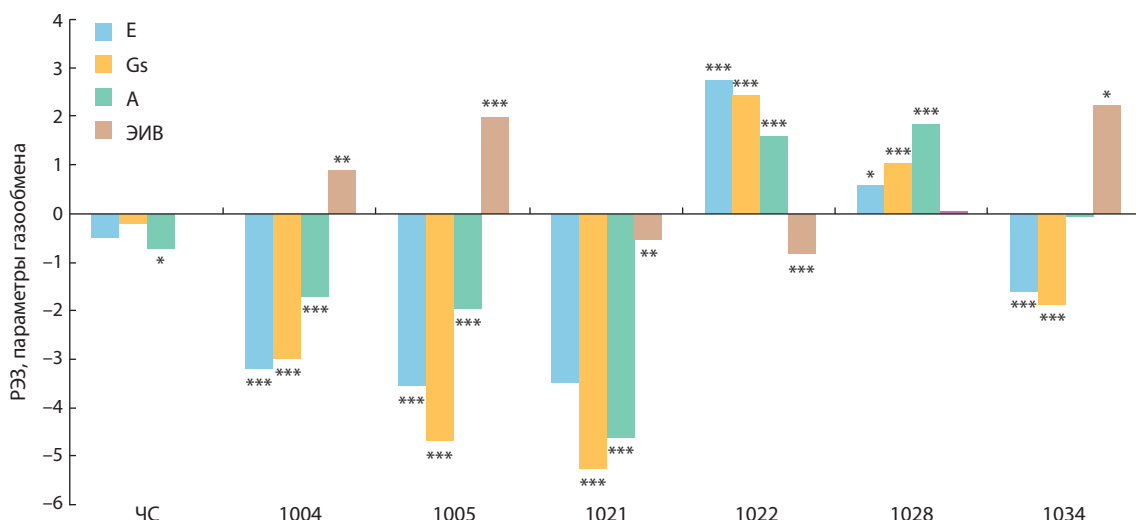


Рис. 2. Влияние засухи (РЗЗ) на скорость транспирации (Е), устьичную проводимость (Gs), скорость фотосинтеза (А) и эффективность использования воды (ЭИВ) у пшеницы ЧС и вторичных рекомбинантных интрогрессивных линий.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ – значимость различий между средними значениями признаков в контроле и в опыте.

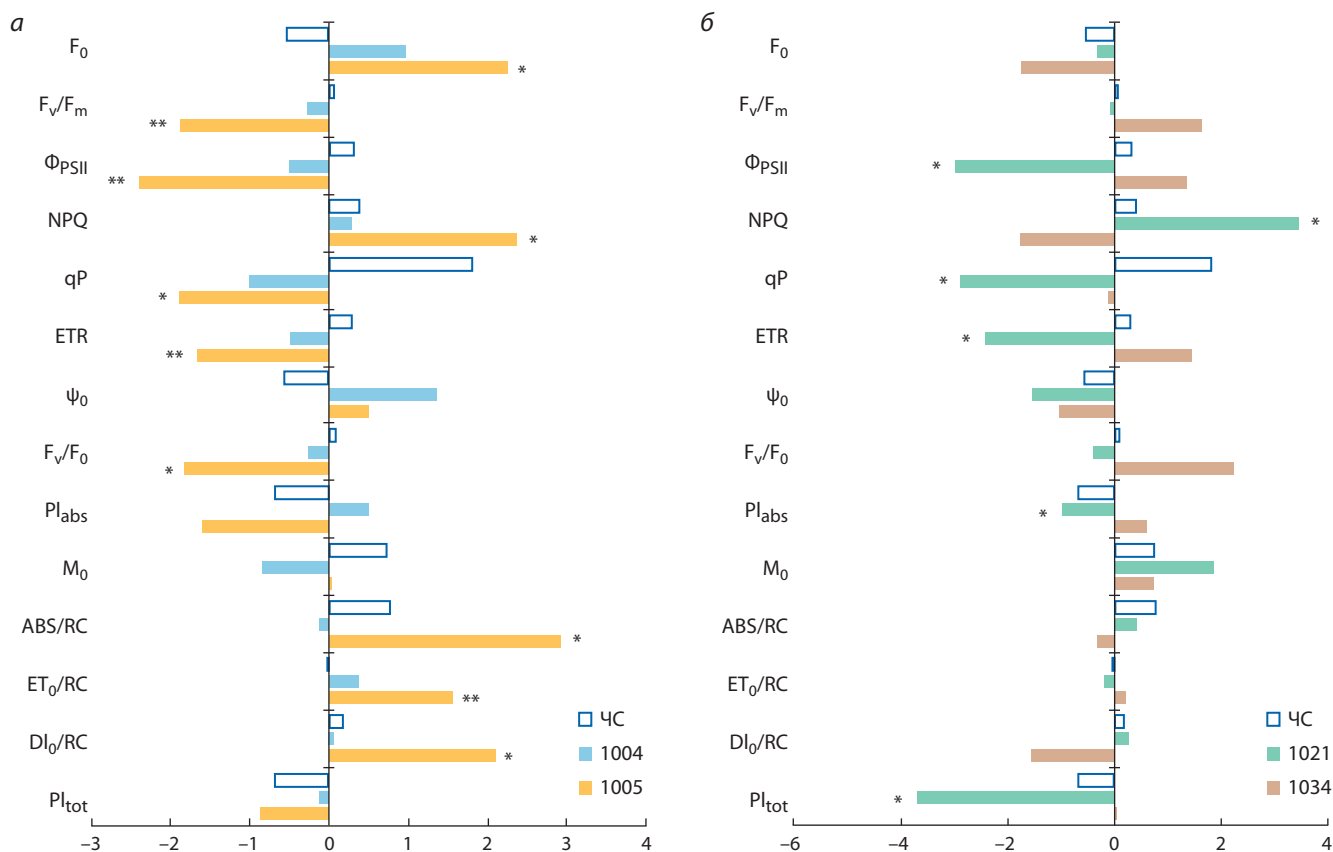


Рис. 3. Влияние засухи на параметры флуоресценции Хл у сорта-реципиента Чайниз Спринг (ЧС) и вторичных интрогрессивных линий 1004 и 1005 (а), 1021 и 1034 (б).

Параметры флуоресценции Хл приведены по (Goltsev et al., 2016): F_0 – минимальная флуоресценция адаптированных к темноте листьев; F_v/F_m – максимальная фотохимическая активность фотосистемы II (ФСII); Φ_{PSII} – эффективный квантовый выход ФСII; NPQ – нефотохимическое тушение флуоресценции; qP – фотохимическое тушение флуоресценции; ETR – скорость линейного транспорта электронов через фотосистемы; Ψ_0 – эффективность, с которой экситон, захваченный реакционным центром, перемещает электрон по цепочке после QA; F_v/F_0 – соотношение констант скоростей первичной фотохимической реакции и общей скорости нефотохимических потерь; Pl_{abs} – показатель функциональной активности ФСII, отнесенный к поглощаемой энергии; M_0 – параметр отражает скорость закрывания реакционных центров ФСII; ABS/RC – поток энергии, поглощаемой одним реакционным центром (РЦ); ET_0/RC – поток электронов, проходящих через один РЦ; DI_0/RC – общее количество энергии, рассеиваемой одним РЦ; Pl_{tot} – показатель функциональной активности ФСII, ФСI и цепи переноса электронов между ними.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ – значимость различий между средними значениями признаков в контроле и в опыте.

ЧС параметры флуоресценции Хл в разных условиях полива были относительно стабильными. Это же верно для линии 1004. У линии 1005, напротив, наблюдались большие различия между флуоресценцией Хл в контроле и на засухе, свидетельствующие о стрессовом состоянии фотосинтетического аппарата при дефиците воды. Такой вывод следует из статистически значимого повышения на засухе F_0 и NPQ, снижения F_v/F_m , Φ_{PSII} , F_v/F_0 и ETR, а также индексов производительности PI_{abs} и PI_{tot} . Линии 1021 и 1034 с интрогрессиями от *Ae. tauschii* в длинном плече хромосомы 2D значительно различались реакциями на засуху параметров флуоресценции Хл (см. рис. 3, б). Фотосинтетический аппарат линии 1034 хорошо адаптировался к дефициту воды, на что указывала незначительная разница между средними значениями параметров в контроле и на засухе и нулевое значение РЭЗ на PI_{tot} . У линии 1021 на засухе существенно снижались Φ_{PSII} , qP, ETR и оба индекса производительности (PI_{abs} и PI_{tot}), что говорит о стрессовом состоянии фотосинтетического аппарата при дефиците воды.

Обсуждение

Влияние интрогрессий от *Ae. tauschii* в коротком плече хромосомы 2D на устойчивость фотосинтеза и биомассы побега. Линия 1004 имела участок интрогрессии в сегменте хромосомы 2DS, фланкированном маркерами *Xgwm296* и *Xgwm261*, который ограничен координатами 2D:18085000–19623173 п. н. Линия 1005 имела интрогрессию на участке, прилегающем к маркеру *Xgwm261*. Линии значительно различались по размеру эффекта засухи на содержание хлорофиллов и каротиноидов. Изменения содержания фотосинтетических пигментов и отношения Хл *a+b*/Кар у линии 1004 были более благоприятны для адаптации к засухе, чем у 1005. У обеих линий увеличивался на засухе размер светособирающей антенны ФСII, однако у линии 1005 эта адаптация не приводила к эффективному использованию энергии. Поток энергии, поглощаемый на засухе одним реакционным центром ФСII (ABS/RC), у этой линии увеличивался по сравнению с сортом-реципиентом, вместе с тем возрастало рассеивание энергии (параметр DI_0/RC). У линии 1005 на засухе существенно повышался параметр F_0 , что указывало на нарушения в передаче энергии возбуждения в антенне и от антенны к реакционному центру ФСII (Goltsev et al., 2016). Подобный эффект мы наблюдали ранее на другом генетическом материале, у линий пшеницы Саратовская 29 с модификациями в дистальном участке короткого плеча хромосомы 2A (Osipova et al., 2023), что говорит о вовлеченности этого сегмента хромосом второй гомеологической группы в контроль первичных процессов фотосинтеза.

Единственным различием между линиями 1004 и 1005 была интрогрессия от *Ae. tauschii* в район маркера *Xgwm296*, выявленная у линии 1004 (см. рис. 1). Ассоциированные с этим маркером гены, скорее всего, определяли наблюдаемые нами различия в засухоустойчивости двух линий. Наиболее вероятным геном-кандидатом для объяснения различий между линиями может быть ген *TraesCS2D03G0092600*, кодирующий специфический для растений фактор транскрипции (ТФ) TCP. Координа-

ты этого гена 2D:18667052–18667318 п. н. (<https://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/GG3>). ТФ семейства TCP регулируют деление клеток и влияют на рост меристемы (Cubas et al., 1999), а также участвуют в регуляции ответных реакций на внешние сигналы (Danisman, 2016). Ген *TraesCS2D03G0092600*, видимо, участвовал в формировании характерной для линии 1005 высокой биомассы побега при оптимальном поливе – преимущества, которое линия теряла на засухе. С этим же геном, предположительно, связаны особенности в накоплении Хл *a* у линий 1004 и 1005 при дефиците воды, так как было показано, что ТФ TCP регулируют биосинтез хлорофилла у арабидопсиса (Zheng et al., 2022). В целом физиологические различия между линиями сводились к тому, что у линии 1005 наблюдался дисбаланс между процессами роста и адаптации к дефициту воды, тогда как линия 1004 характеризовалась относительной устойчивостью.

Влияние интрогрессий от *Ae. tauschii* в длинном плече хромосомы 2D на устойчивость фотосинтеза. Мы изучили четыре линии с интрогрессиями в участке длинного плеча хромосомы 2D, ограниченными маркерами *Xgwm157*, *Xgwm1419* и *Xgwm539*. Наиболее контрастными по устойчивости были линия 1034 с интрогрессией в районе маркеров *Xgwm1419* и *Xgwm157* и линия 1021 с интрогрессией в районе маркера *Xgwm539*. Линия 1034 отличалась стабильностью нетто-фотосинтеза и показателей флуоресценции хлорофилла, а также относительной устойчивостью биомассы побега. У линии 1021, напротив, устойчивость показателей фотосинтеза и биомасса побега были снижены по сравнению с ЧС. Район локализации маркера *Xgwm539* с координатами 2D:515210161–515210309 п. н. имеет очень высокую плотность генов. Мы полагаем, что наиболее вероятным геном-кандидатом для объяснения негативного эффекта интрогрессии у линии 1021 является ген под номером *TraesCS2D03G008700*, который имеет координаты 2D:515214093–515217180 п. н. (<https://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/GG3>). Один из двух транскриптов этого гена аннотирован как соответствующий гомеодомен-подобному Myb-содержащему белку. Его последовательность сходна с последовательностью белков специфического для растений семейства факторов транскрипции GARP (Hosoda et al., 2002). Члены этого семейства, среди которых белки Golden2-like, играют важную физиологическую роль на протяжении всего жизненного цикла растений (Ohama, Yanagisawa, 2024), в том числе регулируют развитие хлоропластов и определяют количественные характеристики фотосинтеза (Chen M. et al., 2016). Наши результаты предполагают активное участие этого гена в адаптации пшеницы ЧС к почвенной засухе, поскольку генетическая модификация сегмента хромосомы в районе его локализации привела к существенному снижению устойчивости фотосинтеза и биомассы побега у линии 1021. Факторы транскрипции Golden2-like в последнее время рассматриваются как идеальные кандидаты для улучшения фотосинтеза в сельскохозяйственных культурах (Hernández-Verdeja, Lundgren, 2024). Наши данные поддерживают идею о том, что гены *GLK* могут быть перспективным биотехнологическим инструментом для улучшения засухоустойчивости мягкой пшеницы при условии правильного подбора донорного генотипа.

Три линии (1022, 1028 и 1034) имели в хромосоме 2D сегменты от *Ae. tauschii* в районе маркера *Xgwm1419*. Дополнительно линия 1034 несла интрогрессию в районе маркера *Xgwm157* (см. рис. 1). По данным GrainGenes, в районе маркера *Xgwm157* на хромосоме 2D не локализованы гены, функционально значимые для устойчивости к засухе. Возможно, поэтому линии 1028 и 1034 были похожи по устойчивости биомассы побега. Вместе с тем линии 1022 и 1028 отличались от линий 1034 и 1021 по реакции устьичного аппарата на дефицит воды. Мы предполагаем, что данный феномен связан с геном под номером *TraesCS2D03G0081400* (2D:494675291–494678461 п. н.), локализованным относительно близко к маркеру *Xgwm1419*. Этот ген кодирует белок – член семейства факторов транскрипции GTL1. Известно, что GTL1 участвуют в регуляции плотности устьиц, транспирации, устьичной проводимости и, как следствие, влияют на эффективность использования воды (Yoo et al., 2011). С помощью RT-PCR была показана его значительная экспрессия во многих органах растения пшеницы на стадии цветения, а также немедленный, в пределах 3 ч, ответ на осмотический стресс (Zheng et al., 2016). Повышение транспирации и устьичной проводимости у линий 1022 и 1028 и снижение ЭИВ, особенно у линии 1022, могло быть связано с изменением функциональности гена *GTL1*.

Линии 1021 и 1034 контрастно различались по устойчивости показателей флуоресценции хлорофилла (см. рис. 3). У линии 1021, в отличие от 1034, при дефиците воды снижались реальная эффективность ФСП, скорость транспорта электронов, показатель функциональной активности ФСП (PI_{abs}) и интегральный показатель функциональной активности ФСП и ФСП (PI_{tot}). Эти различия, предположительно, обусловлены интрогрессиями от *Ae. tauschii* в хромосому 2D. Линия 1034 имела интрогрессию в районе маркера *Xgwm1419*, который находится в координатах 2D:472226450–472226470 п. н. и близко расположен к гену *TraesCS2D03G0058100* (координаты 2D:480941598–481111682 п. н.), кодирующему белок PsbQ. Функции этого белка связаны с координацией активности донорной и акцепторной сторон ФСП и стабилизацией активной формы светособирающего комплекса ФСП (Ifuku et al., 2011). Интрогрессия от *Ae. tauschii* в район маркера *Xgwm1419* могла положительно повлиять на функционирование фотосистемы II, которая вносит основной вклад в флуоресценцию хлорофилла.

Заключение

Сравнительное изучение устойчивости фотосинтеза и биомассы побега у пшеницы ЧС и вторичных интрогрессивных линий ЧС(Синбх) показало значительное разнообразие по этим признакам. С учетом того, что генотипы выращивались в контролируемых условиях, обнаруженные нами различия в устойчивости к почвенной засухе определяются интрогрессиями от *Ae. tauschii*. По результатам исследования можно заключить, что единичная интрогрессия в короткое плечо хромосомы 2D, ограниченная маркерами *Xgwm296* и *Xgwm261*, была благоприятна для устойчивости к засухе. Интрогрессия в длинное плечо хромосомы 2D в районе маркера *Xgwm1419* также поддерживала засухоустойчивость. Интрогрессия в это

же плечо хромосомы от *Ae. tauschii*, ограниченная маркером *Xgwm539*, была неблагоприятна для устойчивости фотосинтеза и биомассы побега. Маркеры *Xgwm296* и *Xgwm1419* можно рекомендовать для использования в маркер-ориентированной селекции пшеницы в случаях, когда донором генетического материала выступает *Ae. tauschii*.

Список литературы / References

- Botyanszka L., Zivcak M., Chovancek E., Sytar O., Berek V., Hauptvogel P., Halabuk A., Brestic M. Chlorophyll fluorescence kinetics may be useful to identify early drought and irrigation effects on photosynthetic apparatus in field-grown wheat. *Agronomy*. 2020;10(9):1275. doi 10.3390/agronomy10091275
- Chen K., Chen L., Fan J.B., Fu J. Alleviation of heat damage to photosystem II by nitric oxide in tall fescue. *Photosynth Res.* 2013; 116(1):21-31. doi 10.1007/s11120-013-9883-5
- Chen M., Ji M., Wen B., Liu L., Li S., Chen X., Gao D., Li L. GOLDEN 2-LIKE transcription factors of plants. *Front Plant Sci.* 2016;7:1509. doi 10.3389/fpls.2016.01509
- Cubas P., Lauter N., Doebley J., Coen E. The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. *Plant J.* 1999;18(2):215-222. doi 10.1046/j.1365-3113x.1999.00444.x
- Danisman S. TCP transcription factors at the interface between environmental challenges and the plant's growth responses. *Front Plant Sci.* 2016;7:1930. doi 10.3389/fpls.2016.01930
- Goltsev V.N., Kalaji H.M., Paunov M., Băba W., Horaczek T., Mojski J., Kocie H., Allakhverdiev S.I. Variable chlorophyll fluorescence and its use for assessing physiological condition of plant photosynthetic apparatus. *Russ J Plant Physiol.* 2016;63(6):869-893. doi 10.1134/S1021443716050058
- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: PAleontological STatistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electronica.* 2001;4(1):1-9. https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf
- Hedges L.V., Olkin I. Estimation of a single effect size: parametric and nonparametric methods. In: *Statistical Methods for Meta-Analysis*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 1985;75-106. doi 10.1016/B978-0-08-057065-5.50010-5
- Hernández-Verdeja T., Lundgren M.R. GOLDEN2-LIKE transcription factors: a golden ticket to improve crops? *Plants People Planet.* 2024;6(1):79-93. doi 10.1002/ppp3.10412
- Hosoda K., Imamura A., Katoh E., Hatta T., Tachiki M., Yamada H., Mizuno T., Yamazaki T. Molecular structure of the GARP family of plant Myb-related DNA binding motifs of the Arabidopsis response regulators. *Plant Cell.* 2002;14(9):2015-2029. doi 10.1105/tpc.002733
- Ifuku K., Ido K., Sato F. Molecular functions of PsbP and PsbQ proteins in the photosystem II supercomplex. *J Photochem Photobiol B.* 2011;104(1-2):158-164. doi 10.1016/j.jphotobiol.2011.02.006
- IWGSC. Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science.* 2018;361(6403):eaar7191. doi 10.1126/science.aar7191
- Jia J., Zhao S., Kong X., Li Y., Zhao G., He W., Appels R., ... Yang H., Liu X., He Z., Mao L., Wang J. *Aegilops tauschii* draft genome sequence reveals a gene repertoire for wheat adaptation. *Nature.* 2013;496(7443):91-95. doi 10.1038/nature12028
- Ma F., Li R., Guo G., Nie F., Zhu L., Liu W., Lyu L., Bai S., Zhao X., Li Z., Zhang D., Li H., Li S., Zhou Y., Song C.-P. Introgression of QTL from *Aegilops tauschii* enhances yield-related traits in common wheat. *Crop J.* 2023;11(5):1521-1532. doi 10.1016/j.cj.2023.05.001
- McFadden E.S., Sears E.R. The origin of *Triticum spelta* and its free threshing hexaploid relative. *J Hered.* 1946;37(3):81-89. doi 10.1093/oxfordjournals.jhered.a105590
- Nicholson P., Rezannor H.N., Worland A.J. Chromosomal location of resistance to *Septoria nodorum* in a synthetic hexaploid wheat de-

- terminated by the study of chromosomal substitution lines in 'Chinese Spring' wheat. *Plant Breed.* 1993;110(3):177-184. doi 10.1111/j.1439-0523.1993.tb00575.x
- Nyine M., Adhikari E., Clinesmith M., Aiken R., Betzen B., Wang W., Davidson D., Yu Z., Guo Y., He F., Akhunova A., Jordan K.W., Fritz A.K., Akhunov E. The haplotype-based analysis of *Aegilops tauschii* introgression into hard red winter wheat and its impact on productivity traits. *Front Plant Sci.* 2021;12:716955. doi 10.3389/fpls.2021.716955
- Ohama N., Yanagisawa S. Role of GARP family transcription factors in the regulatory network for nitrogen and phosphorus acquisition. *J Plant Res.* 2024;137(3):331-341. doi 10.1007/s10265-023-01513-0
- Osipova S., Permyakov A., Permyakova M., Pshenichnikova T., Verkhoturov V., Rudikovskiy A., Rudikovskaya E., Shishparenok A., Doroshkov A., Börner A. Regions of the bread wheat D genome associated with variation in key photosynthesis traits and shoot biomass under both well-watered and water deficient conditions. *J Appl Genet.* 2016;57:151-163. doi 10.1007/s13535-015-0315-4
- Osipova S., Permyakov A., Konstantinov D., Shchukina L., Rudikovskaya E., Permyakova M., Pshenichnikova T. Variability of photosynthesis parameters and yield in recombinant lines of bread wheat with introgressions from *Triticum timopheevii* into 2A chromosome under different water supply conditions. *Cereal Res Commun.* 2023; 52:101-113. doi 10.1007/s42976-023-00372-8
- Osipova S.V., Rudikovskii A.V., Permyakov A.V., Rudikovskaya E.G., Pomortsev A.V., Musalevskaya O.V., Pshenichnikova T.A. Using chlorophyll fluorescence parameters and antioxidant enzyme activity to assess drought tolerance of spring wheat. *Photosynthetica.* 2024;62(2):147-157. doi 10.32615/ps.2024.014
- Peršić V., Ament A., Antunović Dunić J., Drezner G., Cesar V. PEG-induced physiological drought for screening winter wheat genotypes sensitivity – integrated biochemical and chlorophyll *a* fluorescence analysis. *Front Plant Sci.* 2022;13:987702. doi 10.3389/fpls.2022.987702
- Pestsova E.G., Börner A., Röder M.S. Development of a set of *Triticum aestivum*-*Aegilops tauschii* introgression lines. *Hereditas.* 2001; 135(2-3):139-143. doi 10.1111/j.1601-5223.2001.00139.x
- Plaschke J., Ganal M.W., Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor Appl Genet.* 1995;91:1001-1007. doi 10.1007/BF00223912
- Pour-Aboughadareh A., Kianersi F., Pocza P., Moradkhani H. Potential of wild relatives of wheat: ideal genetic resources for future breeding programs. *Agronomy.* 2021;11(8):1656. doi 10.3390/agronomy11081656
- Przewieslik-Allen A.M., Burrige A.J., Wilkinson P.A., Winfield M.O., Shaw D.S., McAusland L., King J., King I.P., Edwards K.J., Barker G.L.A. Developing a high-throughput SNP-based marker system to facilitate the introgression of traits from *Aegilops* species into bread wheat (*Triticum aestivum*). *Front Plant Sci.* 2019;9:1993. doi 10.3389/fpls.2018.01993
- Reynolds M., Foulkes J., Furbank R., Griffiths S., King J., Murchie E., Parry M., Slaffer G. Achieving yield gains in wheat. *Plant Cell Environ.* 2012;35(10):1799-1823. doi 10.1111/j.1365-3040.2012.02588.x
- Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganal M.W. A microsatellite map of wheat. *Genetics.* 1998;149(4):2007-2023. doi 10.1093/genetics/149.4.2007
- Srivastava A., Biswas S., Yadav S., Kumar A., Rajaram H., Srivastava V., Mishra Y. Physiological and thylakoid proteome analyses of *Anabaena* sp. PCC 7120 for monitoring the photosynthetic responses under cadmium stress. *Algal Res.* 2021;54:102225. doi 10.1016/j.algal.2021.102225
- Wettstein D. Chlorophyll-letale und der submikroskopische form wechsel der plastiden. *Exp Cell Res.* 1957;12(3):427-506. doi 10.1016/0014-4827(57)90165-9
- Yoo C.Y., Hasegawa P.M., Mickelbart M.V. Regulation of stomatal density by the GTL1 transcription factor for improving water use efficiency. *Plant Signal Behav.* 2011;6(7):1069-1071. doi 10.4161/psb.6.7.15254
- Zheng X., Liu H., Ji H., Wang Y., Dong B., Qiao Y., Liu M., Li X. The wheat GT factor TaGT2L1D negatively regulates drought tolerance and plant development. *Sci Rep.* 2016;6:27042. doi 10.1038/srep27042
- Zheng X., Lan J., Yu H., Zhang J., Zhang Y., Qin Y., Su X.-D., Qin G. *Arabidopsis* transcription factor TCP4 represses chlorophyll biosynthesis to prevent petal greening. *Plant Commun.* 2022;3(4):100309. doi 10.1016/j.xplc.2022.100309

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 25.07.2024. После доработки 21.02.2025. Принята к публикации 02.03.2025.

doi 10.18699/vjgb-25-57

Цитофизиологические проявления защитных реакций пшеницы от стеблевой ржавчины, индуцируемые биофунгицидом Новохизолем

А.Б. Щербань ^{1, 2}, Л.Я. Плотникова ³, В.В. Кнауб ³, Е.С. Сколотнева ^{1, 2}, В.В. Фоменко ⁴

¹ Курчатowski геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, Омск, Россия

⁴ Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия

 lya.plotnikova@omgau.org

Аннотация. Биологизация земледелия считается приоритетным направлением сельскохозяйственного производства. Одним из перспективных подходов к решению задачи биологизации является применение препаратов на основе хитозана для стимуляции роста и защиты растений от широкого круга патогенов. В настоящее время проводятся активные работы по созданию и испытанию новых форм хитозановых препаратов. Препарат «Новохизол» получен в результате внутримолекулярных сшивок линейных молекул хитозана и имеет глобулярную форму. Ранее установлено стимулирующее влияние Новохизола на рост и развитие мягкой пшеницы, однако индуцируемые защитные механизмы против ржавчинных болезней не изучались. Проведенные исследования показали дозовый эффект препарата на развитие стеблевой ржавчины пшеницы. При обработке за четверо суток до заражения лучшие результаты по развитию устойчивой реакции растений, сокращению числа и размеров пустул были получены с Новохизолом в концентрации 0.125 и 0.75 %. После предобработки на проростках восприимчивого сорта Новосибирская 29 проявилась устойчивая реакция и снизилось число пустул. Цитофизиологические исследования показали, что обработка 0.75 % Новохизолом стимулировала интенсивное накопление пероксида водорода H_2O_2 в листьях инфицированных и здоровых растений в течение 48 ч после инокуляции. В период 48–144 ч после инокуляции H_2O_2 постепенно исчезал из тканей, но на стадии спороношения его содержание значительно возрастало в зоне колоний и пустул. Новохизол не индуцировал развитие реакции сверхчувствительности в зараженных растениях. Применение препарата способствовало более раннему и интенсивному (по сравнению с необработанными растениями) накоплению фенольных веществ с разным спектром автофлуоресценции в зоне колоний патогена. Препарат повлиял на изменение соотношения фенолов с разными спектральными характеристиками в сторону соединений с повышенным содержанием остатков сирингина. Данная работа является первым этапом изучения действия Новохизола на защитные механизмы пшеницы против стеблевой ржавчины. Исследования будут продолжены с применением молекулярно-генетических и биохимических методов.

Ключевые слова: биопестициды; Новохизол; мягкая пшеница; стеблевая ржавчина; механизмы устойчивости; АФК; фенолы

Для цитирования: Щербань А.Б., Плотникова Л.Я., Кнауб В.В., Сколотнева Е.С., Фоменко В.В. Цитофизиологические проявления защитных реакций пшеницы от стеблевой ржавчины, индуцируемые биофунгицидом Новохизолом. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2025;29(4):539-548. doi 10.18699/vjgb-25-57

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, № 23-16-00119, <https://rscf.ru/project/23-16-00119/>

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

Cytophysiological manifestations of wheat's defense reactions against stem rust induced by the biofungicide Novochizol

A.B. Shcherban ^{1, 2}, L.Ya. Plotnikova ³, V.V. Knaub ³, E.S. Skolotneva ^{1, 2}, V.V. Fomenko ⁴

¹ Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Omsk, Russia

⁴ N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

 lya.plotnikova@omgau.org

Abstract. Biologization is a priority direction of agricultural production. One of the promising approaches to solve the biologization problem is the use of chitosan-based biopreparations to stimulate plant growth and protect plants from a wide range of pathogens. Currently, active work is underway to create and test new chitosan preparations. Novochizol was obtained as a result of intramolecular crosslinking of linear chitosan molecules and has a globular shape. Previ-

ously, a Novochizol-stimulating effect on the growth and development of common wheat was demonstrated. However, the induced resistance mechanisms against rust diseases have not been studied before. The reported studies have revealed the dose effect of the preparation on the development of wheat stem rust. The best results of visual estimation of plant reactions were obtained with 0.125 and 0.75 % Novochizol pretreatment four days before rust infection. After pretreatment of susceptible cv. Novosibirsk 29 seedlings, a resistant reaction appeared and the urediniopustule density was decreased. Cytophysiological studies have shown that 0.75 % Novochizol stimulated an intensive accumulation of hydrogen peroxide H_2O_2 in the leaves of the infected and healthy plants within 48 hours post inoculation (h p/in). During the period of 48–144 h p/in, H_2O_2 gradually disappeared from tissues, but its content increased significantly at the sporulation stage around pustules. However, Novochizol did not induce the hypersensitivity reaction in infected plants. The preparation induced an earlier and more intensive (compared with untreated plants) accumulation of phenolic substances with different autofluorescence in the zones around pathogen colonies. Novochizol induced a change in the ratio of phenols with different spectral characteristics towards compounds with an increased content of syringin derivatives. This work is the first stage in the study of Novochizol effects on wheat defense mechanisms against stem rust. The research will be continued using molecular genetics, biochemical and cytophysiological methods.

Key words: biopesticides; Novochizol; common wheat; stem rust; resistance mechanisms; ROS; phenols

For citation: Shcherban A.B., Plotnikova L.Ya., Knaub V.V., Skolotneva E.S., Fomenko V.V. Cytophysiological manifestations of wheat's defense reactions against stem rust induced by the biofungicide Novochizol. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(4):539-548. doi 10.18699/vjgb-25-57

Введение

В связи с прогнозируемым к 2050 г. ростом населения Земли до 9.5 млрд человек необходимо увеличить производство зерна в 1.7 раза (USDA, 2016). Повышение сборов зерна пшеницы может быть обеспечено за счет создания более продуктивных и устойчивых к стрессам сортов, а также снижения потерь от действия абиотических и биотических факторов. Для защиты посевов от болезней и вредителей традиционно используют химические пестициды. Эти средства защиты высокоэффективны, однако могут накапливаться в растениях и почве, оказывая отрицательное действие на экологическую ситуацию в агроценозах и качество продукции (Штерншис и др., 2016). По мере изучения механизмов устойчивости к стрессам усиливается применение биологических средств защиты растений (Chandler et al., 2011).

Биологические средства защиты растений (БСЗР), основанные на природных соединениях и полезных микроорганизмах, привлекают внимание исследователей и практиков, поскольку по эффективности они часто близки к химическим препаратам, но не имеют их недостатков (Chakraborty et al., 2020). Спектр биопестицидов и схемы их применения очень разнообразны, что определяется биологией патогенов и вредителей, а также особенностями их взаимодействия с растениями. БСЗР могут оказывать прямое ингибирующее воздействие на патогенов или вредителей либо индуцировать комплекс защитных реакций растений (Orzali et al., 2017; Яруллина и др., 2023).

В качестве БСЗР широко используют производные хитина и хитозана (Тютереv, 2015; Malerba, Cerana, 2016). Полимерный углевод хитин распространен в природе и является компонентом покровов членистоногих, включая ракообразных и насекомых, и грибов. Хитозан получают путем гидролиза и деацетилирования хитина. Препараты на основе хитозана обладают стимулирующим действием на рост и развитие растений и усиливают их устойчивость к абиотическим стрессам (Haggag et al., 2014; Orzali et al., 2017). Производные хитозана также представляют особый интерес в качестве индукторов резистентности к грибным, бактериальным и вирусным заболеваниям (Chakraborty et al., 2020; Щербань, 2023).

Хитозановые препараты могут различаться по основным характеристикам: молекулярной массе, степени деацетилирования и индексу полидисперсности (Richter et al., 2012). Эффективность действия производных хитозана может быть значительно усилена путем их модификации: введения функциональных групп оснований Шиффа, атомов галогенов (Cl или F), наночастиц металлов, групп мочевины и др. (Варламов и др., 2020; Яруллина и др., 2023). Перспективными для защиты растений от грибных и вирусных болезней оказались препараты, созданные на основе конъюгатов хитозана с фенольными гидроксикоричными кислотами (феруловой и кофейной) (Rkhaila et al., 2021; Yarullina et al., 2024a). Установлен положительный защитный эффект сочетания хитозановых препаратов с другими биологически активными веществами (БАВ) и полезными микроорганизмами (plant growth promoting bacteria, PGPB) (Rkhaila et al., 2021; Yarullina et al., 2024b). Усиление защитных эффектов обусловлено синергетическим воздействием разных компонентов препаратов (Тютереv, 2015). В настоящее время в мире создан широкий спектр БСЗР на основе хитозана и проведены их испытания на различных культурах. Сравнение результатов показало, что стимулирующие и защитные эффекты зависели от состава препаратов, а также от видов растений и патогенов (Rabea et al., 2005; Orzali et al., 2017).

В России разработан ряд комплексных препаратов хитозана с добавлением БАВ: «Нарцисс» с янтарной и глутаминовой кислотами, «Хитозар М» с салициловой кислотой (СК), «Хитозар Ф» с арахидоновой кислотой, препарат с СК и ванилином и др. (Тютереv, 2015; Попова и др., 2018). Комбинированные препараты были эффективны против различных патогенных грибов, вирусов и вредителей. После их применения повышалась устойчивость: пшеницы – к бурой ржавчине, темно-бурой пятнистости и корневым гнилям; риса – к пирикулярриозу; томатов – к фитофторозу и фузариозу; картофеля – к фитофторозу и вирусу Y; огурцов – к ложной мучнистой росе и т.д. (Тютереv, 2015; Баданова и др., 2016; Попова и др., 2018).

В качестве БСЗР перспективно новое производное хитозана – «Новохизоль», полученный путем внутримолекулярной сшивки линейных молекул хитозана. Новохизоль

имеет глобулярную форму, что дает ему ряд преимуществ по сравнению с хитозаном: повышенную растворимость в водных растворах, химическую стабильность, устойчивость к биодegradации, высокую адгезию и способность проникать в ткани. Такое соединение способно поглощать различные вещества и медленно высвобождать их после обработки растений (Novochizol SA, www.novochizol.ch). Эти свойства важны для создания перспективных комбинированных препаратов с другими биологически активными веществами. Новохизоль проявляет ростостимулирующее действие при обработке семян и листьев. На примере мягкой пшеницы показано, что вещество усиливало прорастание семян, способствовало увеличению массы корней и общей массы растений (Terlyakova et al., 2022). В полевых условиях выявлена эффективность комплексных препаратов Новохизоля с усниновой кислотой или экстрактом коры сосны сибирской для защиты мягкой пшеницы от корневой гнили и септориоза (Бурлакова и др., 2025).

Известно, что после узнавания растениями эффекторов (элисаторов) неспециализированных или авирулентных патогенов активируется набор защитных реакций. К самым ранним ответам относится генерация активных форм кислорода (АФК) и оксида азота NO (Manjunatha et al., 2009; Singh et al., 2021; Плотникова, Кнауб, 2024). Накопление АФК (O_2^- , H_2O_2 , $^{\bullet}OH$, 1O_2) приводит к всплеску окислительных реакций – окислительному взрыву. Фермент супероксиддисмутаза (СОД) превращает супероксид-анион O_2^- в менее токсичный пероксид водорода H_2O_2 (Максимов, Черепанова, 2006). H_2O_2 оказывает токсическое действие на патогенов, а также является мессенджером в НАДФ-Н-оксидазной сигнальной системе, реализующейся через СК-зависимый сигнальный каскад (Тарчевский, 2000; Яруллина и др., 2023). В результате действия СК-зависимого каскада в зоне инфекции развивается комплекс защитных механизмов от биотрофных патогенов: генерация АФК, реакция сверхчувствительности (СВЧ), синтез защитных PR-белков (pathogenesis related proteins) и фенольных веществ. Защитные реакции против некротрофных патогенов регулируются с помощью сигнального каскада, зависящего от жасмоновой кислоты (ЖК), абсцизовой кислоты и этилена. Устойчивость к гембиотрофам обеспечивается за счет совместного действия СК- и ЖК-зависимых каскадов (Singh et al., 2021; Яруллина и др., 2023). Изучение влияния хитозанов на защитные реакции против патогенов показало активацию ферментов обмена АФК и фенольного метаболизма, накопление фенолов, защитных PR-белков и укрепление клеточных стенок с помощью лигнина и каллозы (Orzali et al., 2017; Щербань, 2023).

Для разработки технологии применения БСЗР необходимо изучить их действие на защитные механизмы и развитие наиболее вредоносных болезней. Влияние Новохизоля на механизмы устойчивости пшеницы против ржавчинных болезней ранее не исследовалось. Целью работы было изучение влияния Новохизоля на защитные механизмы восприимчивого сорта мягкой пшеницы при заражении возбудителем стеблевой ржавчины *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* Eriks. et Henn.

Материалы и методы

Объектом исследования были 10-суточные проростки восприимчивого к стеблевой ржавчине сорта яровой мягкой пшеницы Новосибирская 29. Растения выращивали в сосудах с почвой, что рекомендовано международными протоколами для экспериментов с ржавчинными грибами (Woldeab et al., 2017). Проростки обрабатывали растворами Новохизоля в концентрации 0.125, 0.75, 1.5, 2.5 %. Растворы наносили на растения с помощью пульверизатора (15 мл/100 растений) за четверо суток до заражения стеблевой ржавчиной. Такой срок предобработки достаточен для индукции защитных эффектов биопрепаратами, в том числе производными хитозана, против оомицетов и ржавчинных грибов (Faoro et al., 2008; Bellameche et al., 2021; Elsharkawy et al., 2022). Контролем служили растения, обработанные бидистиллированной водой.

Инокуляцию проростков проводили урединиоспорами сборного образца западносибирской популяции *P. graminis* f. sp. *tritici* (Pgt), включающего изоляты с генами авирулентности/вирулентности к генам устойчивости пшеницы *Sr11Sr24Sr30Sr31/Sr5Sr9aSr9bSr9dSr9gSr10Sr17Sr38SrMcN*. Урединиоспоры хранили до эксперимента при $-70^{\circ}C$ и рекультивировали на восприимчивом сорте мягкой пшеницы Хакасская (Рсалиев А.С., Рсалиев Ш.С., 2018). Суспензию урединиоспор с концентрацией 0.8 мг/мл Novex 7100 (Sørensen et al., 2016) наносили на проростки пульверизатором. Инокулированные растения инкубировали в течение 24 ч во влажной камере в темноте при температуре $15-20^{\circ}C$ для обеспечения максимального прорастания спор. Далее растения переносили в ростовые камеры и инкубировали при 16-часовом освещении фитолампами с интенсивностью 10000 люкс при температуре $26-28^{\circ}C$. Такая температура является критичной для формирования полноценной структуры аппрессориев, проникновения патогена в устьица и развития инфекционных гиф в межклетниках растения (Roelfs et al., 1992).

Фитопатологическая оценка реакции зараженных растений. Влияние препарата оценивали с помощью количественной и качественной характеристик, применяемых к описанию устойчивости проростков пшеницы к стеблевой ржавчине: количества пустул на лист (шт./лист, по 10 растений в варианте) и типа реакции. Реакцию растений (IT, infection type) определяли через 12–14 дней после инокуляции с использованием модифицированной шкалы Стэкмана, где IT «0», «<», «1», «2» интерпретировали как устойчивые (R, resistance), а «3», «3+» и «4» – как восприимчивые (S, susceptible) (Roelfs et al., 1992).

Цитологические и цитохимические исследования были проведены на растениях, обработанных Новохизолем с концентрацией 0.75 %. Материал фиксировали через 0, 24, 96, 144 и 240 ч после инокуляции (п/ин) в лакто-фенольном фиксаторе (фенол, молочная кислота, глицерин, дистиллированная вода, 96 % этанол в соотношении 1:1:1:1:8) (Плотникова, Мешкова, 2009). Инфекционные структуры на поверхности и в тканях растений выявляли с помощью флуоресцентного красителя Uvitex 2B (Sigma-Aldrich, США) по модифицированному методу (Moldenhauer et al., 2006). Для этого фиксированный в

лактофеноле материал промывали дистиллированной H₂O и выдерживали 3 ч в уксусно-кислом спирте (96 % этанол : ледяная уксусная кислота = 3 : 1). Затем промывали дистиллированной H₂O и выдерживали: в 50 % этаноле – 20 мин, 0.5N NaOH – 30 мин, дистиллированной H₂O – 5 мин, буфере 0.1M Tris-HCl (pH 5.8) – 30 мин, дистиллированной H₂O – 5 мин. Кусочки листьев окрашивали в течение 15 мин в 0.1 % Uvitex 2B в 0.1M Tris-HCl буфере (pH 5.8), предварительно прогревом при 60 °C. Для дифференциации окраски материал выдерживали 90 мин в дистиллированной воде. Наблюдения проводили в отраженном свете с волной возбуждения λ_{max} = 355 нм и эмиссии λ_{max} = 420 нм. Неповрежденные структуры гриба проявляли синее свечение, поврежденные клетки растений и гифы патогена в зоне интенсивного накопления H₂O₂ – голубое или белое.

Для локализации в тканях пероксида водорода H₂O₂ до фиксации выполняли витальное окрашивание материала 0.02%-м 3,3'-диаминобензидин тетрахлоридом (ДАБ) (Sigma-Aldrich, США) (Плотникова, Мешкова, 2009). Раствор вводили в листья путем вакуум-инфильтрации и инкубировали 30 мин. В присутствии H₂O₂ образовывался нерастворимый вишневого цвета формазан.

Распределение фенольных веществ в листьях изучали с помощью общей реакции на фенолы (низкомолекулярные и полимерный лигнин) с использованием 1 % сернокислого анилина (сульфат анилина : ледяная уксусная кислота : 50 % этиловый спирт = 1 : 2 : 97) в течение 1 ч с последующей промывкой в дистиллированной воде (Джапаридзе, 1953). Лигнин в проводящих пучках и клетках растений в зоне инфекции приобретали желто-коричневую окраску. Дополнительно исследовали автофлуоресценцию фенолов в отраженном свете с волной возбуждения λ_{max} = 355 нм и эмиссии λ_{max} = 530 нм (зеленое свечение) или λ_{max} = 605 нм (красное свечение) (Плотникова, Мешкова, 2009). Цитологические исследования проводили с использованием светового микроскопа ARSTEK E62 (ARSTEK, Китай) с цифровой камерой Sony Alpha A6400 APS-C с разрешением 24.2 Мпк/дюйм (Sony, Япония).

В ходе экспериментов изучали развитие 30–50 урединиоспор *Pgt* на каждом из пяти растений по варианту. Результаты развития *Pgt* на листьях учитывали как повторности опыта. Через 240 ч п/ин были измерены площади мицелия и урединиопустул (35–50 шт./вариант) с применением программного обеспечения фотокамеры. По всем данным рассчитывали средние значения и ошибки средних (приведены в таблицах и на графиках), а также вычисляли НСР при $p \leq 0.05$.

Таблица 1. Результаты визуальной оценки влияния концентрации Новохизоля на развитие *P. graminis* f. sp. *tritici* на проростках пшеницы

Показатель	Контроль	Концентрация Новохизоля, %			
		0.125	0.75	1.5	2.5
Тип реакции, IT	4	2	2, 2–	2, 2+	3, 3+
Среднее количество пустул, шт./лист	20.4 ± 0.54	8.3 ± 0.35*	18.1 ± 0.32*	15.1 ± 0.28*	14.3 ± 0.28*

* Достоверные различия с контролем при $p \leq 0.05$.

Результаты

Визуальная оценка влияния Новохизоля на развитие стеблевой ржавчины

На первом этапе работы было изучено влияние различных концентраций Новохизоля на развитие болезни на проростках восприимчивого сорта Новосибирская 29. В экспериментах был применен широкий спектр концентраций препарата – от 0.125 до 2.5 %. На растениях, обработанных водой (контроль), формировались пустулы с IT «4». Результаты показали, что препарат в любой концентрации влиял на развитие болезни, что проявлялось в уменьшении плотности расположения урединиопустул, сокращении их размеров и появлении зон хлороза различных размеров вокруг спороношений (табл. 1). В наименьшей степени IT снижался при обработке 2.5 % раствором Новохизоля (IT «3», «3+»). Препарат в концентрациях 0.125, 0.75 и 1.5 % индуцировал устойчивую реакцию растений. В наибольшей степени размеры пустул уменьшались при обработке препаратом с концентрацией 0.75 % (IT «2», «2–»). Этот вариант опыта был использован для дальнейшего изучения защитных реакций растений.

Результаты цитофизиологических исследований влияния Новохизоля на патогенез

Действие Новохизоля было оценено по развитию поверхностных и внутритканевых структур *Pgt* и реакций растений в зоне инфекции. После попадания на увлажненную поверхность растений урединиоспоры набухали и образовывали ростковые трубки (рис. 1, а). На концах большинства ростковых трубок формировались аппрессории, необходимые для проникновения в устьица (см. рис. 1, б). Значительная часть аппрессориев (73–78 %) располагалась на устьицах, и более 93 % из них обеспечивали проникновение патогена в устьица. Достоверных различий в развитии *Pgt* на поверхности необработанных и обработанных Новохизелем растений не установлено (табл. 2). Основная доля аппрессориев формировалась через 18–24 ч п/ин. После проникновения в устьица гриб формировал инфекционные гифы с материнскими клетками гаусторий (МКГ) (см. рис. 1, в), а первые гаустории в клетках мезофилла образовывались через 24–48 ч п/ин. Через 240 ч п/ин гриб формировал крупные пустулы со следующим поколением урединиоспор (см. рис. 1, г).

Для выявления активных реакций растений была изучена локализация пероксида водорода и фенольных соединений в листьях. Во всех вариантах опыта (контрольные незараженные, обработанные Новохизелем, инфициро-

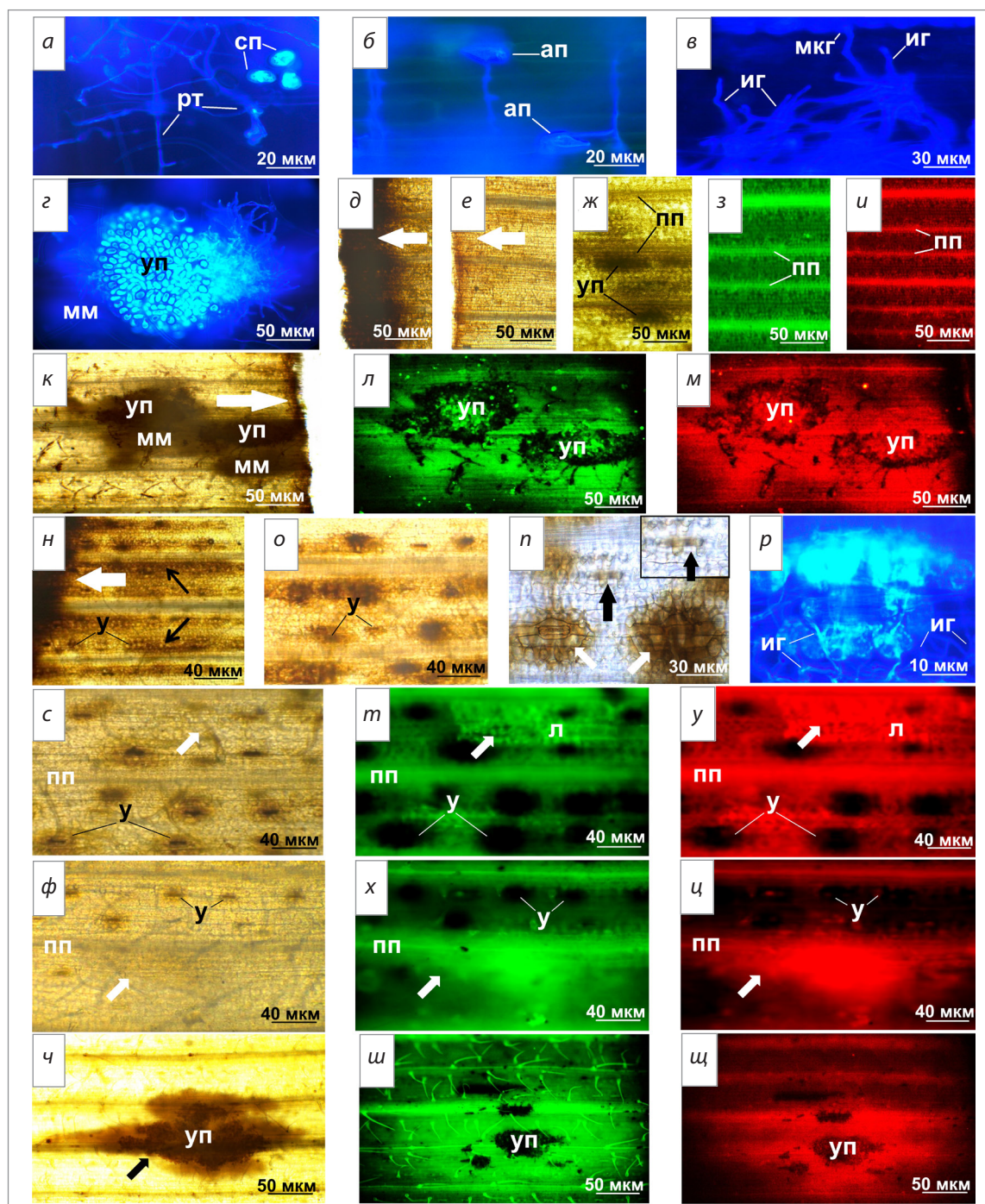


Рис. 1. Развитие *P. graminis* f. sp. *tritici* и распределение пероксида водорода и фенолов в тканях: а–г, ж, к–м – растения без обработки; д, е, з, у – контрольные незараженные растения; н–щ – растения, обработанные Новохизолом.

а – развитие ростковых трубок на поверхности; б – образование аппрессориев на устьицах; в – инфекционные гифы и материнская клетка гаустории в ткани; г – колония с урединиопустулой; д – интенсивное образование H_2O_2 на срезе листа контрольного растения, 24 ч п/ин; е – слабое накопление H_2O_2 на срезе листа контрольного растения, 240 ч п/ин; ж – фенолы в цитоплазме растений в зоне урединиопустулы и лигнина в проводящих пучках; з, у – автофлуоресценция фенолов в листе контрольного растения; к – накопление H_2O_2 в зонах колоний с урединиопустулами и на срезе листа (стрелка), 240 ч п/ин; л, м – накопление фенолов с зеленой и красной автофлуоресценцией вокруг урединиопустул; н – интенсивное накопление H_2O_2 на срезе листа и в ткани растения, 24 ч п/ин (стрелки); о – локализация H_2O_2 в зоне устьиц, 96 ч п/ин; п – пустая оболочка аппрессория на устьице растения (черная стрелка, выделенный фрагмент) и интенсивное накопление H_2O_2 под другими устьицами (белые стрелки), 48 ч п/ин; р – автофлуоресценция отмерших клеток растения и инфекционных гиф гриба (голубая), и нормальных гиф (синяя), 48 ч п/ин; с – abortивная колония (стрелка); т, у – автофлуоресценция фенолов и лигнина в зоне abortивной колонии (стрелки), 96 ч п/ин; ф – активно развивающаяся колония (стрелка); х, ц – автофлуоресценция фенолов в зоне активно развивающейся колонии (стрелки), 144 ч п/ин; ч – интенсивное накопление H_2O_2 (стрелка) в зоне колонии с урединиопустулой, 240 ч п/ин; ш, щ – интенсивное накопление фенолов с различным спектром свечения в зоне колонии с урединиопустулой, 240 ч п/ин. Обозначения: ап – аппрессорий; иг – инфекционная гифа; л – лигнин; мкг – материнская клетка гаустории; мм – мицелий; пп – проводящий пучок; рт – ростковая трубка; сп – спора; у – устьице; уп – урединиопустула. Окраска: а–г, р – Uvitex 2В; д, е, к, н–п, с, ф, ч – ДАБ; ж – сернокислый анилин; з, л, т, х, ш – автофлуоресценция фенолов при эмиссии $\lambda_{max} = 530$ нм; и, м, у, ц, щ – автофлуоресценция фенолов при эмиссии $\lambda_{max} = 605$ нм.

Таблица 2. Влияние Новохизоля на развитие *P. graminis* f. sp. *tritici* на поверхности растений мягкой пшеницы

Вариант	Доля проросших спор, %	Доля аппрессориев, %		
		от проросших спор	на устьицах от их общего количества	проросших в устьицах
Контроль	77.2 ± 1.6	61.3 ± 5.1	72.7 ± 3.6	93.8 ± 1.3
Новохизолъ	80.2 ± 1.9	63.8 ± 3.9	78.0 ± 2.7	93.2 ± 1.5
НСР _{0.05}	3.2	3.4	6.2	2.1

ванные *Pgt*, а также обработанные Новохизолом зараженные растения) в начале эксперимента ДАБ интенсивно окрашивал срезы листьев (см. рис. 1, *д, н*), а в удаленных от срезов зонах окраска была слабой (см. рис. 1, *д*). В конце эксперимента интенсивность окраски срезов всех листьев значительно снижалась (см. рис. 1, *е, к*). Вероятно, образование H_2O_2 было связано со стрессовой реакцией растений на механическое повреждение.

Распределение общих фенолов в листьях было сначала изучено с помощью специальной окраски серноокислым анилином. Фенолы выявлены в стенках проводящих пучков, что соответствует присутствию полимерного лигнина, а также в цитоплазме и на клеточных стенках растений в зоне развития *Pgt*. В других частях листьев содержание фенолов было низким (см. рис. 1, *ж*). Автофлуоресценция фенолов совпадала с их локализацией, определенной с помощью окраски серноокислым анилином. При разных режимах наблюдения проявлялось яркое зеленое или красное свечение (при эмиссии $\lambda_{max} = 530$ нм или $\lambda_{max} = 605$ нм соответственно), что связано с присутствием разных форм фенолов. В контрольных растениях красное свечение активнее проявлялось в крупных проводящих пучках, а зеленое – в мелких пучках, в стенках замыкающих клеток устьиц и мезофилльных клеток (см. рис. 1, *з, и*).

При развитии колоний *Pgt* в необработанных Новохизолом листьях не установлено значимых изменений клеток растений в зоне колоний вплоть до стадии спороношения. Через 240 ч п/ин определено накопление H_2O_2 в тканях под пустулами, и меньшее – в зоне остального мицелия (см. рис. 1, *к*). Вокруг пустул в зоне мицелия выявлено умеренное накопление фенолов с зеленым свечением, и более интенсивное – с красной автофлуоресценцией (см. рис. 1, *л, м*).

В обработанных Новохизолом растениях (незараженных и зараженных) отмечены зоны накопления H_2O_2 в листьях в виде пятен различной интенсивности в течение 48 ч п/ин. Распределение H_2O_2 значительно колебалось, что может быть связано с неравномерным нанесением препарата в ходе опрыскивания. При этом сильно окрашивались замыкающие клетки устьиц, а также мезофилльные клетки под устьицами и между проводящими пучками (см. рис. 1, *н*). Через 96–144 ч п/ин H_2O_2 постепенно исчезал из тканей, но в небольшом количестве оставался в замыкающих клетках устьиц и небольших зонах под ними (см. рис. 1, *о, с, ф*).

В обработанных Новохизолом инфицированных растениях содержание пероксида водорода в тканях в течение 96 ч п/ин было аналогично вышеописанному. Между локусами накопления H_2O_2 проникновение гриба в устьица происходило без отклонений, на поверхности устьиц

оставались пустые оболочки аппрессориев (см. рис. 1, *п*). В зонах с высоким содержанием АФК цитоплазма мертвых клеток растений проявляла белое свечение, поврежденных – голубое. Отмершие гифы патогена имели белую автофлуоресценцию, а неповрежденные – синюю (см. рис. 1, *р*). В локусах накопления АФК колонии погибали (абортировали) на ранних этапах развития. В зонах отмерших колоний через 96 ч п/ин накапливались фенолы в цитоплазме и лигнин на клеточных стенках с зеленой и менее выраженной красной автофлуоресценцией. Накопление зеленых и красных лигнинов усиливалось также в соседних участках проводящих пучков. При этом в зоне устьиц с повышенным содержанием H_2O_2 фенолы не накапливались (см. рис. 1, *т, у*).

Около активно развивающихся колоний значительной генерации H_2O_2 через 144 ч п/ин не обнаружено, также снизилось содержание пероксида водорода в зонах устьиц (см. рис. 1, *ф*). Фенолы с более выраженной зеленой и менее яркой красной автофлуоресценцией накрывали весь мицелий (см. рис. 1, *х, и*). Через 240 ч п/ин в зоне крупных колоний и пустул отмечено интенсивное накопление H_2O_2 (см. рис. 1, *ч*). Вокруг таких колоний выявлено интенсивное накопление фенолов в более широкой зоне, чем H_2O_2 . Фенолы и лигнин с зеленой автофлуоресценцией синтезировались интенсивнее и распространялись на большей площади, чем с красным свечением (см. рис. 1, *и, и*).

Изучение результатов развития *Pgt* показало, что в обработанных Новохизолом растениях средние площади колоний и пустул уменьшились по сравнению с необработанными в 1.5 и 2.2 раза соответственно (рис. 2, *а*). Влияние препарата привело к достоверному изменению соотношения колоний и пустул с разными размерами, по сравнению с необработанными растениями. При этом резко увеличилась доля мелких колоний и пустул, а часть колоний (22 %) погибла до спороношения (см. рис. 2, *б, в*).

Обсуждение

Биологические свойства препаратов, созданных на основе хитина и хитозана, начали исследовать с 1980-х годов. За это время были проведены многочисленные испытания влияния хитозановых препаратов на развитие патогенов (грибов, бактерий, вирусов) и проявления болезней. Фунгицидное действие хитозанов преимущественно изучено на патогенах с некротрофным или гемибiotрофным типом питания, включая наиболее вредоносные виды родов *Botrytis*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia* и др. (Chakraborty et al., 2020; Zheng et al., 2021; Щербань, 2023). Культивация этих грибов возможна на искусственных средах, что позволяет оценить влияние препаратов *in vitro*. На различных видах грибов

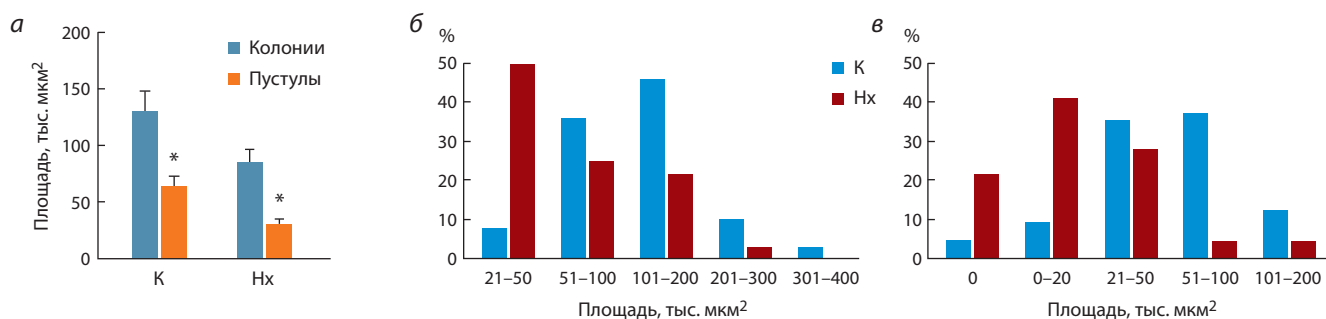


Рис. 2. Влияние Новохизоля на развитие колоний и пустул *P. graminis* f. sp. *tritici*.

а – средняя площадь; *б* – распределение колоний по площади; *в* – распределение пустул по площади. К – контроль; Нх – Новохизолем. * Достоверно при $p \leq 0.05$.

установлено, что фунгицидное действие хитозановых препаратов проявлялось в подавлении прорастания спор, ингибировании развития ростковых трубок, нарушении клеточных стенок и мембран, образовании непроницаемой пленки вокруг грибов (Ghaouth et al., 1994; Abd El-Kareem, Haggag, 2014). Подавление роста также могло быть связано с хелатированием ионов кальция и меди и отложением комплексов на поверхности клеток патогена, что снижало метаболическую активность грибов (Chakraborty et al., 2020). У живых растений влияние хитозанов реализуется после узнавания рецепторами и активации сигнальных систем растений (Яруллина и др., 2023).

Механизмы действия Новохизоля на развитие стеблевой ржавчины пшеницы изучены нами впервые. Установлен эффект концентрации Новохизоля на развитие стеблевой ржавчины пшеницы. Это подтверждает результаты ранее проведенных исследований о влиянии доз препаратов на защитные реакции (Orzali et al., 2017; Варламов и др., 2020). В варианте с 0.75 % Новохизолем отмечен наибольший ингибирующий эффект на развитие *Pgt*, хотя значительная площадь листьев проявляла признаки хлороза. В наших экспериментах, в отличие от вышеприведенных данных (Ghaouth et al., 1994; Abd El-Kareem, Haggag, 2014), Новохизолем не оказывал отрицательного действия на прорастание урединиоспор, развитие ростковых трубок и аппрессориев, а также проникновение в устьица.

В варианте с обработкой 0.125 % Новохизолем установлено более интенсивное подавление образования пустул. Действие препарата в концентрации 0.125 % будет изучено на следующих этапах исследований.

В 2000-х годах была сформулирована гипотеза двухуровневой организации иммунитета растений, получившая название РТИ-ЕТИ (Gill et al., 2015). Предполагалось, что у растений существуют рецепторы PRR (pattern recognition receptor), распознающие молекулы непатогенных (MAMP, microbe-associated molecular pattern) и неспециализированных патогенных микроорганизмов (PAMP, pathogen-associated molecular pattern), а также продукты разрушения клеток растений (DAMP, damage-associated molecular pattern). В результате узнавания этих молекул запускается первый уровень защиты РТИ (PAMP-triggered immunity). После преодоления РТИ активируется второй уровень защиты, связанный с узнаванием специфических эффекторов – ЕТИ (effector-triggered immunity). Действие

РТИ соответствует ответу видов-нехозяев, а ЕТИ – сортовой устойчивости и обычно сопровождается реакцией СВЧ (Gill et al., 2015). Позже была предложена усовершенствованная модель иммунитета, согласно которой ЕТИ является модулем амплификации реакций, зависящей от РТИ, а не изолированной системой (Yuan M. et al., 2021; Zhao et al., 2022).

В устойчивых растениях выявлено два пика образования АФК. Первый пик возникает через несколько минут после узнавания элиситоров и связан с активацией конститутивно существующего в мембране фермента НАДФ-Н-оксидазы и образованием $O_2^{\cdot-}$, который с помощью фермента СОД быстро превращается в H_2O_2 (Boller, Keen, 2000). Второй пик проявляется через 3–5 сут и связан с *de novo* синтезом ферментов про/антиоксидантной системы (пероксидаз, оксалаксоксидаз). Про/антиоксидантная система поддерживает оптимальный уровень АФК в тканях. Каталаза расщепляет H_2O_2 до воды, а различные пероксидазы, полифенолоксидаза и аскорбатоксидаза утилизируют АФК в окислительных реакциях (Максимов, Черепанова, 2006).

Ранее при взаимодействии ржавчинных грибов *P. tritici* и *P. coronata* с видами-нехозяевами (овсом и пшеницей соответственно) выявлена генерация $O_2^{\cdot-}$ замыкающими клетками устьиц после контакта с аппрессориями, что приводило к гибели патогенов (Плотникова, 2008). *Pgt* погибал на поверхности растений до внедрения в устьица видов-нехозяев *Secale cereale* и *Thinopyrum ponticum*, а при взаимодействии с сортами, несущими гены устойчивости этих видов (*Sr31*, *Sr24*, *Sr25*, *Sr26*), аппрессории отмирали после образования супероксид-аниона замыкающими клетками устьиц пшеницы (Plotnikova et al., 2022, 2023). На примере риса, обработанного хитозаном, был показан НАДФ-Н-зависимый синтез $O_2^{\cdot-}$ (Lopez-Moya et al., 2021). Усиление синтеза ферментов, участвующих в образовании АФК, установлено и в растениях проса, обработанных хитозаном и инфицированных *Alternaria kikuchiana* (Meng et al., 2010). Применение хитозана на ячмене индуцировало окислительный взрыв и синтез фенольных соединений, что повышало устойчивость к комплексу грибных болезней (Faoro et al., 2008).

Новохизолем по своему происхождению соответствует МАР. Гистохимическое изучение материала было начато через четверо суток после обработки препаратом,

при этом установлено интенсивное накопление H_2O_2 в листьях. Очевидно, это связано с проявлением второго пика окислительного взрыва и подтверждает элиситорную активность Новохизоля. Зоны с высоким содержанием H_2O_2 обнаружены как в районах устьиц, так и между проводящими пучками. Такие результаты могут быть связаны с повышенной способностью Новохизоля проникать через покровные ткани листьев и индуцировать образование АФК. Это объясняет появление больших зон хлороза на листьях. Через 96–144 ч п/ин содержание H_2O_2 в тканях уменьшалось. К концу эксперимента снизилось травматическое накопление АФК на срезах листьев во всех вариантах опыта. Такая динамика АФК может быть связана с синтезом ферментов и неферментативных компонентов антиоксидантной системы, утилизирующих АФК. Активизация антиоксидантных ферментов вслед за накоплением АФК показана на примере картофеля, обработанного конъюгатом хитина с феруловой кислотой в комплексе с полезными бактериями *Bacillus subtilis* (Yarullina et al., 2024a). Не исключено также, что антиоксидантная активность повышалась с возрастом растений.

В инфицированных растениях без обработки Новохизолем защитные реакции до стадии спорогенеза не проявлялись. После обработки Новохизолом отмечено отмирание небольшого числа клеток растений и фрагментов мицелия в зонах усиленного накопления H_2O_2 . Однако погибшие клетки растений не имели желтого свечения, характерного для реакции СВЧ (Vander et al., 1998). Это свидетельствует о том, что Новохизоль индуцирует реакции, частично отличающиеся от происходящих в устойчивых сортах пшеницы.

Часть колоний погибала на ранних этапах патогенеза. При этом в их зонах уже через 96 ч п/ин не обнаружен H_2O_2 , но происходило накопление фенолов с зеленым и красным свечением в цитоплазме, а также лигнина с зеленой автофлуоресценцией на клеточных стенках. В зоне средних и крупных развивающихся колоний тоже не установлено накопления АФК до спорогенеза и даже отмечено снижение H_2O_2 вблизи колоний. Уменьшение содержания H_2O_2 может быть объяснено как накоплением антиоксидантных ферментов растений, так и деятельностью патогена. В настоящее время известно, что биотрофные ржавчинные грибы секретируют сотни эффекторов в цитоплазму и апопласт. С помощью эффекторов патогены подавляют защитные реакции, а также изменяют или репрограммируют метаболизм хозяина. На примере вирулентного изолята возбудителя желтой ржавчины пшеницы *P. striiformis* f. sp. *tritici* показано, что выделение эффектора в форме каталазы, разлагающей H_2O_2 , приводило к подавлению устойчивости растений (Yuan P. et al., 2021). В то же время обработка Новохизолом стимулировала усиленное накопление H_2O_2 в зоне колоний на стадии спорогенеза.

На основании ранее проведенных исследований было установлено, что образование фенолов и укрепление клеточных стенок с помощью лигнина после обработки хитозанами – наиболее типичные защитные реакции против некротрофных и гембиотрофных грибов (Orzali et al., 2017; Щербань, 2023). В наших экспериментах обработка

Новохизолем стимулировала более раннее и интенсивное накопление фенолов, чем в необработанных растениях. Впервые показано, что влияние препарата изменяло соотношение фенолов с разными спектральными характеристиками в сторону соединений с зеленым свечением, тогда как в необработанных растениях преобладали фенолы с красным свечением. Ранее было определено, что лигнины с зеленой автофлуоресценцией проявляли специфическую реакцию на остатки сиригина и накапливались в тканях пшеницы после обработки индуктором системной приобретенной устойчивости Биомом (Плотникова, 2009). Вероятно также накопление в тканях PR-белков, не определяемых с помощью цитологических методов. После применения хитозанов у растений, инфицированных некротрофными грибами, усиливалась экспрессия генов, кодирующих PR-белки (хитиназы, глюканазы, пероксидазы, полифенолоксидазы, PR-1, PR-5 и др.) (Manjunatha et al., 2008, 2009; Nandeeshkumar et al., 2008; Orzali et al., 2014). Накопление в тканях PR-белков с различными функциями выявлено и на примере картофеля, обработанного конъюгатами хитозана с феруловой и кофейной кислотами (Yarullina et al., 2024a, b). Комплексное действие индуцированных Новохизолом защитных механизмов приводило к гибели значительной части колоний на ранних этапах развития, а также к значительному сокращению плотности пустул патогена и подавлению его размножения.

Проведенные исследования были первым этапом изучения действия Новохизоля на защитные механизмы пшеницы против стеблевой ржавчины. В дальнейшем будет детально исследовано влияние препарата на патогенез с применением молекулярно-генетических, биохимических и цитофизиологических методов.

Выводы

Исследования показали, что Новохизоль может быть использован в качестве индуктора устойчивости к стеблевой ржавчине пшеницы. Выявлен дозовый эффект обработки, при этом лучшие результаты были получены с концентрацией препарата 0.125 и 0.75 %.

Обработка листьев Новохизолом в концентрации 0.75 % не влияла на прорастание урединиоспор и развитие структур гриба на поверхности растений, но приводила к значительному сокращению числа развившихся колоний, а также размеров мицелия и пустул.

Через 4–8 сут после обработки препаратом (соответствует 0–4 сут после инокуляции) выявлено интенсивное накопление пероксида водорода в тканях инфицированных и незараженных растений, которое снижалось к концу эксперимента.

В зонах интенсивного накопления H_2O_2 отмечено частичное отмирание клеток растений и мицелия патогена. При этом клетки растения не проявляли характерного для реакции СВЧ свечения.

Новохизоль стимулировал более раннее и интенсивное накопление фенолов в зоне колоний и пустул и изменение соотношения фенольных соединений с разными спектральными характеристиками в сторону соединений с повышенным содержанием остатков сиригина (зеленая автофлуоресценция).

Список литературы / References

- Баданова Е.Г., Давлетбаев И.М., Сироткин А.С. Препараты на основе хитозана для сельского хозяйства. *Вестник технологического университета*. 2016;19(16):89-95 [Badanova E.G., Davletbaev I.M., Sirotkin A.S. Preparations based on chitosan for agriculture. *Vestnik Tekhnologicheskogo Universiteta = Herald of Technological University*. 2016;19(16):89-95 (in Russian)]
- Бурлакова С.В., Егорычева М.Т., Фоменко В.В., Салахутдинов Н.Ф., Щербань А.Б. Биологическое обоснование применения Новохинола с природными фунгицидами при возделывании мягкой пшеницы. *Химия в интересах устойчивого развития*. 2025;3:303-314 [Burlakova S.V., Egorycheva M.T., Fomenko V.V., Salakhutdinov N.F., Shcherban A.B. Biological justification of the use of Novokhisol with natural fungicides in the cultivation of bread wheat. *Chemistry for Sustainable Development*. 2025;3:303-314 (in Russian)]
- Варламов В.П., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Луньков А.П., Мысякина И.С. Хитин/хитозан и его производные: фундаментальные и прикладные аспекты. *Успехи биологической химии*. 2020;60:317-368 [Varlamov V.P., Ilyina A.V., Shagdarova B.T., Lunkov A.P., Mysyakina I.S. Chitin/chitosan and its derivatives: fundamental problems and practical approaches. *Biochemistry*. 2020;85:154-176. doi 10.1134/S0006297920140084]
- Джапаридзе Л.И. Практикум по микроскопической химии растений. М.: Сов. наука, 1953 [Japaridze L.I. Practicum on Microscopic Chemistry of Plants. Moscow: Sovetskaya Nauka Publ., 1953 (in Russian)]
- Максимов И.В., Черепанова Е.А. Про-/антиоксидантная система и устойчивость растений к патогенам. *Успехи современной биологии*. 2006;126(3):250-261 [Maksimov I.V., Cherepanova E.A. Pro-/antioxidant system and resistance of plants to pathogens. *Uspehi Sovremennoy Biologii = Advances in Current Biology*. 2006;126(3):250-261 (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*. 2008;50(5):439-446 (in Russian)]
- Плотникова Л.Я. Влияние индуктора системной устойчивости бензотиадиазола на патогенез бурой ржавчины пшеницы. *Физиология растений*. 2009;56(4):571-580 [Plotnikova L.Ya. Effect of benzothiadiazole, an inducer of systemic acquired resistance, on the pathogenesis of wheat brown rust. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2009;56(4):517-526. doi 10.1134/S1021443709040116]
- 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 [Plotnikova L., Knaub V. Exploitation of the genetic potential of *Thinopyrum* and *Agropyron* genera to protect wheat from diseases and environmental stresses. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov J Genet Breed*. 2024;28(5):536-553. doi 10.18699/vjgb-24-60]
- Плотникова Л.Я., Мешкова Л.В. Эволюция цитофизиологических взаимоотношений возбудителя бурой ржавчины и пшеницы при преодолении устойчивости, детерминированной геном *Lr19*. *Микология и фитопатология*. 2009;43(4):343-357 [Plotnikova L.Y., Meshkova L.V. Evolution of cytophysiological relationships between leaf rust causal agent and common wheat in the process of overcoming of resistance determined by the gene *Lr19*. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2009;43(4):343-357 (in Russian)]
- Попова Э.В., Домнина Н.С., Коваленко Н.М., Сокорнова С.В., Тюттерев С.Л. Влияние гибридных производных хитозана на устойчивость пшеницы к патогенам с разной стратегией питания. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2018;54(5):540-545. doi 10.1134/S055510991805015X [Popova E.V., Domnina N.S., Kovalenko N.M., Sokornova S.V., Tyuterev S.L. Influence of chitosan hybrid derivatives on induced wheat resistance to pathogens with different nutrition strategies. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2018;54(5):535-539. doi 10.1134/S0003683818050150]
- Рсалиев А.С., Рсалиев Ш.С. Основные подходы и достижения в изучении расового состава стеблевой ржавчины пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(8):967-977. doi 10.18699/VJ18.439 [Rsaliyev A.S., Rsaliyev Sh.S. Principal approaches and achievements in studying race composition of wheat stem rust. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov J Genet Breed*. 2018;22(8):967-977. doi 10.18699/VJ18.439 (in Russian)]
- Тарчевский И.А. Элиситор-индуцируемые сигнальные системы и их взаимодействие. *Физиология растений*. 2000;47(2):321-331 [Tarchevsky I.A. Elicitor-induced signaling pathways and their interaction. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2000;47(2):285-294]
- Тюттерев С.Л. Экологически безопасные индукторы устойчивости растений к болезням и физиологическим стрессам. *Вестник защиты растений*. 2015;1(83):3-13. [Tyuterev S.L. Ecologically safe inducers of plant resistance to diseases and physiological stresses. *Vestnik Zashchity Rasteniy = Plant Protection News*. 2015;1(83):3-13 (in Russian)]
- Штерншис М.В., Беляев А.А., Цветкова В.П., Шпатова Т.В., Ле-ляк А.А., Бахвалов С.А. Биопрепараты на основе бактерий рода *Bacillus* для управления здоровьем растений. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2016. [Sternshis M.V., Belyaev A.A., Tsvetkova V.P., Shpatova T.V., Lelyak A.A., Bakhvalov S.A. Biopreparations Based on Bacteria of the Genus *Bacillus* for Plant Health Management. Novosibirsk: Publishing House of SB RAS, 2016 (in Russian)]
- Щербань А.Б. Хитозан и его производные как перспективные средства защиты растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(8):1010-1021. doi 10.18699/VJGB-23-116 [Shcherban A.B. Chitosan and its derivatives as promising plant protection tools. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov J Genet Breed*. 2023;27(8):1010-1021. doi 10.18699/VJGB-23-116]
- Яруллина Л.Г., Калацкая Ж.Н., Черепанова Е.А., Еловская Н.А., Цветков В.О., Овчинников И.А., Бурханова Г.Ф., Рыбинская Е.И., Сорокань А.В., Герасимович К.М., Заикина Е.А., Николайчук В.В., Гилевская К.С., Марданшин И.С. Перспективы повышения биологической активности биопрепаратов на основе бактерий рода *Bacillus* и нанокмпозитов хитозана (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*. 2023;59(5):427-439. doi 10.31857/S0555109923050185 [Yarullina L.G., Kalatskaya J.N., Cherepanova E.A., Yalouskaya N.A., Tsvetkov V.O., Ovchinnikov I.A., Burkhanova G.F., Rybinskaya K.I., Sorokan A.V., Herasimovich K.M., Zaikina E.A., Nikolaichuk V.V., Hileuskaya K.S., Mardanshin I.S. Approaches to improving biological activity of agricultural formulations based on bacteria of the genus *Bacillus* and chitosan nanocomposites (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2023;59(5):549-560. doi 10.1134/s0003683823050186]
- Abd El-Kareem F., Haggag W. Chitosan and citral alone or in combination for controlling early blight disease of potato plants under field conditions. *Res J Pharm Biol Chem Sci*. 2014;5(6):941-949. [https://rjpbcs.com/pdf/2014_5\(6\)/%5B141%5D.pdf](https://rjpbcs.com/pdf/2014_5(6)/%5B141%5D.pdf)
- Bellameche F., Jasim M., Mauch-Mani B., Mascher F. Histopathological aspects of resistance in wheat to *Puccinia triticina*, induced by *Pseudomonas protegens* CHA0 and β -aminobutyric acid. *Phytopathol Mediterr*. 2021;60(3):441-453. doi 10.36253/phyto-13123
- Boller T., Keen N.T. Perception and transduction of elicitor signals in host-pathogen interactions. In: Slusarenko A.J., Fraser R.S.S., van Loon L.C. (Eds) Mechanisms of Resistance to Plant Diseases. Dordrecht: Springer, 2000;189-230. doi 10.1007/978-94-011-3937-3_7
- Chakraborty M., Hasanuzzaman M., Rahman M., Khan Md.A.R., Bhowmik P., Mahmud N.U., Tanveer M., Islam T. Mechanism of plant growth promotion and disease suppression by chitosan biopolymer. *Agriculture*. 2020;10:624. doi 10.3390/agriculture10120624

- Chandler D., Bailey A.S., Tatchell G.M., Davidson G., Greaves J., Grant W.P. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2011;366:1987-1998. doi 10.1098/rstb.2010.0390
- Elsharkawy M.M., Omara R.I., Mostafa Y.S., Alamri S.A., Hashem M., Alrumman S.A., Ahmad A.A. Mechanism of wheat leaf rust control using chitosan nanoparticles and salicylic acid. *J Fungi*. 2022; 8(3):304. doi 10.3390/jof8030304
- Faoro F., Maffi D., Cantu D., Iriti M. Chemical-induced resistance against powdery mildew in barley: the effects of chitosan and benzo-thiadiazole. *BioControl*. 2008;53(2):387-401. doi 10.1007/s10526-007-9091-3
- Ghautho A., Arul J., Grenier J., Benhamou N., Asselin A., Belanger G. Effect of chitosan on cucumber plants: suppression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defense reaction. *Phytopathology*. 1994;84(3):313-320. doi 10.1094/PHTO-84-31
- Gill U.S., Lee S., Mysore K.S. Host versus nonhost resistance: distinct wars with similar arsenals. *Phytopathology*. 2015;105(5):580-587. doi 10.1094/PHTO-11-14-0298-RVW
- Haggag W.M.W., Hussein M.M., Medhat M.T., El Habbasha S.F. Enhancement of wheat resistant to diseases by elicitors. *Int J Sci Res*. 2014;3(11):1526-1530
- Lopez-Moya F., Martin-Urdiroz M., Osés-Ruiz M., Were V.M., Fricker M.D., Littlejohn G.R., Lopez-Llorca L.V., Talbot N.J. Chitosan inhibits septin-mediated plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in a protein kinase C and Nox1 NADPH oxidase-dependent manner. *New Phytol*. 2021;230(4):1578-1593. doi 10.1111/nph.17268
- Malerba M., Cerana R. Chitosan effects on plant systems. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7):996. doi 10.3390/ijms17070996
- Manjunatha G., Roopa K.S., Prashanth G.N., Shetty H.S. Chitosan enhances disease resistance in pearl millet against downy mildew caused by *Sclerospora graminicola* and defence-related enzyme activation. *Pest Manag Sci*. 2008;64:1250-1257. doi 10.1002/ps.1626
- Manjunatha G., Niranjana-Raj S., Prashanth G.N., Deepak S., Amruthesh K.N., Shetty H.S. Nitric oxide is involved in chitosan-induced systemic resistance in pearl millet against downy mildew disease. *Pest Manag Sci*. 2009;65(7):737-743. doi 10.1002/ps.1710
- Meng X., Yang L., Kennedy J.F., Tian S. Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. *Carbohydr Polym*. 2010;81(1):70-75. doi 10.1016/j.carbpol.2010.01.057
- Moldenhauer J., Moerschbacher B.M., van der Westhuizen A.J. Histological investigation of stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) development in resistant and susceptible wheat cultivars. *Plant Pathology*. 2006;55:469-474. doi 10.1111/j.1365-3059.2006.01385.x
- Nandeeshkumar P., Sudisha J., Ramachandra K.K., Prakash H., Niranjana S., Shekar S.H. Chitosan induced resistance to downy mildew in sunflower caused by *Plasmopara halstedii*. *Physiol Mol Plant Pathol*. 2008;72(4-6):188-194. doi 10.1016/j.pmp.2008.09.001
- Orzali L., Forni C., Riccioni L. Effect of chitosan seed treatment as elicitor of resistance to *Fusarium graminearum* in wheat. *Seed Sci Technol*. 2014;42(2):132-149. doi 10.15258/sst.2014.42.2.03
- Orzali L., Corsi B., Forni C., Riccioni L. Chitosan in agriculture: a new challenge for managing plant disease. In: Shalaby E.A. (Ed.) Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides. *InTech*. 2017;87-96. doi 10.5772/66840
- Plotnikova L., Pozherukova V., Knaub V., Kashuba Y. What was the reason for the durable effect of *Sr31* against wheat stem rust? *Agriculture*. 2022;12:2116. doi 10.3390/agriculture12122116
- Plotnikova L., 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*. 2023;14:435-457. doi 10.3390/ijpb14020034
- Rabea E.I., Badawy M.E., Rogge T.M., Stevens C.V., Höfte M., Steurbaut W., Smagghe G. Insecticidal and fungicidal activity of new synthesized chitosan derivatives. *Pest Manag Sci*. 2005;61(10):951-960. doi 10.1002/ps.1085
- Richter T., Gulich M., Richter K. Quality control and good manufacturing practice (GMP) for chitosan-based biopharmaceutical products. In: Sarmiento B., das Neves J. (Eds) Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics. John Wiley & Sons, 2012;503-542. doi 10.1002/9781119962977.ch26
- Rkhaila A., Chtouki T., Erguig H., El Haloui N., Ounine K. Chemical properties of biopolymers (chitin/chitosan) and their synergic effects with endophytic bacillus species: unlimited applications in agriculture. *Molecules*. 2021;26(4):1117. doi 10.3390/molecules26041117
- Roelfs A.P., Singh R.P., Saari E.E. Rust diseases of wheat: concepts and methods of disease management. Cimmyt, Mexico DF, Mexico, 1992.
- Singh Y., Nair A.M., Verma P.K. Surviving the odds: from perception to survival of fungal phytopathogens under host-generated oxidative burst. *Plant Commun*. 2021;2:100142. doi 10.1016/j.xplc.2021.100142
- Sørensen C.K., Thach T., Hvømøller M.S. Evaluation of spray and point inoculation methods for the phenotyping of *Puccinia striiformis* on wheat. *Plant Disease*. 2016;100(6):1064-1070. doi 10.1094/PDIS-12-15-1477-RE
- Tepliyakova O.I., Fomenko V.V., Salakhutdinov N.F., Vlasenko N.G. Novochizol™ seed treatment: effects on germination, growth and development in soft spring wheat. *Nat Prod Chem Res*. 2022;10(5):1-4. doi 10.35248/naturalproducts.10.5.1-04
- USDA. World Agricultural Production; USDA Foreign Agricultural Service. Washington, DC, USA, 2016.
- Vander P., Vårum K.M., Domard A., El Gueddari N.E., Moerschbacher B.M. Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitoooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiol*. 1998;118(4):1353-1359. doi 10.1104/pp.118.4.1353
- Woldeab G., Hailu E., Bacha N. Protocols for race analysis of wheat stem rust (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*). Ambo, Ethiopia: EIAR, 2017.
- Yarullina L.G., Burkhanova G.F., Tsvetkov V.O., Cherepanova E.A., Sorokan A.V., Zaikina E.A., Mardanshin I.S., Fatkullin I.Y., Maksimov I.V., Kalatskaja J.N., Yaloukaya N.A., Rybinskaya E.I. The effect of chitosan conjugates with hydroxycinnamic acids and *Bacillus subtilis* bacteria on the activity of protective proteins and resistance of potato plants to *Phytophthora infestans*. *Appl Biochem Microbiol*. 2024a;60(2):231-240. doi 10.1134/S0003683824020194
- Yarullina L., Kalatskaja J., Tsvetkov V., Burkhanova G., Yaloukaya N., Rybinskaya K., Zaikina E., Cherepanova E., Hileuskaya K., Nikolaichuk V. The influence of chitosan derivatives in combination with *Bacillus subtilis* bacteria on the development of systemic resistance in potato plants with viral infection and drought. *Plants*. 2024b;13:2210. doi 10.3390/plants13162210
- Yuan M., Pok B., Ngou M., Ding P., Xin X.-F. PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. *Curr Opin Plant Biol*. 2021;62:102030. doi 10.1016/j.pbi.2021.102030
- Yuan P., Qian W., Jiang L., Jia C., Ma X., Kang Z., Liu J. A secreted catalase contributes to *Puccinia striiformis* resistance to host-derived oxidative stress. *Stress Biol*. 2021;1(1):22. doi 10.1007/s44154-021-00021-2
- Zhao Y., Zhu X., Chen X., Zhou J. From plant immunity to crop disease resistance. *J Genet Genom*. 2022;49(8):693-703. doi 10.1016/j.jgg.2022.06.003
- Zheng K., Lu J., Li J., Yu Y., Zhang J., He Z., Ismail O.M., Wu J., Xie X., Li X., Xu G., Dou D., Wang X. Efficiency of chitosan application against *Phytophthora infestans* and the activation of defence mechanisms in potato. *Int J Biol Macromol*. 2021;182:1670-1680. doi 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.097

doi 10.18699/vjgb-25-58

Рецепторподобные киназы с лейцин-богатыми повторами подсемейства III участвуют в распознавании *Pectobacterium* spp. растениями семейства Solanaceae

Е.В. Шруб, А.В. Колубако, П.В. Вычик, О.А. Бадалян, Е.А. Николайчик  

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
 nikolaichik@bsu.by

Аннотация. Геномы растений семейства Пасленовые содержат более 600 генов рецепторных протеинкиназ с лейцин-богатыми повторами (LRR-RLK), многие из которых, вероятно, связаны с детекцией патогенов, но лишь некоторые были функционально охарактеризованы. Энтеробактерии рода *Pectobacterium* – основные бактериальные патогены многих сельскохозяйственных культур, в том числе картофеля и других растений семейства Пасленовые. Для актуальных патогенов из рода *Pectobacterium* специфические иммунные рецепторы растений не описаны. Однако у *Malus × domestica* охарактеризовано четыре LRR-RLK из подсемейства LRRIII (DIPM1-4), специфически взаимодействующих с эффекторным белком DspE и участвующих в распознавании родственного энтеробактериального фитопатогена *Erwinia amylovora*. Поскольку ортолог DspE является основным эффектором и у *Pectobacterium* spp., мы выполнили филогенетический анализ RLK-LRRIII растений семейства Пасленовые совместно с более полно охарактеризованными LRR-RLKIII у *Arabidopsis thaliana* и выделили девять кластеров родственных RLK. Кластеризация и анализ опубликованных данных позволили функционально охарактеризовать это семейство RLK и предложить наиболее вероятных кандидатов для проверки взаимодействия с основным эффектором пектобактерий DspE. Тестирование киназных доменов репрезентативных представителей разных кластеров в дрожжевой двухгибридной системе выявило четыре RLK растений семейства Пасленовые, которые взаимодействуют с эффектором DspE из *Pectobacterium versatile* (Pve). Уровень экспрессии генов этих RLK и их ортологов у разных растений семейства варьировал, но в целом был очень низким. При этом обнаружена сильная DspE-зависимая супрессия генов *RLK2* и *RLK5* у инфицированных Pve растений картофеля, а инаktivация их ортологов предотвращала развитие сверхчувствительной реакции в листьях растений, инфицированных суспензиями Pve. Данная работа расширяет понимание разнообразия RLK подсемейства LRR-RLKIII и их роли в иммунитете растений и может способствовать селекции устойчивых к бактериозам сортов растений семейства Пасленовые.

Ключевые слова: рецепторподобные протеинкиназы; Solanaceae; *Pectobacterium*; эффектор; растительный иммунитет

Для цитирования: Шруб Е.В., Колубако А.В., Вычик П.В., Бадалян О.А., Николайчик Е.А. Рецепторподобные киназы с лейцин-богатыми повторами подсемейства III участвуют в распознавании *Pectobacterium* spp. растениями семейства Solanaceae. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2025;29(4):549-558. doi 10.18699/vjgb-25-58

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Б24М-035) и Министерства образования Республики Беларусь (проект № 20241129).

Receptor-like leucine-rich repeat kinases of subfamily III are involved in the recognition of *Pectobacterium* spp. by Solanaceae plants

E.V. Shrub, N.V. Kalubaka, P.V. Vychyk, O.A. Badalyan, Y.A. Nikolaichik  

Belarusian State University, Minsk, Belarus
 nikolaichik@bsu.by

Abstract. The genomes of Solanaceae plants contain over 600 receptor-like protein kinase genes with leucine-rich repeats (LRR-RLK), many likely associated with pathogen detection, but very few functionally characterized. *Pectobacterium* spp. are the major bacterial pathogens of agricultural crops, particularly potatoes and other Solanaceae plants. For relevant potato pathogens from the genus *Pectobacterium*, specific immune receptors have not been described in Solanaceae. However, in *Malus × domestica*, four LRR-RLK from the LRRIII subfamily (DIPM1-4) have been characterized as receptors for the related pathogen *Erwinia amylovora*. DIPMs specifically interact with the effector protein DspE and are involved in *E. amylovora* recognition. Since the DspE ortholog is also the main effector in *Pectobacterium* spp., we performed a phylogenetic analysis of LRRIII subfamily receptors in the most relevant Solanaceae representatives

together with a much better characterized LRR-RLKIII of *Arabidopsis thaliana* and identified nine clusters of related RLKs. Clustering followed by analysis of published data allowed us to functionally characterize this RLK family and suggest the most likely candidates for checking interactions with the main effector of pectobacteria, DspE. Testing the kinase domains of representative cluster members in a yeast two-hybrid system revealed four Solanaceae RLKs interacting with the DspE effector from *Pectobacterium versatile*. Virus-induced silencing of these RLK genes demonstrated their involvement in *P. versatile* recognition. The *RLK6* gene from *Solanum bulbocastanum*, which is not an ortholog of the DIPM proteins in apple, seems to be the most promising potential resistance gene. This work expands our understanding of LRR-RLKIII subfamily RLKs and their role in plant immunity, providing a foundation for future development of disease-resistant Solanaceae varieties.

Key words: receptor-like protein kinase; Solanaceae; *Pectobacterium*; effector; plant immunity

For citation: Shrub E.V., Kalubaka N.V., Vychyk P.V., Badalyan O.A., Nikolaichik Y.A. Receptor-like leucine-rich repeat kinases of subfamily III are involved in the recognition of *Pectobacterium* spp. by Solanaceae plants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(4):549–558. doi 10.18699/vjgb-25-58

Введение

Pectobacterium spp. являются основными бактериальными патогенами целого ряда важнейших сельскохозяйственных культур, в первую очередь картофеля. Для картофеля наиболее актуальны штаммы видов *P. atrosepticum*, *P. carotovorum*, *P. parmentieri* и *P. versatile*. В зависимости от условий и особенностей штамма пектобактерии могут поражать как подземные, так и надземные части растения, вызывая мягкую гниль клубней, а также черную ножку или воздушную гниль стеблей картофеля. Основным признаком пектобактериозов – массивированная продукция около 30 экзоферментов (пектолитических, целлюлолитических и протеолитических), что и приводит к характерному размягчению пораженных тканей (Chatterjee et al., 1995; Pérombelon, 2002).

Большинство сортов картофеля восприимчиво к пектобактериозам. Хотя известны относительно толерантные сорта (Kwenda et al., 2016), устойчивые к этим патогенам растения картофеля пока не созданы. В немалой степени такая ситуация определяется недостаточным пониманием механизмов распознавания растениями этих патогенов и, в частности, отсутствием информации о специфических к пектобактериям рецепторах растений.

Пектобактерии довольно долго рассматривались как типичные некротрофы, минимально взаимодействующие со своими хозяевами. Однако с начала геномной эры накоплено достаточно данных, свидетельствующих о сложном характере молекулярных коммуникаций между *Pectobacterium* spp. и его хозяевами. Пектобактерии способны достаточно долго сосуществовать со своими хозяевами в «невидимом» режиме – без развития системной инфекции и без существенных повреждений растительных тканей (Toth, Birch, 2005; Gorshkov et al., 2018).

Переключение между двумя принципиально разными фазами инфекции – латентной и симптоматической – зависит от регуляторных событий, о которых пока имеются только фрагментарные представления, причем критически отсутствуют сведения о самых ранних стадиях взаимодействия растения с патогеном. Так, система «чувства кворума» патогена активирует синтез множества факторов вирулентности только при высокой плотности популяции (Liu H. et al., 2008), специализированный репрессор пектинолиза KdgR инактивируется продуктами гидролиза полигалактуронатов (Liu Y. et al., 1999; Скобляков и др., 2004), т. е. уже при заметном разрушении клеточной стенки, а PhoPQ-зависимое переключение метаболических и

транспортных процессов патогена происходит вследствие освобождения дивалентных катионов при разрушении клеточной стенки (Kravchenko et al., 2021). Эти три регуляторных механизма хорошо изучены, однако срабатывают довольно поздно в ходе инфекции, когда определенный ущерб растению уже фактически гарантирован, поэтому не могут быть хорошими мишенями для контроля над патогеном. Более перспективной представляется стадия первоначального распознавания патогена растением с помощью мембранных рецепторов, однако специфические растительные рецепторы пектобактерий до сих пор не описаны.

Классическая модель иммунитета растений (Jones, Dangl, 2006) показывает специфическое распознавание молекулярных образов патогенов (PAMP/MAMP, Pathogen/microbe-associated molecular pattern) и эффекторов как триггер взаимосвязанных цепочек PAMP- и эффектор-индуцируемого иммунного ответа (PTI, pathogen-triggered immunity и ETI, effector-triggered immunity). В качестве PAMP чаще всего выступают консервативные белки (флагеллин, фактор элонгации трансляции Tu) (Gómez-Gómez, Boller, 2000; Zipfel et al., 2006), липиды (например, 3-гидроксидекановая кислота) (Kutschera et al., 2019), пептидогликан (Willmann et al., 2011) и полисахариды (Kawaharada et al., 2015).

Эффекторами являются белки, транслоцируемые патогеном непосредственно в клетки растений, однако они могут действовать и снаружи клетки, как, например, Avr-белки грибного патогена *Cladosporium fulvum* (*Fulvia fulva*) (Rooney et al., 2005). Основная функция эффекторных белков заключается в нарушении работы растительных сигнальных цепочек, ответственных за распознавание патогена и активацию иммунного ответа, при этом механизмы их действия разнообразны и многочисленны (Giraldo, Valent, 2013; Macho, Zipfel, 2015; Zhang et al., 2022). Несмотря на ключевую роль эффекторов в адаптации патогена к своему хозяину, наличие у растения специфичного к конкретному эффектору иммунного рецептора (продукта R-гена) активирует ETI и обеспечивает устойчивость к заражению.

Детекция PAMP/MAMP осуществляется мембранными рецепторными комплексами, тогда как рецепторы эффекторов, запускающие ETI, могут быть как мембранными, так и цитоплазматическими (Böhm et al., 2014; Couto, Zipfel, 2016; Bentham et al., 2020; Sun, Zhang, 2020), причем мембранные рецепторы MAMP/PAMP и цитоплазматиче-

ческие рецепторы эффекторов могут физически взаимодействовать между собой (Qi et al., 2011). При различных начальных звеньях последующие компоненты сигнальных цепочек и активируемые иммунные реакции в значительной степени совпадают, поэтому разница между РТИ/МТИ и ЕТИ скорее количественная, а не качественная (Navarro et al., 2004; Thomma et al., 2011; Yuan et al., 2021).

В комплексе со специфическим к конкретному лиганду рецептором обычно работают корецепторы, которые могут входить в состав многих рецепторных комплексов. Рецепторы и корецепторы принадлежат к нескольким белковым семействам, однако их большая часть входит в семейство белков с рецепторным доменом, богатым лейциновыми повторами (leucine-rich repeat, LRR) (Shiu, Bleecker, 2003; Chakraborty et al., 2019; Dievart et al., 2020). Рецепторы обычно имеют более 10 LRR, тогда как корецепторы – менее 9. Специфические рецепторы могут иметь или не иметь цитоплазматический киназный домен и называются рецепторподобными киназами (receptor-like kinase, RLK) или рецепторподобными белками (receptor-like protein, RLP) соответственно. Корекцепторы, как правило, имеют киназный домен и способны фосфорилировать другие компоненты рецепторного комплекса, включая сам рецептор. В состав рецепторного комплекса могут входить несколько корекцепторов (что является обязательным в рецепторных комплексах с участием RLP) (Huang, Joosten, 2025).

Применение классической зигзаг-модели иммунитета (Jones, Dangl, 2006) к пектобактериям затруднено минимумом данных по PAMP-индуцируемым реакциям (Kröner et al., 2011; Кузьмич и др., 2014), а также тем, что на сегодняшний день для пектобактерий известен единственный эффекторный белок – DspE (DspA) (Николайчик и др., 2005; Kim J.-G. et al., 2009). DspE принадлежит к AvrE-суперсемейству эффекторов системы секреции III типа (CC3T) (Николайчик и др., 2005; Degraeve et al., 2015). Эффекторы этого семейства получили свои названия от “avirulence” (авирулентность), “disease-specific protein” (болезнь-специфичный белок) и “water-soaking” (водонасыщенный) в соответствии с индуцируемым у растения фенотипом (AvrE, DspE и WtsE соответственно) и считаются критичными для патогенов с небольшим числом эффекторов (*Erwinia* spp., *Pantoea* spp. и *Pectobacterium* spp.) (Gaudriault et al., 1997; Frederick et al., 2001; Mor et al., 2001; Kim H.-S. et al., 2011).

Белок DspE у *P. versatilis* (Pve) – основной индуктор сверхчувствительной реакции (типичного признака ЕТИ). Его доставка в клетки растений обеспечивается CC3T, причем DspE в клетках растений детектируется уже через 3 ч после заражения растений неиндуцированной культурой (Николайчик и др., 2005). Доставка DspE в клетки растений запускает как локальные, так и системные защитные реакции, что свидетельствует в пользу способности растений детектировать этот эффекторный белок (Николайчик, 2009).

Первое свидетельство способности растений специфически распознавать DspE было получено при исследовании ортолога этого эффектора из *Erwinia amylovora*, возбудителя бактериального ожога яблони: с помощью дрожжевой двухгибридной системы у растений *Malus* ×

domestica были обнаружены четыре рецепторподобные киназы (DIPM1-4), внутриклеточные домены которых специфически взаимодействовали с DspE (Meng et al., 2006). DIPM (DspE-Interacting Protein from *Malus*, DspE-взаимодействующий белок яблони) представляют собой рецепторподобные киназы с лейцин-богатыми повторами в сенсорном домене, относящиеся к третьему подсемейству этого семейства (LRR-RLKIII).

Инактивация DIPM с помощью сайленсинга или генетического редактирования приводила к повышению устойчивости растений к бактериальному ожогу (Borejsza-Wysocka et al., 2006; Pompili et al., 2020). Аналогичный подход позволил нам ранее выявить три рецепторподобные киназы томата и табака, взаимодействующие с DspE Pve. Сайленсинг генов *RLK2* и *RLK5* у *Nicotiana benthamiana* снижал способность растений распознавать Pve, что вызывало ослабление реакции сверхчувствительности (Николайчик и др., 2012; Бадалян, Николайчик, 2014). Обнаружены также три RLK *Zea mays* (WIP3-5), специфически взаимодействующие с WtsE – ортологом DspE из *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, однако их функции в растениях пока не исследованы (Jin et al., 2016).

Фенотип растений яблони и *N. benthamiana* с инактивацией *DIPM* и *RLK2/5* свидетельствует о том, что эти рецепторные протеинкиназы ответственны за чувствительность растений к DspE-продуцирующим патогенам, т. е. могут рассматриваться как S-гены. Инактивация S-генов может применяться для получения устойчивых растений, однако очевидно, что охарактеризованные DspE-взаимодействующие киназы частично дублируют функции друг друга, а их весь спектр неизвестен, поэтому полная элиминация чувствительности к патогену за счет инактивации одного или даже пары генов этих рецепторов выглядит маловероятной. С другой стороны, для обеспечения устойчивости к патогену может быть достаточно одного «подходящего» R-гена, и такой ген, кодирующий LRR-RLKIII, был описан для другой патосистемы (Zhao et al., 2019).

Вышеприведенные данные показывают, что LRR-RLKIII могут быть кандидатами на роль S- и R-генов к различным патогенам, а также выполнять различные функции, связанные с ростом и развитием растений. Настоящая работа обобщает и классифицирует доступную информацию по LRR-RLKIII с акцентом на растения семейства Solanaceae, что должно упростить поиск перспективных генов устойчивости для применения в селекционных целях. Мы также приводим пример использования этой классификации для идентификации потенциального гена устойчивости к пектобактериозам.

Материалы и методы

Растительный материал и штаммы микроорганизмов. Использованы: растения *Solanum tuberosum* сорта Рагнеда и *N. benthamiana*, выращенные в нестерильном питательном грунте при 20 °C и 16-часовом световом дне, а также следующие штаммы микроорганизмов: Pve JN42 (*mcrB::ISPcc2*, *ΔfliTEFG*, Cm^R (Tn9), Rif^R), VKE (JN42 *dspE*) (Николайчик et al., 2005); *A. tumefaciens* GV3101 (Rif^R, Gen^R, vir⁺) (Arabidopsis Biological Resource Center); *Saccharomyces cerevisiae* SKY48 (*MATa*, *trp1*,

his3, *ura3*, *lexAop-LEU2*, *cIop-LYS2*), SKY473 (*MATa*, *his3*, *leu2*, *trp1*, *ura3*, *lexAop-LEU2*, *cIop-LYS2*) (Serebriiskii et al., 2005). Штамм JN42 является производным от природного изолята *Pve* 3-2, не имеющего жгутиков из-за делеции фрагмента *fli*-кластера (GenBank CP024842). Культуры *Pve* и *A. tumefaciens* культивировали на среде LB, а *S. cerevisiae* – на среде YPD при 28 °C.

Нуклеиновые кислоты. Использованы плазмиды pTRV2, p1039, p1044, p1046 (Liu Y. et al., 2002), они получены из Arabidopsis Biological Resource Center; pTRV2::*RLK2*, pTRV2::*RLK5*; pJG4-5; pJG4-5::*dspF*, pJK202::*dspE* (Николайчик и др., 2012); pJG4-5::*sIRLK2*, pJG4-5::*sIRLK5*, pJG4-5::*ntRLK5* (Бадалян, Николайчик, 2014). Последовательности олигонуклеотидов для ОТ-кПЦР указаны в табл. S1 Приложения¹.

Молекулярное клонирование. Фрагмент гена C00T013379 (*sbRLK6*) из *S. bulbocastanum* был амплифицирован с помощью праймеров 5'-ccgaattcggtttattctctggaagat-3' и 5'-cgctctgagggccaactcattgagaatcag-3' и клонирован в векторах pJG4-5 и pTRV2 по сайтам EcoRI – XhoI.

Анализ белок-белковых взаимодействий осуществлялся в LexA-зависимой дрожжевой двухгибридной системе (Serebriiskii et al., 2005). В качестве приманки выступал фрагмент гена *dspE*, клонированный в векторе pJK202. Для позитивного контроля взаимодействия с DspE использован секреторный шаперон DspF, специфичный к DspE (Валентович и др., 2008). Клетки штамма *S. cerevisiae* SKY473 трансформировали производными pJG4-5, а клетки противоположного типа спаривания SKY48 – pJK202::*dspE*. Для выявления белок-белковых взаимодействий диплоиды *S. cerevisiae*, полученные в результате скрещивания штаммов SKY473 и SKY48, культивировали на селективной среде 2–4 суток, затем проводили “blue-white” тест на активность β-галактозидазы.

Анализ белковых последовательностей. Использованы геномные сборки и аннотации следующих версий: *S. tuberosum* DM v.6.1 (Pham et al., 2020), *S. bulbocastanum* (Tang et al., 2022), *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom v.1.2.1 (Kudo et al., 2017), *Arabidopsis thaliana* Araport11 от 2022-09-14 (Cheng et al., 2017).

Идентификация рецепторподобных киназ в протеомах и их классификация по семействам выполнены с помощью iTAK v. 1.2 (Zheng et al., 2016). Устранение избыточности последовательностей проведено с применением алгоритма easy-cluster в составе программы MMseqs2 (Steinegger, Söding, 2017). Для выравнивания аминокислотных последовательностей киназных доменов задействован веб-сервис MAFFT (Rozewicki et al., 2019), для коррекции выравнивания – Jalview 2.11.2.7 (Waterhouse et al., 2009). Дендрограмма максимального правдоподобия построена с помощью ITREE v. 2.1.3 на основе модели Edge-linked partition (von Haeseler et al., 2015; Chernomor et al., 2016), а графическая визуализация проведена с использованием сервиса iTOL 6.8 (Letunic, Bork, 2021).

Вirus-индуцированный сайленсинг генов (ВИГС) на растениях *N. benthamiana* осуществляли с помощью вектора TRV2 по методике Y. Liu с коллегами (2002). Тест сверхчувствительности выполняли через 40 дней после

индукции ВИГС, для чего листья растений инфильтровали с применением шприца без иглы суспензиями клеток штаммов *Pve* в 0.85 % NaCl плотностью 1.5×10^8 клеток/мл. Инфильтрации всеми видами суспензий и раствором NaCl было подвергнуто не менее 10 растений каждого вида. На каждый вид суспензии и раствора NaCl приходилось по два и более листа на одно растение. Учет результатов и отбор образцов проводили через 24 ч после заражения.

ОТ-кПЦР. Образцы листьев *N. benthamiana* отбирали через 24 ч после их инфильтрации (как описано выше) суспензиями клеток *Pve*. Инокуляцию клубней картофеля выполняли с применением автоматической пипетки суспензиями такой же плотности (1.5×10^8 клеток/мл) в объеме 10 мкл. Образцы тканей картофеля отбирали на границе зоны мацерации через 48 ч после инокуляции. Выделение РНК и ОТ-кПЦР осуществляли в шести биологических повторностях, как описано в работе (Николайчик и др., 2009). Уровни экспрессии генов определяли с помощью ОТ-кПЦР относительно референсных генов *CAC*, *EF1A*, *TBP* для *N. benthamiana* и *SAND*, *CAC*, *EF1a* – для *S. tuberosum* с использованием программы REST2009 2.0.13 (QuiaGen, США).

Результаты

Филогенетический анализ выделяет четкие структурно-функциональные подгруппы в пределах LRR-RLKIII

Поскольку все известные RLK, взаимодействующие с AvrE-подобными эффекторами, принадлежат к семейству LRR-RLKIII, мы проанализировали спектр RLK этого семейства у различных представителей семейства Пасленовые и сравнили их с охарактеризованными LRR-RLKIII (большинство из *A. thaliana*). Классификатор iTAK относит к LRR-RLKIII от 45 до 77 RLK у разных видов пасленовых и 47 RLK у *A. thaliana* (см. таблицу), что оставляет много вариантов для поиска потенциальных рецепторов, задействованных в регуляции иммунитета и детекции фитопатогенов, в том числе и *Pve*.

Филогенетический анализ позволил выделить девять кластеров родственных LRR-RLKIII (рис. 1). Для RLK из кластеров I–V, а также VIII опубликованная информация не показывает связи с иммунитетом. В трех оставшихся кластерах, VI, VII и IX, присутствовали киназы, способные связываться с AvrE-подобными эффекторными белками, однако связь с иммунитетом продемонстрирована только для представителей кластеров VII и IX. Более подробная информация по экспериментально охарактеризованным LRR-RLKIII приведена в табл. S2.

Идентификация новой DspE-взаимодействующей LRR-RLKIII у *S. bulbocastanum*

На сегодня среди генов DspE-взаимодействующих RLK не обнаружено генов *R*-типа, т.е. генов устойчивости, а связанные с иммунитетом *mdRLK4*, *slTARK1*, *nbEIR1* и *ntRLK2* можно классифицировать как *S*-гены. Однако как минимум один явный *R*-ген этого семейства (*RLK902 A. thaliana*, необходимый для устойчивости к *Hyaloperonospora arabidopsidis*), в литературе описан (ten Hove et al., 2011), что предполагает возможность выявления в

¹ Табл. S1 и S2 Приложения см. по адресу:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx19.pdf>

Количественный анализ RLK у растений семейства Solanaceae

Вид	Общее число RLK	Число классов RLK по классификатору iTAK	Ранг LRR-RLKIII среди других классов по числу в геноме	Число представителей LRR-RLKIII
<i>Capsicum annuum</i> var. <i>glabrisculum</i>	1151	121	III	59
<i>S. melongena</i>	1189	123	VI	45
<i>S. bulbocastanum</i>	1892	123	VI	69
<i>S. tuberosum</i>	1328	124	VII	46
<i>S. lycopersicum</i> cv. Heinz	1020	123	III	45
<i>S. lycopersicum</i> cv. Micro-Tom	2073	123	VIII	61
<i>N. benthamiana</i>	1329	123	IV	77
<i>A. thaliana</i>	1028	123	III	47

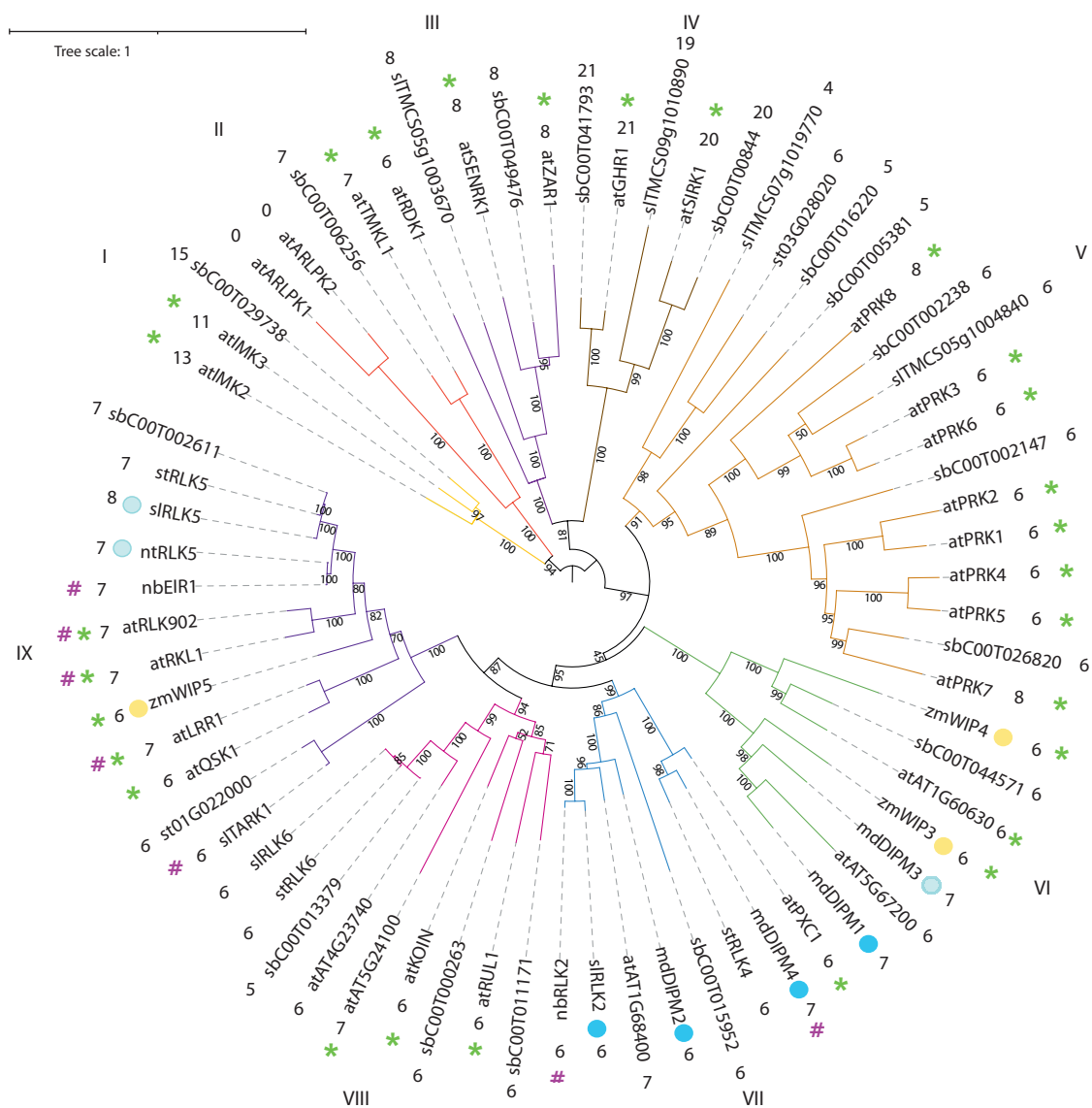


Рис. 1. Дендрограмма представителей семейства LRR-RLKIII. Используются последовательности только киназных доменов. Видовая принадлежность указана двухбуквенными индексами: at – *A. thaliana*, md – *Malus × domestica*, nb – *N. benthamiana*, nt – *N. tabacum*, sb – *S. bulbocastanum*, sl – *S. lycopersicum*, st – *S. tuberosum*, zm – *Z. mays*. Кластеры похожих RLK выделены цветом и обозначены римскими цифрами. LRR-RLK, взаимодействующие с эффекторами AvrE-семейства (DspA/E, WtsE), отмечены кружками, интенсивность закрашивания которых пропорциональна интенсивности взаимодействия, а цвет (голубой или желтый) указывает на наличие либо отсутствие blue-white теста. Цифры рядом с идентификаторами показывают число богатых лейцином повторов (LRR) в сенсорной части белка. Экспериментально исследованные LRR-RLK отмечены «*» при их участии в регуляции роста и развития и/или «#» при участии в контроле иммунитета.

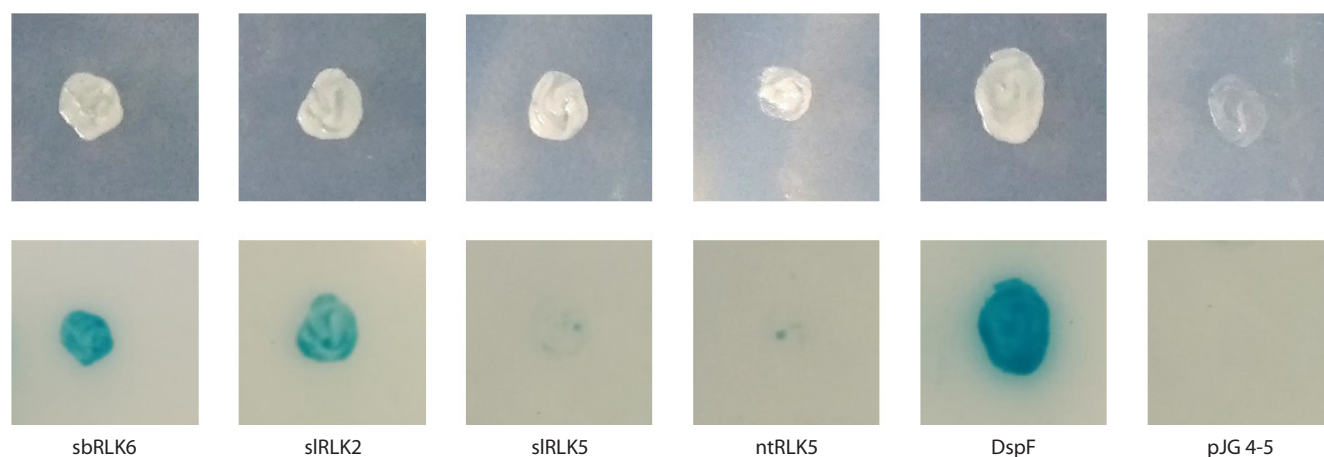


Рис. 2. Взаимодействие эффекторного белка DspE с киназными доменами RLK. Рост диплоидов на среде без лейцина с X-gal.

Все клетки содержат плазмиды pJK202-DspE, pDR8 с *lacZ*, а также производные плазмиды pJG4-5 с инсерцией рамки считывания указанного гена.

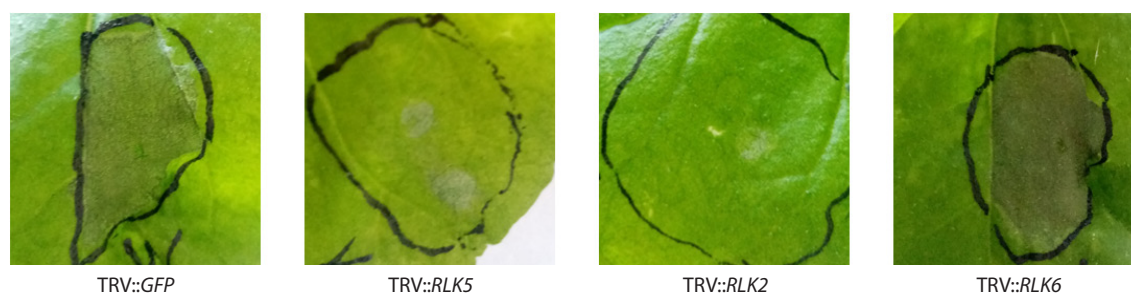


Рис. 3. Реакция сверхчувствительности растений *N. benthamiana*, подвергнутых сайленсингу генов RLK.

В качестве контроля использованы растения, инфицированные TRV с нейтральной вставкой (*GFP*).

этом семействе генов устойчивости и к другим патогенам. RLK с четко доказанной ролью в обеспечении иммунитета (в том числе и взаимодействующие с эффекторами AvrE-типа) присутствуют только в кластерах VII и IX. Связь с иммунитетом DspE/WtsE-взаимодействующих RLK из кластера VI пока не показана, однако представляется возможной. Наиболее близки к этим кластерам представители кластера VIII, в котором, однако, DspE-взаимодействующих киназ пока не обнаружено. В рамках настоящей работы для экспериментального анализа был выбран ген VIII кластера *C00T013379* из *S. bulbocastanum* — растения-источника *R*-генов, пригодного для использования в селекции культурного картофеля.

Клонированный в векторе pJG4-5 фрагмент *C00T013379*, кодирующий цитоплазматическую часть RLK, дал положительный результат в тесте взаимодействия с DspE в дрожевой двухгибридной системе (рис. 2). Судя по интенсивности роста и окраски дрожжевых макроколоний на селективной среде, взаимодействие DspE с киназными доменами, амплифицированными из *S. bulbocastanum*, было на уровне slRLK2 и положительного контроля (DspF) и значительно превышало интенсивность взаимодействия с slRLK5 и ntRLK5 (ортологами nbEIR1). По аналогии с охарактеризованными ранее LRR-RLKIII мы обозначили этот ген как *sbRLK6*.

Сайленсинг ортолога *sbRLK6* у *N. benthamiana*, в отличие от сайленсинга *nbRLK2* и *nbRLK5*, не повлиял на интенсивность сверхчувствительной реакции при инфильтрации листьев суспензией клеток *Pve* JN42 (рис. 3).

***P. versatile* подавляет экспрессию генов LRR-RLK растений**

Чтобы получить представление о последствиях распознавания DspE с помощью LRR-RLKIII, мы оценили уровни экспрессии основных маркерных генов иммунитета как в растениях-хозяевах (*S. tuberosum*), так и в растениях-нехозяевах (*N. benthamiana*). Радикальные изменения наблюдались для генов салицилатной и жасмонатной сигнализации, а также для генов, описываемых RLK (рис. 4).

В инфицированных *Pve* растениях *N. benthamiana* была существенно снижена экспрессия салицилат-зависимых генов *PR1A* и *SIPK* (см. рис. 4, а). Напротив, ген жасмонат-зависимого транскрипционного активатора *JAZ3* был индуцирован, в то время как ген ингибитора этого пути *COI1* был репрессирован, а маркерные гены *WIPK* и *PR3* были сильно индуцированы. Важно отметить, что как подавление, так и индукция этих генов зависели от DspE, поскольку реакция растений на инокуляцию мутантными бактериями *dspE* была намного слабее. Подобное DspE-зависимое подавление маркера салицилатного пути

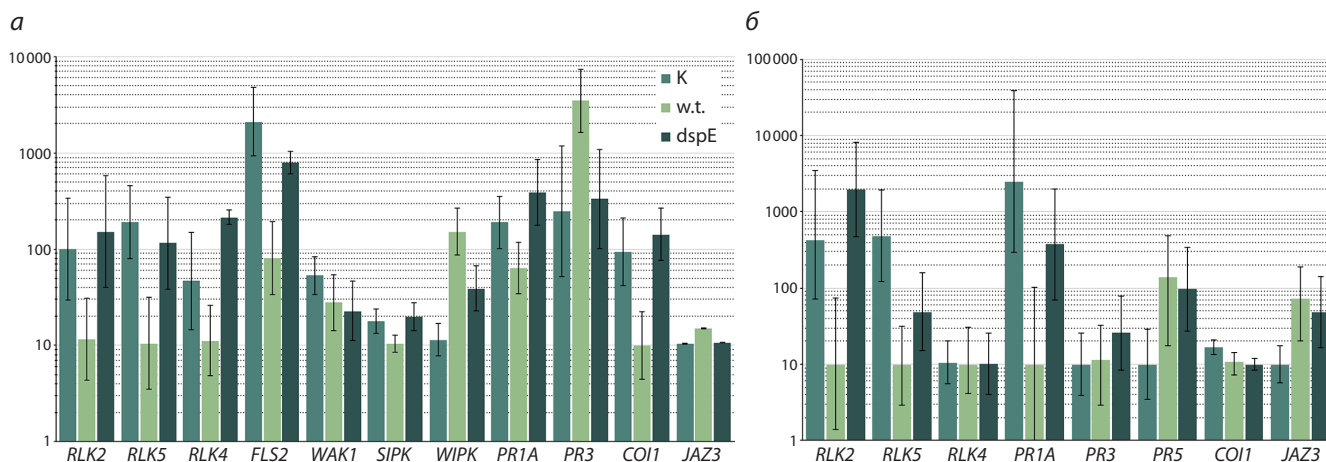


Рис. 4. Изменения уровней экспрессии генов растений *N. benthamiana* (а) и *S. tuberosum* (б), инокулированных суспензиями *Pve* дикого типа (w. t.) и мутантными по гену *dspE* (*dspE*) или 0.85 % раствором NaCl (K).

Приведены средние значения (в условных единицах) шести измерений с 95 % доверительными интервалами.

PR1A наблюдалось в растениях картофеля, инфицированных *Pve* (см. рис. 4, б). Гены жасмонатного сигнального пути были активированы, но эффект был гораздо менее выражен и не зависел от *DspE*.

Экспрессия ортологов *RLK2* и *RLK5* в обоих растениях и *RLK4* в *N. benthamiana* также снижалась в *DspE*-зависимой манере (очень низкий уровень экспрессии *stRLK6* не позволил оценить его изменение) (см. рис. 4, б).

Чтобы увидеть, насколько типична наблюдаемая картина экспрессии во время заражения *Pve*, мы проверили у *N. benthamiana* экспрессию двух хорошо изученных генов RLK других семейств: *FLS2*, кодирующего рецептор флагеллина, и *WAK1*, кодирующего связанную с клеточной стенкой киназу, участвующую в восприятии олигогалактуроната. *FLS2* реагировал на контакт с *Pve* дикого типа и *dspE*-мутантом аналогично *RLK2* и *RLK5* (см. рис. 4, а). *WAK1* в зараженных *Pve* растениях продемонстрировал едва заметную (примерно двукратную), но воспроизводимую в повторных экспериментах супрессию, независимую от *DspE*.

Обсуждение

Выполненный в настоящей работе филогенетический анализ позволил разделить LRR-RLKIII на две четкие функциональные группы. Несмотря на отсутствие детальной информации по каждому корецептору, можно заключить, что представители кластеров I–V в основном участвуют в контроле роста и развития растений, тогда как кластеры VI–IX обогащены RLK, связанными с контролем иммунных реакций. Большинство LRR-RLKIII, включая все взаимодействующие с *DspE*, лишены ключевого остатка аспартата в составе консервативного мотива каталитической петли (HRDXXXXN) и поэтому классифицируются как псевдокиназы. Однако многие псевдокиназы сохраняют некоторую киназную активность и способны выполнять функции рецепторов как часть рецепторных комплексов, содержащих активную киназу (Rodriguez-Furlan et al., 2022). Кроме того, LRR-RLKIII в основном имеют малое (5–7) число лейцин-богатых повторов в сенсорной части

и поэтому могут выполнять свою сигнальную функцию только в составе сложных рецепторных комплексов, которые должны содержать два дополнительных критичных компонента, киназу и рецептор (или рецепторподобный белок), с полным набором (более 10, обычно около 20) лейцин-богатых повторов.

Известные белки, взаимодействующие с *DspE*, относятся к кластерам VI, VII и IX. Среди них роль в распознавании патогенов была четко установлена для четырех белков: *mdDIPM4* и *nbRLK2* (кластер VII), а также *ntRLK5* и *nbEIR1* (кластер IX). Во всех этих случаях подавление гена RLK увеличивало устойчивость растения (Borejsza-Wysocka et al., 2006; Николайчик и др., 2012; Бадалян, Николайчик, 2014; Pompili et al., 2020). На основании этих результатов *mdDIPM4*, *nbRLK2* и *nbEIR1* можно считать *S*-генами. Однако следует отметить, что из-за перекрестной регуляции экспрессии генов RLK, зарегистрированной как у яблони (Borejsza-Wysocka et al., 2006), так и у табака (Бадалян, Николайчик, 2014), наблюдаемый фенотип не может быть однозначно связан с подавленным геном. Другой член кластера IX, *TARK1*, также является *S*-геном, поскольку его сверхэкспрессия усиливает, а инактивация ослабляет симптомы заболевания (Kim J.-G. et al., 2009; Campos, 2020; Guzman et al., 2020).

Впервые описанный в настоящей работе ген *sbRLK6* кодирует LRR-RLKIII, принадлежащую к кластеру VIII, в котором ранее *DspE*-взаимодействующие RLK не были описаны. Сайленсинг ортолога *sbRLK6* у растений *N. benthamiana* не привел (в отличие от сайленсинга *RLK2* и *RLK5*) к ослаблению сверхчувствительной реакции растений при контакте с бактериями *Pve*. Для некротрофов (включая *Pve*) некроз, сопровождающий сверхчувствительную реакцию, благоприятен для расширения зоны поражения и дальнейшей колонизации растения, поэтому мы классифицируем *RLK2* и *RLK5* как *S*-гены, однако очевидно, что на сегодняшний день считать *sbRLK6* *S*-геном нельзя. Ответ на вопрос о том, может ли *RLK6* выполнять функцию *R*-гена, требует его стабильной инактивации или сверхэкспрессии с последующим тестированием устойчи-

вости растений при заражении органов (клубни и стебли), являющихся типичными мишенями пектобактерий, но мало подходящих для использованной технологии вирус-индуцированного сайленсинга.

Поскольку гены корецепторподобных киназ RLK2, RLK5 и впервые описанной в настоящей работе RLK6 имеют картину экспрессии во время заражения *Pve*, похожую на картину экспрессии гена рецептора распознавания образов *FLS2*, а экспрессия всех четырех генов демонстрирует признаки общего контроля через салицилатный сигнальный путь, можно предположить, что взаимодействующие с DspE LRR-RLKIII являются компонентами сложных рецепторных комплексов, участвующих в обнаружении *Pve*. Другие компоненты таких комплексов, а также взаимодействующие с ними цитоплазматические сигнальные белки могут рассматриваться как перспективные кандидаты для обнаружения генов устойчивости к *Pve* и другим бактериям.

Заключение

До настоящего времени специфические гены устойчивости к *Pectobacterium* spp. не описаны, а адресная селекция картофеля на устойчивость к пектобактериозам не проводится, не в последнюю очередь из-за отсутствия информации об *R*-генах, способных обеспечить такую устойчивость. Мы предлагаем использовать рецепторные протеинкиназы подсемейства RLK-LRRIII, специфически распознающие основной эффекторный белок пектобактерий DspE. В качестве первого шага по этому пути в настоящей работе собрана информация об экспериментально изученных представителях данного семейства, намечены перспективные для поиска кластеры, а также идентифицирована новая рецепторподобная киназа, специфически распознающая DspE и имеющая отличные от описанных ранее свойства.

Список литературы / References

- Бадалян О.А., Николайчик Е.А. Рецепторподобные киназы RLK2 и RLK5 *Nicotiana benthamiana* участвуют в регуляции экспрессии генов ключевых компонентов иммунной системы растения при контакте с *Pectobacterium carotovorum*. *Известия НАН Беларуси. Серия биологических наук*. 2014;4:75-80
- [Badalyan O.A., Nikolaichik Y.A. Receptor-like kinases RLK2 and RLK5 of *Nicotiana benthamiana* are involved in regulation of gene expression of key plant immune system components during the contact with *Pectobacterium carotovorum*. *Izvestiya NAN Belarusi. Seriya Biologicheskikh Nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series*. 2014;4:75-80 (in Russian)]
- Валентович Л.Н., Губич О.И., Николайчик Е.А. Роль белка DspF *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* в работе системы секреции III типа. *Доклады НАН Беларуси*. 2008;52(5):79-85
- [Valentovich L.N., Gubich O.I., Nikolaichik Y.A. The role of the DspF protein of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in the functioning of the type III secretion system. *Doklady Nacional'noj Akademii Nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*. 2008;52(5):79-85 (in Russian)]
- Кузьмич С.В., Бадалян О.А., Николайчик Е.А. Анализ индукции и супрессии МАМР-индуцируемого иммунитета растений *Nicotiana benthamiana* при контакте с *Pectobacterium atrosepticum*. *Вестник БГУ. Серия 2: Химия. Биология. География*. 2014;(2): 36-40
- [Kuzmich S.V., Badalyan O.A., Nikolaychik E.A. Analysis of induction and suppression of MAMP-induced immunity of *Nicotiana benthamiana* plants upon contact with *Pectobacterium atrosepticum*. *Vestnik Belorusskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Seriya 2: Khimiya. Biologiya. Geografiya = Bulletin of the Belarusian State University. Series 2: Chemistry, Biology, Geography*. 2014;(2):36-40.
- Николайчик Е.А. Системная индукция PR-генов растений *Solanum lycopersicum* при контакте с бактериями *Pectobacterium carotovorum*: роль гена *DspE*. *Труды БГУ*. 2009;4(2):215-220
- [Nikolaichik Y.A. Systemic induction of PR genes in *Solanum lycopersicum* plants upon contact with *Pectobacterium carotovorum* bacteria: the role of the *DspE* gene. *Trudy Belorusskogo Gosudarstvennogo Universiteta = Proceedings of the Belarusian State University*. 2009;4(2):215-220 (in Russian)]
- Николайчик Е.А., Овчинникова Т.В., Валентович Л.Н., Губич О.И., Шолух М.В., Евтушенков А.Н. Транслокация белка DspE фитопатогенными бактериями *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* в клетки *Nicotiana tabacum* и его необходимость для индукции реакции гиперчувствительности. *Доклады НАН Беларуси*. 2005;49(5):81-85
- [Nikolaichik Y.A., Ovchinnikova T.V., Valentovich L.N., Gubich O.I., Sholukh M.V., Evtushenkov A.N. DspE protein is translocated by phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* into the cells of *Nicotiana tabacum* and is required for the induction of the hypersensitive reaction. *Doklady Nacional'noj Akademii Nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*. 2005;49(5):81-85 (in Russian)]
- Николайчик Е.А., Хомская Л.Л., Игнатенко Е.И. Фитопатоген *Pectobacterium carotovorum* использует аппарат секреции III типа для блокирования системного защитного ответа растения-хозяина. *Труды БГУ*. 2009;4(1):193-200
- [Nikolaichik Y.A., Homskaya L.L., Ignatenko E.I. The plant pathogen *Pectobacterium carotovorum* employs its Type III secretion system for blocking the systemic defense response in the host plant. *Trudy Belorusskogo Gosudarstvennogo Universiteta = Proceedings of the Belarusian State University*. 2009;4(1):193-200 (in Russian)]
- Николайчик Е.А., Кулик Е.В., Бадалян О.А., Валентович Л.Н., Кузьмич С.В., Евтушенков А.Н. Роль рецепторноподобной трансмембранной киназы растений семейства пасленовых во взаимодействии с фитопатогеном *Pectobacterium carotovorum*. *Доклады НАН Беларуси*. 2012;56(1):106-112
- [Nikolaichik Y.A., Kulik E.V., Badalyan O.A., Valentovich L.N., Kuzmich S.V., Evtushenkov A.N. Receptor-like transmembrane kinase of Solanaceae plants controls interaction with plant pathogen *Pectobacterium carotovorum*. *Doklady Nacional'noj Akademii Nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*. 2012;56(1):106-112 (in Russian)]
- Скобляков С.А., Мямин В.Е., Лагоненко А.Л., Николайчик Е.А., Песнякевич А.Г. Влияние мутаций в генах *pelW* и *kdgR* на продукцию пектатлиаз у *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Вестник БГУ. Серия 2: Химия. Биология. География*. 2004;(2):40-44
- [Skoblyakov S.A., Miamin V.E., Lagonenko A.L., Nikolaichik Y.A., Pesnyakevich A.G. The effect of mutations in the *pelW* and *kdgR* genes on the production of pectate lyases in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Vestnik Belorusskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Seriya 2: Khimiya. Biologiya. Geografiya = Bulletin of the Belarusian State University. Series 2: Chemistry, Biology, Geography*. 2004;(2):40-44 (in Russian)]
- Bentham A.R., De la Concepcion J.C., Mukhi N., Zdrzałek R., Draeger M., Gorenkin D., Hughes R.K., Banfield M.J. A molecular roadmap to the plant immune system. *J Biol Chem*. 2020;295(44): 14916-14935. doi 10.1074/jbc.REV120.010852
- Böhm H., Albert I., Fan L., Reinhard A., Nürnberger T. Immune receptor complexes at the plant cell surface. *Curr Opin Plant Biol*. 2014;20:47-54. doi 10.1016/j.pbi.2014.04.007

- Borejsza-Wysocka E.E., Malnoy M., Aldwinckle H.S., Meng X., Bonasera J.M., Nissinen R.M., Kim J.F., Beer S.V. The fire blight resistance of apple clones in which DspE-interacting proteins are silenced. *Acta Hort.* 2006;704:509-514. doi 10.17660/ActaHortic.2006.704.80
- Campos M.L. A novel regulator of stomatal immunity in tomato. *Plant Physiol.* 2020;183(3):820-821. doi 10.1104/pp.20.00655
- Chakraborty S., Nguyen B., Wasti S.D., Xu G. Plant leucine-rich repeat receptor kinase (LRR-RLK): structure, ligand perception, and activation mechanism. *Molecules.* 2019;24(17):3081. doi 10.3390/molecules24173081
- Chatterjee A., Cui Y., Liu Y., Dumenyo C.K., Chatterjee A.K. Inactivation of *rsmA* leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases, and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, N-(3-oxo-hexanoyl)-L-homoserine lactone. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61(5):1959-1967. doi 10.1128/aem.61.5.1959-1967.1995
- Cheng C.-Y., Krishnakumar V., Chan A.P., Thibaud-Nissen F., Schobel S., Town C.D. Arabidopsis11: a complete reannotation of the *Arabidopsis thaliana* reference genome. *Plant J.* 2017;89(4):789-804. doi 10.1111/tj.13415
- Chernomor O., von Haeseler A., Minh B.Q. Terrace aware data structure for phylogenomic inference from supermatrices. *Syst Biol.* 2016;65(6):997-1008. doi 10.1093/sysbio/syw037
- Couto D., Zipfel C. Regulation of pattern recognition receptor signaling in plants. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(9):537-552. doi 10.1038/nri.2016.77
- Degrave A., Siamer S., Boureau T., Barny M.-A. The AvrE superfamily: ancestral type III effectors involved in suppression of pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity. *Mol Plant Pathol.* 2015;16(8):899-905. doi 10.1111/mpp.12237
- Dievart A., Gottin C., Périn C., Ranwez V., Chantret N. Origin and diversity of plant receptor-like kinases. *Annu Rev Plant Biol.* 2020;71: 131-156. doi 10.1146/annurev-arplant-073019-025927
- Frederick R.D., Ahmad M., Majerczak D.R., Arroyo-Rodríguez A.S., Manulis S., Coplin D.L. Genetic organization of the *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* *hrp* gene cluster and sequence analysis of the *hrpA*, *hrpC*, *hrpN*, and *wisE* operons. *Mol Plant Microbe Interact.* 2001;14(10):1213-1222. doi 10.1094/MPMI.2001.14.10.1213
- Gaudriault S., Malandrin L., Paulin J.-P., Barny M.-A. DspA, an essential pathogenicity factor of *Erwinia amylovora* showing homology with AvrE of *Pseudomonas syringae*, is secreted via the Hrp secretion pathway in a DspB-dependent way. *Mol Microbiol.* 1997; 26(5):1057-1069. doi 10.1046/j.1365-2958.1997.6442015.x
- Giraldo M.C., Valent B. Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(11):800-814. doi 10.1038/nrmicro.3119
- Gómez-Gómez L., Boller T. FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell.* 2000;5(6):1003-1011. doi 10.1016/S1097-2765(00)80265-8
- Gorshkov V., Gubaev R., Petrova O., Daminova A., Gogoleva N., Ageeva M., Parfirova O., Prokhorchik M., Nikolaichik Y., Gogolev Y. Transcriptome profiling helps to identify potential and true molecular switches of stealth to brute force behavior in *Pectobacterium atrosepticum* during systemic colonization of tobacco plants. *Eur J Plant Pathol.* 2018;152(4):957-976. doi 10.1007/s10658-018-1496-6
- Guzman A.R., Kim J.-G., Taylor K.W., Lanver D., Mudgett M.B. Tomato atypical receptor kinase1 is involved in the regulation of preinvasion defense. *Plant Physiol.* 2020;183(3):1306-1318. doi 10.1104/pp.19.01400
- Huang W.R.H., Joosten M.H.A.J. Immune signaling: receptor-like proteins make the difference. *Trends Plant Sci.* 2025;30(1):54-68. doi 10.1016/j.tplants.2024.03.012
- Jin L., Ham J.H., Hage R., Zhao W., Soto-Hernández J., Lee S.Y., Paek S.-M., Kim M.G., Boone C., Coplin D.L., Mackey D. Direct and indirect targeting of PP2A by conserved bacterial type-III effector proteins. *PLoS Pathog.* 2016;12(5):e1005609. doi 10.1371/journal.ppat.1005609
- Jones J.D.G., Dangl J.L. The plant immune system. *Nature.* 2006; 444(7117):323-329. doi 10.1038/nature05286
- Kawaharada Y., Kelly S., Nielsen M.W., Hjuler C.T., Gysel K., Muszyński A., Carlson R.W., ... Jensen K.J., Ronson C.W., Blaise M., Radutoiu S., Stougaard J. Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature.* 2015;523(7560): 308-312. doi 10.1038/nature14611
- Kim J.-G., Li X., Roden J.A., Taylor K.W., Aakre C.D., Su B., Lalonde S., Kirik A., Chen Y., Baranage G., McLane H., Martin G.B., Mudgett M.B. *Xanthomonas* T3S effector XopN suppresses PAMP-triggered immunity and interacts with a tomato atypical receptor-like kinase and TPT1. *Plant Cell.* 2009;21(4):1305-1323. doi 10.1105/tpc.108.063123
- Kim H.-S., Thammarat P., Lommel S.A., Hogan C.S., Charkowski A.O. *Pectobacterium carotovorum* elicits plant cell death with DspE/F but the *P. carotovorum* DspE does not suppress callose or induce expression of plant genes early in plant-microbe interactions. *Mol Plant Microbe Interact.* 2011;24(7):773-786. doi 10.1094/MPMI-06-10-0143
- Kravchenko U., Gogoleva N., Kalubaka N., Kruk A., Diubo Y., Gogolev Y., Nikolaichik Y. The PhoPQ two-component system is the major regulator of cell surface properties, stress responses and plant-derived substrate utilisation during development of *Pectobacterium versatile*-host plant pathosystems. *Front Microbiol.* 2021;11: 621391. doi 10.3389/fmicb.2020.621391
- Kröner A., Hamelin G., Andrivon D., Val F. Quantitative resistance of potato to *Pectobacterium atrosepticum* and *Phytophthora infestans*: Integrating PAMP-triggered response and pathogen growth. *PLoS One.* 2011;6(8):e23331. doi 10.1371/journal.pone.0023331
- Kudo T., Kobayashi M., Terashima S., Katayama M., Ozaki S., Kanno M., Saito M., Yokoyama K., Ohyanagi H., Aoki K., Kubo Y., Yano K. TOMATOMICs: a web database for integrated omics information in tomato. *Plant Cell Physiol.* 2017;58(1):e8. doi 10.1093/pcp/pcw207
- Kutschera A., Dawid C., Gisch N., Schmid C., Raasch L., Gerster T., Schäffer M., ... Ernst R.K., Dorey S., Hückelhoven R., Hofmann T., Ranf S. Bacterial medium-chain 3-hydroxy fatty acid metabolites trigger immunity in *Arabidopsis* plants. *Science.* 2019;364(6436): 178-181. doi 10.1126/science.aau1279
- Kwenda S., Motlolometsi T.V., Birch P.R.J., Moleleki L.N. RNA-seq profiling reveals defense responses in a tolerant potato cultivar to stem infection by *Pectobacterium carotovorum* ssp. *brasiliense*. *Front Plant Sci.* 2016;7:1905. doi 10.3389/fpls.2016.01905
- Letunic I., Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(W1):W293-W296. doi 10.1093/nar/gkab301
- Liu H., Coulthurst S.J., Pritchard L., Hedley P.E., Ravensdale M., Humphris S., Burr T., Takle G., Brurberg M.-B., Birch P.R.J., Salmond G.P.C., Toth I.K. Quorum sensing coordinates brute force and stealth modes of infection in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *PLoS Pathog.* 2008;4(6):e1000093. doi 10.1371/journal.ppat.1000093
- Liu Y., Jiang G., Cui Y., Mukherjee A., Ma W.L., Chatterjee A.K. *kdgR_{Ecc}* negatively regulates genes for pectinases, cellulase, protease, Harpin_{Ecc}, and a global RNA regulator in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *J Bacteriol.* 1999;181(8):2411-2421. doi 10.1128/jb.181.8.2411-2421.1999
- Liu Y., Schiff M., Dinesh-Kumar S.P. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J.* 2002;31(6):777-786. doi 10.1046/j.1365-313X.2002.01394.x
- Macho A.P., Zipfel C. Targeting of plant pattern recognition receptor-triggered immunity by bacterial type-III secretion system effectors. *Curr Opin Microbiol.* 2015;23:14-22. doi 10.1016/j.mib.2014.10.009
- Meng X., Bonasera J.M., Kim J.F., Nissinen R.M., Beer S.V. Apple proteins that interact with DspA/E, a pathogenicity effector of *Erwinia*

- amylovora*, the fire blight pathogen. *Mol Plant Microbe Interact.* 2006;19(1):53-61. doi 10.1094/MPMI-19-0053
- Mor H., Manulis S., Zuck M., Nizan R., Coplin D.L., Barash I. Genetic organization of the *hrp* gene cluster and *dspAE/BF* operon in *Erwinia herbicola* pv. *gypsophylae*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2001; 14(3):431-436. doi 10.1094/MPMI.2001.14.3.431
- Navarro L., Zipfel C., Rowland O., Keller I., Robatzek S., Boller T., Jones J.D.G. The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol.* 2004;135(2):1113-1128. doi 10.1104/pp.103.036749
- Pérombelon M.C.M. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathol.* 2002;51(1):1-12. doi 10.1046/j.0032-0862.2001.Shorttitle.doc.x
- Pham G.M., Hamilton J.P., Wood J.C., Burke J.T., Zhao H., Vaillancourt B., Ou S., Jiang J., Buell C.R. Construction of a chromosome-scale long-read reference genome assembly for potato. *GigaScience.* 2020;9(9):giaa100. doi 10.1093/gigascience/giaa100
- Pompili V., Dalla Costa L., Piazza S., Pindo M., Malnoy M. Reduced fire blight susceptibility in apple cultivars using a high-efficiency CRISPR/Cas9-FLP/FRT-based gene editing system. *Plant Biotechnol J.* 2020;18(3):845-858. doi 10.1111/pbi.13253
- Qi Y., Tsuda K., Nguyen L.V., Wang X., Lin J., Murphy A.S., Glazebrook J., Thordal-Christensen H., Katagiri F. Physical association of *Arabidopsis* hypersensitive induced reaction proteins (HIRs) with the immune receptor RPS2. *J Biol Chem.* 2011;286(36):31297-31307. doi 10.1074/jbc.M110.211615
- Rodriguez-Furlan C., Campos R., Toth J.N., Van Norman J.M. Distinct mechanisms orchestrate the contra-polarity of IRK and KOIN, two LRR-receptor-kinases controlling root cell division. *Nat Commun.* 2022;13(1):235. doi 10.1038/s41467-021-27913-1
- Rooney H.C., Van't Klooster J.W., van der Hoorn R.A., Joosten M.H., Jones J.D., de Wit P.J. Cladosporium Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science.* 2005; 308(5729):1783-1786. doi 10.1126/science.1111404
- Rozewicki J., Li S., Amada K.M., Standley D.M., Katoh K. MAFFT-DASH: integrated protein sequence and structural alignment. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(W1):W5-W10. doi 10.1093/nar/gkz342
- Serebriiskii I.G., Golemis E.A., Uetz P. The yeast two-hybrid system for detecting interacting proteins. In: Walker J.M. (Ed.) The Proteomics Protocols Handbook. Springer Protocols Handbooks. Humana Press, 2005;653-682. doi 10.1385/1-59259-890-0:653
- Shiu S.-H., Bleecker A.B. Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2003;132(2):530-543. doi 10.1104/pp.103.021964
- Steinberger M., Söding J. MMseqs2 enables sensitive protein sequence searching for the analysis of massive data sets. *Nat Biotechnol.* 2017;35(11):1026-1028. doi 10.1038/nbt.3988
- Sun L., Zhang J. Regulatory role of receptor-like cytoplasmic kinases in early immune signaling events in plants. *FEMS Microbiol Rev.* 2020;44(6):845-856. doi 10.1093/femsre/fuaa035
- Tang D., Jia Y., Zhang J., Li H., Cheng L., Wang P., Bao Z., Liu Z., Feng S., Zhu X., Li D., Zhu G., Wang H., Zhou Ya., Zhou Yo., Bryan G.J., Buell C.R., Zhang C., Huang S. Genome evolution and diversity of wild and cultivated potatoes. *Nature.* 2022;606(7914): 535-541. doi 10.1038/s41586-022-04822-x
- ten Hove C.A., de Jong M., Lapin D., Andel A., Sanchez-Perez G.F., Tarutani Y., Suzuki Y., Heidstra R., van den Ackerveken G. Trans-repression of gene activity upstream of T-DNA tagged *RLK902* links *Arabidopsis* root growth inhibition and downy mildew resistance. *PLoS One.* 2011;6(4):e19028. doi 10.1371/journal.pone.0019028
- Thomma B.P., Nürnberger T., Joosten M.H. Of PAMPs and effectors: The blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell.* 2011;23(1):4-15. doi 10.1105/tpc.110.082602
- Toth I.K., Birch P.R. Rotting softly and stealthily. *Curr Opin Plant Biol.* 2005;8(4):424-429. doi 10.1016/j.pbi.2005.04.001
- von Haeseler A., Schmidt H.A., Bui M.Q., Nguyen L.T. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol.* 2015;32(1):268-274. doi 10.1093/molbev/msu300
- Waterhouse A.M., Procter J.B., Martin D.M.A., Clamp M., Barton G.J. Jalview Version 2 – a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics.* 2009;25(9):1189-1191. doi 10.1093/bioinformatics/btp033
- Willmann R., Lajunen H.M., Erbs G., Newman M.-A., Kolb D., Tsuda K., Katagiri F., ... Kulik A., Molinaro A., Lipka V., Gust A.A., Nürnberger T. *Arabidopsis* lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(49):19824-19829. doi 10.1073/pnas.1112862108
- Yuan M., Ngou B.P.M., Ding P., Xin X.-F. PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. *Curr Opin Plant Biol.* 2021;62: 102030. doi 10.1016/j.pbi.2021.102030
- Zhang S., Li C., Si J., Han Z., Chen D. Action mechanisms of effectors in plant-pathogen interaction. *Int J Mol Sci.* 2022;23(12):6758. doi 10.3390/ijms23126758
- Zhao Y., Wu G., Shi H., Tang D. RECEPTOR-LIKE KINASE 902 associates with and Phosphorylates BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE1 to regulate plant immunity. *Mol Plant.* 2019; 12(1):59-70. doi 10.1016/j.molp.2018.10.008
- Zheng Y., Jiao C., Sun H., Rosli H.G., Pombo M.A., Zhang P., Banf M., Dai X., Martin G.B., Giovannoni J.J., Zhao P.X., Rhee S.Y., Fei Z. iTAK: a program for genome-wide prediction and classification of plant transcription factors, transcriptional regulators, and protein kinases. *Mol Plant.* 2016;9(12):1667-1670. doi 10.1016/j.molp.2016.09.014
- Zipfel C., Kunze G., Chinchilla D., Caniard A., Jones J.D.G., Boller T., Felix G. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell.* 2006; 125(4):749-760. doi 10.1016/j.cell.2006.03.037

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 15.11.2024. После доработки 06.02.2025. Принята к публикации 10.02.2025.

doi 10.18699/vjgb-25-59

Influence of selected rootstock on growth parameters, accumulation of IAA and vitamins in scions of *Cucumis sativus* L. and *Cucumis melo* L.

A.Zh. Shoibekova ¹, S.K. Jantassov ¹, A.S. Jantassova ¹, A.T. Samatov¹, T.S. Sagindykov¹, A.N. Karimova¹, G.A. Serikbayeva¹, M.R. Toishimanov ^{1, 2}, G.T. Bari ¹ 

¹ Kazakh National Agrarian Research University, Almaty, Kazakhstan

² Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan

 baracuda.co@mail.ru

Abstract. Grafting with resistant rootstocks is one of the most effective methods to prevent soil-borne diseases, and it can influence vegetative growth, flowering, maturation periods, and fruit quality, thereby ensuring high yields. In this study, four species from the family Cucurbitaceae were tested as potential candidates for grafting cucumber and melon: *Cucurbita ficifolia* Bouché, *Cucurbita moschata* L., *Cucurbita pepo* L. and *Cucurbita maxima* Duch. The study focused on the grafting methods that optimize growth parameters and the accumulation of hormones and vitamins in rootstock. The results indicated that *Cucurbita maxima* Duch. is the most suitable rootstock material for grafting to *Cucumis sativus* L. and *Cucumis melo* L., as it exhibited superior plant and root mass. Among the two grafting methods tested, the tongue approach ('X') demonstrated the best results in terms of growth parameters and the accumulation of indole-3-acetic acid (IAA) and vitamins in the scion leaves. IAA and vitamin concentrations were measured using HPLC in grafted samples at 2, 4 and 6 weeks of age. In the 'X' method, IAA accumulation from the end of the second week was twice as high compared to control plants. This method also showed higher vitamin content, with increased levels of B vitamins and vitamin C at the end of the 4th week (25.2–135.1 and 52.3–67.0 %, respectively), and vitamins A, E, D₃, K starting from the 2nd week (1.5–2 times higher). Conversely, the insertion or slant cut grafting method ('Y') did not show any significant increase in the analyzed parameters and was comparable to the control. The 'X' method for grafting both *Cucumis sativus* L. and *Cucumis melo* L. onto *Cucurbita maxima* Duch. plants demonstrated the best results and is recommended for production.

Key words: morphometric analysis; grafting; *C. maxima*; HPLC; IAA; vitamins

For citation: Shoibekova A.Zh., Jantassov S.K., Jantassova A.S., Samatov A.T., Sagindykov T.S., Karimova A.N., Serikbayeva G.A., Toishimanov M.R., Bari G.T. Influence of selected rootstock on growth parameters, accumulation of IAA and vitamins in scions of *Cucumis sativus* L. and *Cucumis melo* L. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(4):559-567. doi 10.18699/vjgb-25-59

Funding. This research was funded by the Committee of Science of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan, grant number AP19679681.

Влияние отобранного подвоя на параметры роста, накопление ИУК и витаминов в привоях *Cucumis sativus* L. и *Cucumis melo* L.

А.Ж. Шойбекова ¹, С.К. Джантасов ¹, А.С. Джантасова ¹, А.Т. Саматов¹, Т.С. Сагиндыков¹, А.Н. Каримова¹, Г.А. Серикбаева¹, М.Р. Тойшиманов ^{1, 2}, Г.Т. Бари ¹ 

¹ Казахский национальный аграрный исследовательский университет, Алматы, Казахстан

² Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан

 baracuda.co@mail.ru

Аннотация. Прививка с помощью устойчивых подвоев – один из наиболее эффективных методов предотвращения болезней, передающихся через почву, который может влиять на вегетативный рост, цветение, периоды созревания и качество плодов, тем самым обеспечивая высокую урожайность. В настоящем исследовании четыре вида из семейства тыквенных были протестированы в качестве потенциальных кандидатов для прививки огурца и дыни: *Cucurbita ficifolia* Bouché, *Cucurbita moschata* L., *Cucurbita pepo* L. и *Cucurbita maxima* Duch. Исследование было сосредоточено на методах прививки, которые оптимизируют параметры роста и накопление гормонов и витаминов в привое. Согласно полученным результатам, отобранный вид *Cucurbita maxima* Duch. является наиболее подходящим материалом подвоя для прививки к *Cucumis sativus* L. и *Cucumis*

melo L., поскольку он показал наилучшую массу растения и корней. Среди двух протестированных методов прививки язычковый подход ('X') продемонстрировал лучшие результаты с точки зрения параметров роста, накопления индол-3-уксусной кислоты (ИУК) и витаминов в листьях привоя. Концентрации ИУК и витаминов измеряли с помощью ВЭЖХ в образцах привоя в возрасте 2, 4 и 6 недель. В методе 'X' накопление ИУК с конца второй недели было в два раза выше по сравнению с контрольными растениями. Этот метод также показал более высокое содержание витаминов, с повышенным уровнем витаминов группы В и витамина С в конце четвертой недели (25.2–135.1 и 52.3–67.0 % соответственно), а витаминов А, Е, D₃, К – начиная со второй недели (в 1.5–2 раза выше). Напротив, метод прививки вставкой или косым срезом ('Y') не показал значительного увеличения анализируемых параметров и был сопоставим с контролем. Метод прививки 'X' как для *Cucumis sativus* L., так и для *Cucumis melo* L. на растения *Cucurbita maxima* Duch. продемонстрировал наилучшие результаты и рекомендуется для производства.

Ключевые слова: морфометрический анализ; прививка; *C. maxima*; ВЭЖХ; ИУК; витамины

Introduction

Grafting cucumber and melon (as scions) onto pumpkin rootstocks is one of the most effective methods to prevent soil-borne diseases, influence vegetative growth, flowering, maturation periods, and fruit quality, thereby ensuring high yields of these crops (Mauro et al., 2022). Grafting vegetable crops is an important cultivation method in many countries where intensive and continuous cultivation is practiced (Farhadi et al., 2016), particularly in greenhouses with controlled conditions, where rootstocks can extend the fruiting period.

In global practice, rootstocks such as fig leaf gourd *Cucurbita ficifolia* Bouché (*C. ficifolia*) (El-Eslamboly, Deabes, 2014), winter squash landrace *Cucurbita moschata* L. (*C. moschata*) (Traka-Mavrona et al., 2000; Noor et al., 2019; Li X. et al., 2023), pumpkin *Cucurbita maxima* Duch. (*C. maxima*) (Farhadi et al., 2016), summer squash landrace *Cucurbita pepo* L. (*C. pepo*) (Noor et al., 2019), and combinations of *C. maxima* × *C. moschata* (Bekhradi et al., 2009; Toporek, Keinath, 2020) are used.

Scion-rootstock combinations affect pH, taste, sugar content, color, carotenoid content, fruit texture, resistance to low soil temperatures and salinity, and nutrient and water uptake. Studies have shown that RNA, proteins, and small molecules, some of which are involved in signal transduction, can move from the rootstock to the scion, directly affecting scion physiology (Mauro et al., 2022). This practice is also applied to other vegetable crops (Tsaballa et al., 2021). Such functional interdependence includes a complex relationship between the two plants, involving the exchange of water, nutrients, hormones, and other metabolites (Albacete et al., 2015).

Auxins play a central role in root formation. They induce the initiation of root primordia and influence the growth of newly formed roots. Plants produce indole-3-acetic acid (IAA) in shoot tips and young leaves, but exogenous auxin is important for successful rooting. There is no direct evidence that synthetic auxins can replace natural ones in cells, but they help in the overall accumulation of IAA in the plant, thereby promoting the formation of adventitious roots (Stefancic et al., 2007). The percentage of rooted cuttings positively correlates with the concentration of exogenous auxin, but only up to a certain point – at high concentrations, rooting stops or even decreases. Therefore, the presence of endogenous auxin in the plant is important (Stefancic et al., 2006).

The quality of the initial material plays a very important role in the formation of adventitious roots. The optimal physiological state of the initial plants can significantly improve the rooting of cuttings.

It is especially important to consider the accumulation of one of the main growth hormones, IAA (Balliu, Sallaku, 2017; Bunsangiam et al., 2021; Tang et al., 2023), in this case in scion-rootstock combinations (Noda et al., 2000; Li W. et al., 2017; Lam et al., 2020; Bantis et al., 2021) of cucumber and melon with pumpkins. In addition to resistance to biotic and abiotic factors, grafted plants need a good scion-rootstock union, rapid growth, and high productivity in a shorter time.

Moreover, the accumulation of vitamins in plants as a biochemical indicator plays a significant role (Asensi-Fabado, Munné-Bosch, 2010; Abbas et al., 2023), particularly if these are water-soluble and fat-soluble vitamins with antioxidant properties (Asensi-Fabado, Munné-Bosch, 2010). Previously, the importance of their role in plants, various organs, and sub-cellular locations, as well as their main biosynthetic pathways, were described by the authors. In this context, it is necessary to study the influence of rootstock on scion in vitamin accumulation over post-grafting periods, as such studies have not been conducted previously according to the literature data. For optimal quantitative determination of IAA and vitamins, the high-performance liquid chromatography (HPLC) method is used (Battal, Tileklioglu, 2001; Aslam et al., 2008; Keskin et al., 2022).

The aim of this study was to select the most suitable candidate from *C. ficifolia*, *C. moschata*, *C. pepo*, and *C. maxima* as rootstock for grafting of *C. sativus* and *C. melo* as scion, and to select the grafting method that ensures optimal growth parameters, measurement of IAA and vitamins in the scion.

Materials and methods

Plant material. The plant material used for the study consisted of the following Cucurbitaceae species: cucumber (*C. sativus*) cultivar Asylim, melon (*C. melo*) cultivar Valet, fig leaf gourd (*C. ficifolia*) cultivar Arbuzny, winter squash landrace (*C. moschata*) cultivar Aphrodite, summer squash landrace (*C. pepo*) cultivar Danaya, and large-fruited pumpkin (*C. maxima*) cultivar Karina, from both Kazakhstan and global selections. The cultivation of cucurbits was conducted on neutralized peat with a pH of 6.0 (Kekkila™) in 1-liter containers with expanded clay drainage. Seeds of the cucurbits were planted in the peat-filled containers and watered daily with a nutrient solution of mineral salts at a rate of 100 mL per plant. After seed germination, the plants were illuminated with LED lamps at 5,000 lux for one week, followed by 10,000 lux for the subsequent six weeks. Morphometric analysis measures included plant mass and root mass separately, number and area of leaves, and stem thickness. Table 1

presents the composition of mineral salts and trace elements (According to the nutrient system of General Hydroponics, <https://generalhydroponics.com>).

Every two weeks, the ppm values of the solution were increased by 500. To achieve concentrations of 500, 1,000, and 1,500 ppm in the nutrient solutions, 1.3 mL, 2.7 mL and 4 mL, respectively, were taken from each stock solution per liter (Table 1). The pH was adjusted to 6.0 using a 1M solution of NaOH or KOH. The total concentration of the nutrient solution was measured using a TDS meter.

HPLC analysis of IAA, fat- and water-soluble vitamins determination. The chromatographic separation was performed using a Shimadzu Prominence LC-20 system (Shimadzu, Japan) equipped with a UV detector (SPD-20A) and a fluorescent detector (RF-10AXL). The HPLC system was equipped with a binary pump (LC-20AD), an autosampler (SIL-20AC), a degasser (DGU-20A5) and a column oven (CTO-20A) controlled by LCSolution. For IAA, fat- and water-soluble vitamins determination were used the fresh plants.

Fat-soluble vitamins analysis. Stock solutions of vitamins A, D₃, E, K 10 mg (Sigma Aldrich, USA) were dissolved in 10 mL of methanol in each falcon tube. Next, the working calibration standard was prepared with seven concentration ranges of 0.48–250 µg/mL for D₃, 1.95–1,000 µg/mL for vitamin E, 0.195–100 µg/mL for vitamin K and 0.39–200 µg/mL for vitamin A. All standards were stored at –20 °C and protected from light. The concentration of each vitamin was selected based on the sensitivity of the detector.

All working calibration standard solutions and samples were analyzed using the column Shimpack ODS XR (75 mm × 3.0 mm × 2.2 µm) (Shimadzu, Japan) and the following HPLC conditions: column oven temperature 35 °C; eluent Acetonitrile/methanol/dichloromethane/H₂O (70:15:10:5 %), and flow rate programmed using the following conditions: 0–10 min of 0.5 mL/min, then for 11–19 min the flow was increased to 1.0 mL/min, at 20 min it was decreased to 0.5 mL/min. Working calibration standards and samples were determined at a UV detector at 280 nm for 0–14 min, then the UV wavelength was switched to 295 nm. All these chromatographic parameters allow to better separate mixed standard calibrations.

In 1 g of the mixed sample, 100 µg ascorbic acid, 10 mL ethanol, 3 mL KOH (50 %) were added, stirred, and refluxed for 50 min using water bath at 80 °C. Extracts were neutralized with distilled water twice and then dehydrated using anhydrous sodium sulfate. Extracts were concentrated using rotary evaporator at 50 °C (IKA HB-8 basic, IKA, Germany), diluted by 5 mL acetonitrile, filtered (Aslam et al., 2008) using 0.45 µm membrane (Chromafil AO-45/25, Macherey-Nagel, Germany) and finally analyzed using HPLC.

Water-soluble vitamins analysis. The mobile phase consisted of 100 % acetonitrile and 99 % deionized water with 0.1 % orthophosphoric acid and 25 mM sodium dihydrogen phosphate. Flow rate was isocratic – 0.5 mL/min. The separation of vitamins was carried out in a Supelco Ascentis C18 column (250 mm – 4.6 mm – 5 µm) at 35 °C. Preparation of stock standard samples of B vitamins (B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₇, B₉, B₁₂) was dissolved in deionized water at a concentration of 1 mg/mL. All water-soluble vitamins were purchased from

Table 1. Minimum allowable composition of nutrient elements in stock solution, %

Grow (vegation)	Bloom (flowering)	Micro (microelements)
Total N – 3	Total P ₂ O ₅ – 5	Total CaO – 5
Total P ₂ O ₅ – 1	Total K ₂ O – 4	Total N – 5
Total K ₂ O – 6	Total MgO – 3	Total K ₂ O – 1
Total MgO – 0.8	Total SO ₄ – 5	Boron (B) – 0.01
		Molybdenum (Mo) – 0.0008
		Cobalt (Co) – 0.0005
		Cu chelate EDTA – 0.01
		Zn chelate EDTA – 0.015
		Mn chelate EDTA – 0.05
		Fe chelate EDTA – 0.10

Titan Biotech Ltd. All vitamins were pure and pharma-grade (purity at least ≥ 99 %). The solubility of vitamins B₂ and B₉ in water is limited, so a separate aqueous solution was prepared in 5 mM KOH and 20 mM KHCO₃, respectively. Working standard samples will be prepared for B₁, B₅, B₇ at a concentration range of 50–200 µg/mL, B₃, B₆ at 25–100 µg/mL, B₁₂ at 12.5–50 µg/mL, B₂ and B₉ at 2.5–10 µg/mL, and then all will be combined into one single standard for further calibration (Aslam et al., 2008).

For preparing an extraction solution, 50 mL of acetonitrile was mixed with 10 mL of acetic acid, and the final volume was made up to 1,000 mL with deionized water. 1 g samples were weighed and homogenized. After that, the samples were transferred into a conical flask where 10 mL of extraction solution was added. A water bath was set at 70 °C for 30 min. Afterwards, the sample was cooled down and finally filtered with filter trips (0.45 µm) and 20 µL aliquots solution was injected into the HPLC (Mozumder et al., 2019).

IAA analysis. Samples and standards were separated on a Restek Ultra C18 HPLC column 150 mm × 4 mm, 5 µm (Bellefonte, PA, USA) at 40 °C. UV detection was performed at 269 nm. The flow rate of the mobile phase was 0.8 mL/min. Mobile phase A consisted of 100 % HPLC grade acetonitrile, mobile phase B consisted of 99.9 % HPLC grade water and 0.1 % formic acid using the gradient elution as follows: 95 % B, 0 min; 70 % B, 13 min; 95 % B, 15 min. The flow rate of the mobile phase was 0.8 mL/min (Battal, Tileklioglu, 2001; Keskin et al., 2022). 10 mg of IAA standard solution was dissolved in 1 mL 1N NaOH, then filled with 9 ml deionized water in a 10 mL tube.

1 g samples were weighed and homogenized. After that, the samples were transferred into 10-mL centrifuge tubes and 10 mL of acetonitrile was added: deionized water (9:1, v/v) under dim light conditions. Then, 100 µL formic acid was added and shaken. Homogenates were incubated for 2 h, and centrifuged at 12,000g at 4 °C for 20 min. The upper supernatants were then collected and dried in a vacuum evaporator (Biobase, China). The residues obtained by drying were dissolved in 2 mL of acetonitrile and purified by a 200 mg/3 mL C18 solid phase extraction cartridge (Strata, Phenomenex, Torrance, USA). The cartridge was prepared by successively passing 2 mL of water and 2 mL of ethanol using SPE tube vacuum manifold (Biobase, China), where the vacuum valve

was set at negative pressure – 0.01 MPa. The liquid that passed through the cartridge was discarded, and the IAA was washed off with 2 mL of a mixture of ethanol–water–formic acid (80:20:0.5 %; v/v) into a 10 mL centrifugal tube. The collected residuals were transferred to a 2 mL Eppendorf tube, evaporated using a sample concentrator (NDK200-2N, Miulab, China), then dissolved with 2 mL acetonitrile. Finally, 20 µL aliquots solution was injected to HPLC.

Grafting methods. Two of the most common grafting methods were used for plant grafting. The first method, termed ‘Y’, involved insertion grafting or slant-cut grafting. One cotyledon leaf was left on the rootstock to enhance grafting success (approximately to 90 %). All leaves, including cotyledon leaves, were left on the scion. The graft junction was secured with a clip.

The second method, termed ‘X’, involved tongue approach grafting. Longitudinal cuts at an angle of 20–30° were made on the stems of both the rootstock and the scion, with the cut on the rootstock directed downward and the cut on the scion directed upward. The plants were then joined by their tongues and secured with clips. Initially, both root systems were used.

After 10 days, the vegetative part of the rootstock and the root system of the scion were pruned.

The grafted plants were then placed in a climate chamber with controlled temperature, humidity, and light conditions for further grafting. The grafted plants were grown in the growth chamber at 20 °C with 92 % humidity in complete darkness for four days. Subsequently, the grafted plants were grown under 12,000 lux lighting with an 8/16-hours light/dark cycle for 10 days (Lee et al., 2010). *C. sativus* and *C. melo* were used as control and self-grafted. All data were statistically assessed using Duncan’s test.

Results

Morphometric analysis of the Cucurbitaceae family

For setting up the experiment on growth parameters (plant and root mass), seeds of rootstocks *C. maxima*, *C. pepo*, *C. ficifolia*, and *C. moschata*, and scions *C. sativus* and *C. melo* were sown for further morphometric analysis and extraction (for quantitative determination of auxins and vitamins) over a period of 2 to 6 weeks (Fig. 1a). For reliable results, experiments

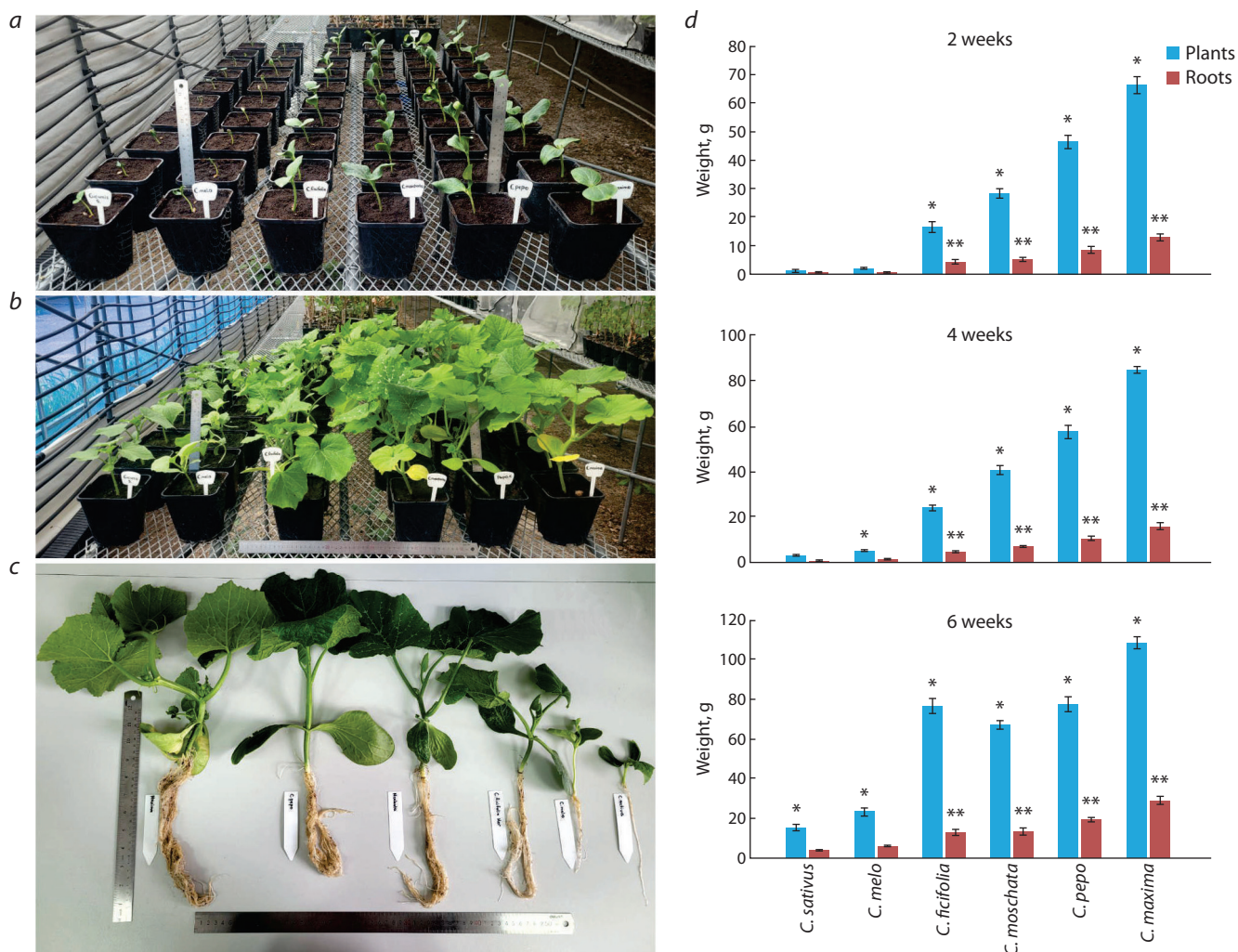


Fig. 1. Growth of Cucurbitaceae plants: a, one-week seedlings after germination; b, four-week plants; c, morphometric analysis of the Cucurbitaceae plants; d, 2-, 4- and 6-week plants and roots' weight in gram of fresh plants.

* Statistically significant results between the Cucurbitaceae plants at $p \leq 0.05$. ** Statistically significant results between the Cucurbitaceae roots at $p \leq 0.05$.

were conducted in three replicates under identical conditions: seedlings were planted in 1,000 mL containers and irrigated with a nutrient solution at a concentration of 500 ppm. During the third and fourth weeks, the concentration of the nutrient solution was increased to 1,000 ppm, and from the fifth week to the end of the sixth week, it was increased to 1,500 ppm. The results showed a significant difference across the four types of rootstocks and two samples of scions.

As an example, Figure 1b shows the plants at four weeks post-germination and the morphometric analysis (Fig. 1c). The morphometric analysis focused on the mass of the entire plant and the root. The results of the morphometric analysis are presented in Figure 1d as bar charts.

At 2, 4, and 6 weeks post-germination, plant and root mass parameters were measured using digital scales adapted from the methods. Based on the plant and root mass measurements at all intervals (2, 4, and 6 weeks), *C. maxima* exhibited the highest values. *C. pepo* ranked second in these metrics. However, at the 6-week mark, *C. ficifolia* matched *C. pepo* in plant mass, though all its values remained significantly lower than those of *C. maxima*. The lowest values were observed in *C. sativus* and *C. melo*. Morphometric analysis identified *C. maxima* as the most suitable candidate for grafting of *C. sativus* and *C. melo*. *C. sativus* plant did not show statistical significance, except for the 6th week. *C. melo*, *C. ficifolia*, *C. moschata*, *C. pepo*, and *C. maxima* plants showed significant differences, with *C. maxima* having the highest plant biomass over time.

C. sativus and *C. melo* roots weight had no statistical significance at all. *C. ficifolia*, *C. moschata*, *C. pepo*, and *C. maxima* root weights showed significant differences.

IAA, water- and fat-soluble vitamins in grafted plants

In the second stage, grafting of one-week-old plants of *C. sativus* and *C. melo* onto the pumpkin rootstock *C. maxima* was performed. The grafting method is illustrated in Figure 2a. The tongue approach grafting (Fig. 2a, first from the left) is designated as 'X' based on the shape of stem fusion. The second grafting method (second from the left) involved hole insertion grafting (scion stem with an oblique cut) to the growth point of the rootstock and is conditionally designated as 'Y'. For the 'Y' grafting method, the true leaf buds of the rootstock were removed, and a cut was made along the stem where the scion with an oblique stem cut was attached. The grafting methods 'X' and 'Y' are marked with red arrows in Figure 2a. The third grafting method was the control, where a tongue cut was made on the *C. sativus* and *C. melo* plants to ensure the experiment was conducted under the same conditions. The self-grafted scion plants of *C. sativus* and *C. melo* are designated as Control.

Two weeks after grafting, active plant growth commenced. Differences in growth rate and development between the grafted plant variants were observed at the end of the third week. Figure 2b illustrates the results for plants at four weeks of age marked with red arrows. Additionally, the healed graft



Fig. 2. Grafting of *C. sativus* and *C. melo* on *C. maxima*.

a, From left to right X-type grafting, Y-type grafting and self-grafting accordingly; b, grafted and self-grafted Control plants; c, X-type grafted connection between scion and rootstock; d, Y-type grafted connection between scion and rootstock; e, self-grafted Control.

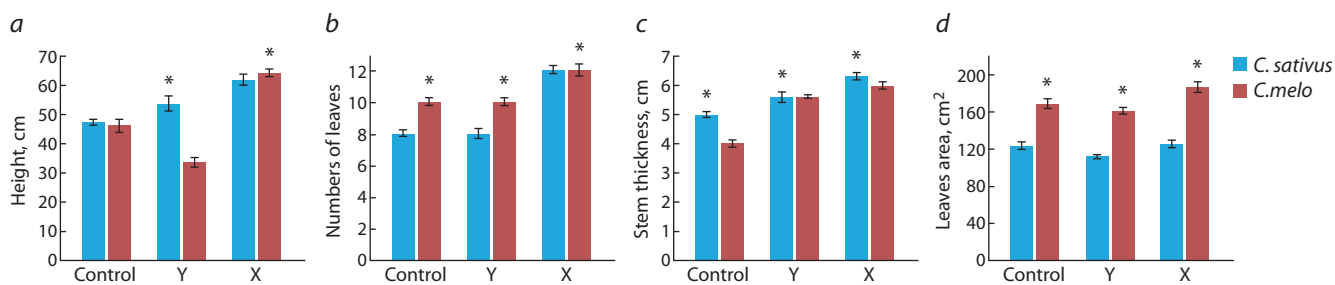


Fig. 3. Morphometric analysis of 6-week-old grafted plants (fresh plants): a, plant height; b, number of every grafted plant leaf; c, stem thickness; d, leaves area of grafted plants.

* Statistically significant results between the control and experimental groups at $p \leq 0.05$.

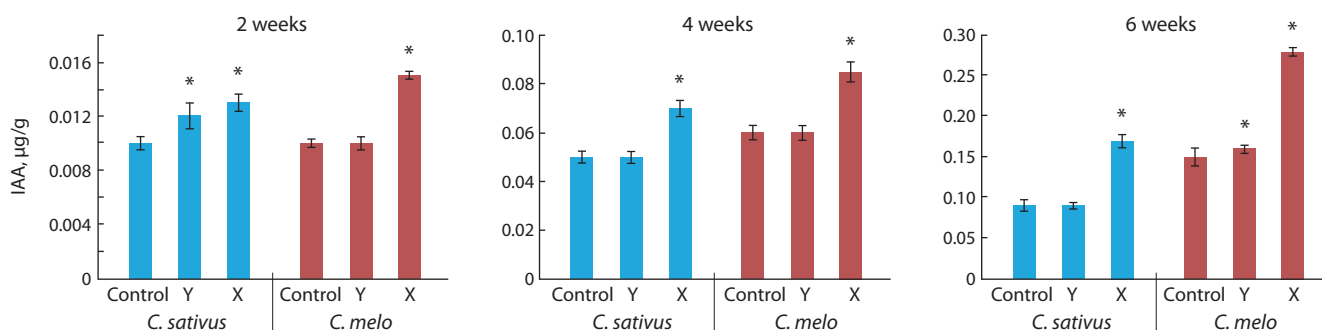


Fig. 4. IAA content in *C. sativus* and *C. melo* depending on grafting methods (from fresh plants).

* Statistically significant results between the control and experimental groups at $p \leq 0.05$.

unions are shown in Figure 2c–e for graft variants ‘X’, ‘Y’, and Control, respectively. From the start of grafting until the end of the sixth week post-grafting, it was visually observed that the graft variant ‘X’ did not lag behind the control plants and the ‘Y’ variant. In the graft variant ‘Y’, a slowdown in growth and development was noted. Upon reaching six weeks of age, a structural analysis was conducted, which identified the graft variant ‘X’ as the best among the others (Fig. 3). Six weeks post-grafting, the ‘X’ variant exhibited a 96 % survival rate, while the ‘Y’ variant showed only a 43 % survival rate of grafted plants. The control variant also demonstrated a high survival rate of 97 %.

Upon reaching six weeks of age, a structural analysis of the grafted plants was conducted, revealing that the grafting variant ‘X’ was superior to the others (Fig. 3). This variant excelled in plant height, leaf number, stem thickness, and leaf area for both *C. sativus* and *C. melo*. Grafting variant ‘Y’ ranked second in stem thickness and matched the Control in leaf number and leaf area. When comparing *C. sativus* and *C. melo*, no significant differences were found within the ‘X’ variant of grafting, for plant length, stem thickness and number of leaves, except for leaves area according to Figure 3. The IAA content in the grafted plant variants is presented in Figure 4. The extracts of leaves and stems were filtered through solid phase extraction (SPE) (Supplementary Fig. S1)¹. Upon completion of the extraction, IAA detection was performed, which was expressed as a chromatographic peak (Fig. S1). Also, chromatographic peaks of water and fat-

soluble vitamins quantification of the Cucurbitaceae family are shown in Supplementary Figure S2. And peaks of pure standard substances of IAA, water/fat-soluble vitamins are provided in Supplementary Figure S3.

Based on the results of the HPLC analysis, it was found that the content of IAA and vitamins is higher in the leaves than in the stems. Consequently, we conducted further targeted biochemical analyses using the leaves. As a result, the highest accumulation of IAA was observed in the graft variant ‘X’. As shown in Figure 4, the accumulation of IAA in grafted plants increased in the ‘X’ variant from the end of the second week, and by the end of the sixth week, the difference with the control plants was almost doubled.

Vitamins identification using chromatographic detection was performed (Tables 2, 3). The quantitative values of vitamins are given in µg/g, recalculated to dry weights of stem and leaf samples. The differences in the content of water- and fat-soluble vitamins in the grafted plant variants are presented in Tables 2, 3. A significant increase in vitamin content was observed from the end of the fourth week.

An increased content of all B vitamins and vitamin C was noted in the grafting variant ‘X’ at the end of the 4th week – 25.2–135.1 and 52.3–67.0 %, respectively, with all indicators being higher in the grafted *C. sativus* than in the *C. melo*. In *C. melo*, vitamin B₂ levels exceeded the Control by 122.7 %, and those of vitamin B₁₂, by 135.1 %. In the grafting variant ‘Y’, all indicators were at the control level.

After 6 weeks, the indicators in the grafting variant ‘X’ became more balanced and amounted to 17.5–61.8 % for B vitamins and 51.6 % for vitamin C in *C. sativus*; 19.3–42.6 %

¹ Supplementary Figures S1–S3 are available at:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx20.pdf>

Table 2. Water-soluble vitamins accumulation in grafted plants (from fresh plants), µg/g

Vitamins	C. sativus			C. melo			C. sativus			C. melo			C. sativus			C. melo			p-value	
	2 weeks			4 weeks			6 weeks			C. sativus			C. melo			by weeks		by grafting		
	C	Y	X	C	Y	X	C	Y	X	C	Y	X	C	Y	X	C	Y	X		
B ₁	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0
B ₂	2.2	1.9	2.3	2.3	2.2	2.4	13.2	13.8	29.4	30.6	28.9	54.0	33.4	34.5	50.7	81.2	80.0	110.2	0.0055	NS
B ₃	16.9	15.8	17.2	21.9	22.0	23.0	65.1	66.4	90.2	63.2	60.7	79.1	96.2	98.1	140.3	100.1	101.2	133.4	0.0001	NS
B ₅	43.1	44.0	44.5	37.0	37.2	37.7	102.0	105.5	190.6	102.2	92.5	145.8	179.0	171.5	210.3	204.6	206.7	291.8	0.0004	0.0450
B ₆	27.0	27.5	27.9	3.7	3.6	3.9	70.3	71.4	128.5	10.1	9.9	18.2	88.7	90.6	134.4	59.0	58.6	81.4	0.0021	0.0384
B ₇	71.0	72.1	72.9	109.7	109.8	111.4	266.9	270.0	438.1	185.8	180.4	260.6	525.6	530.0	790.3	239.4	240.5	320.5	0.0409	NS
B ₉	8.1	8.1	8.3	15.3	15.4	16.2	20.5	20.3	39.9	65.2	66.5	110.3	44.0	42.5	71.2	101.1	100.9	120.6	0.0185	NS
B ₁₂	7.6	7.5	7.9	3.7	3.8	3.9	11.1	12.3	26.1	5.0	4.9	8.2	42.0	40.5	63.7	13.9	14.1	19.4	0.0104	NS
C	17.2	17.4	17.9	11.3	11.1	12.0	25.6	25.3	39.0	18.8	18.0	31.4	60.1	58.9	91.1	34.1	35.2	49.4	0.0019	0.0336

Note. Here and in the Table 3: C – control, Y – 'Y' type of grafting, X – 'X' type of grafting.

Table 3. Fat-soluble vitamins accumulation in grafted plants (from fresh plants), µg/g

Vitamins	C. sativus			C. melo			C. sativus			C. melo			C. sativus			C. melo			p-value		
	2 weeks			4 weeks			6 weeks			by week			by grafting			by plants					
	C	Y	X	C	Y	X	C	Y	X	C	Y	X	C	Y	X	C	Y	X			
A	2.112	1.785	3.055	1.984	1.102	2.164	5.136	6.492	8.175	3.512	4.250	5.019	6.103	6.171	10.295	6.053	6.112	9.069	0.0014	NS	
E	0.609	0.585	0.918	0.175	0.116	0.253	1.281	1.597	2.141	0.285	0.352	1.234	3.014	2.997	5.413	0.091	0.102	1.714	0.0272	NS	
D ₃	0.001	0.001	0.004	0.001	0.001	0.003	0.004	0.019	0.037	0.005	0.006	0.015	0.017	0.016	0.031	0.014	0.014	0.026	0.0212	0.0434	
K	0.007	0.006	0.008	0.012	0.011	0.017	0.041	0.054	0.069	0.011	0.015	0.028	0.045	0.044	0.061	0.051	0.052	0.095	0.0192	NS	

for B vitamins and 44.9 % for vitamin C in *C. melo*. In the grafting variant 'Y', the indicators were also at the standard Control level.

For vitamins A, E, D₃, and K, starting from the 2nd week, a stable difference in their accumulation in leaves was observed in the grafting variant 'X', being 1.5–2 times higher compared to the Control variant.

Additionally, in the 'X' variant, the accumulation of IAA compared to the control plants in Control also increased from the end of the second week and was almost twice as high. This pattern with the grafting variant 'X' was observed both in the *C. sativus* grafting variant and in the melon grafting variant.

Discussion

The influence of the root system of the rootstock on the scion, and vice versa, i. e., the impact of the more developed biomass of the rootstock on the further development of the scion and improved growth of melon plants grafted onto Cucurbitaceae species, was identified in a previous study (Martínez-Ballesta et al., 2010). This study confirms that the union of the rootstock and scion and the differentiation of new vascular tissue from callus cells, as well as the resumption of scion biomass growth, begin within 2 weeks post-grafting, as clearly demonstrated in our research.

Based on the obtained results, we observe that the grafting method 'X' is the most acceptable among other methods. As expected, this method allows plants to resume growth processes more quickly and better accumulate IAA and vitamins in the leaves. According to (Noor et al., 2019), the use of the tongue grafting method showed high compatibility with hybrid cucumber scions compared to other grafting methods and non-grafted plants.

The novel idea of the study was to identify the optimal type of grafting that will result in the fastest recovery of the grafted plant, as well as a stimulating effect of the rootstock on the scion, where an increase in IAA and vitamin content occurs. Other researchers have noted that the influence of cucurbit rootstock on cucumber scion provides salt tolerance and increases fruit yield by improving morpho-physio-biochemical and ionic properties, specifically increasing the content of the following substances in grafted plants: superoxide dismutase, catalase and peroxidase enzymes, antioxidant scavenging activity, ionic ↑K and Ca, ↓Na (Abbas et al., 2023). We obtained similar results. It can be assumed that the mechanism of vitamin accumulation in scions occurs similarly to the mechanism of IAA accumulation in scions post-grafting onto the rootstock. In other words, the growth factors of the rootstock in the form of IAA may stimulate the accumulation of hormones and vitamins in the scion. The conducted studies, including morphometric analysis of grafted plants, show that parameters such as plant height, number of leaves on grafted plants, stem thickness, leaf area of grafted plants, as well as chromatographic data on IAA and vitamin accumulation, are superior in grafting method 'X' compared to the control and grafting method 'Y'.

The next stage should include studies throughout the entire physiological development of the plant, up to full maturation and harvest.

Conclusion

Analyzing the data, we concluded that among four species of Cucurbitaceae: *C. ficifolia*, *C. moschata*, *C. pepo* and *C. maxima*, the plants of the species *C. maxima* are the best candidate for use as rootstock material for grafting of *C. sativus* and *C. melo*. This is due to their superior performance in terms of plant mass increase, root mass, and stem thickness at the root base for both *C. sativus* and *C. melo*. The second-best candidates are plants of the species *C. pepo*.

Among the two different grafting methods tested, the grafting method 'X' showed the best results in terms of growth factors and the accumulation of IAA and vitamins in the leaves of the rootstock. In method 'X', the IAA accumulation from the end of the second week was twice as high compared to the Control plants. Regarding vitamins, this method also exceeded the control, with increased levels of all B vitamins and vitamin C at the end of the fourth week by 25.2–135.1 and 52.3–67.0 %, respectively, and vitamins A, E, D₃, and K starting from the second week by 1.5–2 times. In contrast, the grafting method 'Y' did not show any significant increase in any of the analyzed parameters and was at the Control level.

Therefore, it is recommended to graft both *C. sativus* and *C. melo* onto *C. maxima* plants using the tongue approach grafting method 'X'.

References

- Abbas F., Faried H.N., Akhtar G., Ullah S., Javed T., Shehzad M.A., Ziaf K., Razzaq K., Amin M., Wattoo F.M., Hafeez A., Rahimi M., Abeed A.H.A. Cucumber grafting on indigenous cucurbit landraces confers salt tolerance and improves fruit yield by enhancing morpho-physio-biochemical and ionic attributes. *Sci Rep.* 2023;13(1): 21697. doi 10.1038/s41598-023-48947-z
- Albacete A., Martínez-Andújar C., Martínez-Pérez A., Thompson A.J., Dodd I.C., Pérez-Alfocea F. Unravelling rootstock×scion interactions to improve food security. *J Exp Bot.* 2015;66(8):2211-2226. doi 10.1093/jxb/erv027
- Asensi-Fabado M.A., Munné-Bosch S. Vitamins in plants: occurrence, biosynthesis and antioxidant function. *Trends Plant Sci.* 2010; 15(10):582-592. doi 10.1016/j.tplants.2010.07.003
- Aslam J., Mohajir M.S., Khan S.A., Khan A.Q. HPLC analysis of water-soluble vitamins (B₁, B₂, B₃, B₅, B₆) in *in vitro* and *ex vitro* germinated chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Afr J Biotechnol.* 2008; 7(14):2310-2314. doi 10.5897/AJB2008.000-5058
- Balliu A., Sallaku G. Exogenous auxin improves root morphology and restores growth of grafted cucumber seedlings. *Hortic Sci.* 2017; 44(2):82-90. doi 10.17221/53/2016-HORTSCI
- Bantis F., Panteris E., Dangitsis C., Carrera E., Koukounaras A. Blue light promotes vascular reconnection, while red light boosts the physiological response and quality of grafted watermelon seedlings. *Sci Rep.* 2021;11(1):21754. doi 10.1038/s41598-021-01158-w
- Battal P., Tileklioglu B. The effects of different mineral nutrients on the levels of cytokinins in maize (*Zea mays* L.). *Turk J Bot.* 2001; 25(3):123-130
- Bekhradi F., Kashi A.K., Delshad M. Effect of different cucurbits rootstocks on vegetative and yield of watermelon. *Acta Hort.* 2009; 807:649-654. doi 10.17660/ActaHortic.2009.807.97
- Bunsangiam S., Thongpae N., Limtong S., Nantana S. Large scale production of indole-3-acetic acid and evaluation of the inhibitory effect of indole-3-acetic acid on weed growth. *Sci Rep.* 2021;11(1):13094. doi 10.1038/s41598-021-92305-w
- El-Eslamboly A.A.S.A., Deabas A.A.A. Grafting cucumber onto some rootstocks for controlling root-knot nematodes. *Minufiya J Agric Res.* 2014;39(3):1109-1129

- Farhadi A., Aroei H., Nemati H., Salehi R., Giuffrida F. The effectiveness of different rootstocks for improving yield and growth of cucumber cultivated hydroponically in a greenhouse. *Horticulturae*. 2016;2(1):1. doi 10.3390/horticulturae2010001
- Keskin N., Kaya O., Ates F., Turan M., Gutiérrez-Gamboa G. Drying grapes after the application of different dipping solutions: effects on hormones, minerals, vitamins, and antioxidant enzymes in Gök Üzümlü (*Vitis vinifera* L.) raisins. *Plants*. 2022;11(4):529. doi 10.3390/plants11040529
- Lam V.P., Lee M.H., Park J.S. Optimization of indole-3-acetic acid concentration in a nutrient solution for increasing bioactive compound accumulation and production of *Agastache rugosa* in a plant factory. *Agriculture*. 2020;10(8):343. doi 10.3390/agriculture10080343
- Lee J.M., Kubotab C., Tsao S.J., Bied Z., Echevarria P.H., Morraf L., Oda M. Current status of vegetable grafting: diffusion, grafting techniques, automation. *Sci Hortic*. 2010;127(2):93-105. doi 10.1016/j.scienta.2010.08.003
- Li W., Fang C., Krishnan S., Chen J., Yu H., Murphy A.S., Merewitz E., Katin-Grazzini L., McAvoy R.J., Deng Z., Zale J., Li Y. Elevated auxin and reduced cytokinin contents in rootstocks improve their performance and grafting success. *Plant Biotechnol J*. 2017;15(12):1556-1565. doi 10.1111/pbi.12738
- Li X., Sun Y., Yuan X., Ma Z., Hong Y., Chen S. Impact of *Cucurbita moschata* resistant rootstocks on *Cucumis sativus* fruit and *Meloidogyne incognita* development. *Plant Dis*. 2023;107(12):3851-3857. doi 10.1094/PDIS-02-22-0319-RE
- Martínez-Ballesta M.C., Alcaraz-Lopez C., Muries B., Mota-Cadenas C., Carvajal M. Physiological aspects of rootstock-scion interactions. *Sci Hortic*. 2010;127(2):112-118. doi 10.1016/j.scienta.2010.08.002
- Mauro R.P., Pérez-Alfocea F., Cookson S.J., Ollat N., Vitale A. Physiological and molecular aspects of plant rootstock-scion interactions. *Front Plant Sci*. 2022;13:852518. doi 10.3389/fpls.2022.852518
- Mozumder N.H.M.R., Akhter M.J., Anwara A.K., Rokibuzzaman M., Akhtaruzzaman M. Estimation of water-soluble vitamin B-complex in selected leafy and non-leafy vegetables by HPLC method. *Orient J Chem*. 2019;35(4):1344-1351. doi 10.13005/ojc/350414
- Noda K., Okuda H., Iwagaki I. Indole acetic acid and abscisic acid levels in new shoots and fibrous roots of citrus scion-rootstock combinations. *Sci Hortic*. 2000;84(3):245-254. doi 10.1016/S0304-4238(99)00080-1
- Noor R.S., Wang Z., Umair M., Yaseen M., Ameen M., Rehman S.U., Khan M.U., Imran M., Ahmed W., Sun Y. Interactive effects of grafting techniques and scion-rootstocks combinations on vegetative growth, yield and quality of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Agronomy*. 2019;9(6):288. doi 10.3390/agronomy9060288
- Stefancic M., Stampar F., Osterc G. Influence of endogenous IAA levels and exogenous IBA on rooting and quality of leafy cuttings of *Prunus* 'GiSelA 5'. *J Hort Sci Biotechnol*. 2006;81(3):508-512. doi 10.1080/14620316.2006.11512095
- Stefancic M., Stampar F., Veberic R., Osterc G. The levels of IAA, IAAsp and some phenolics in cherry rootstock 'GiSelA 5' leafy cuttings pretreated with IAA and IBA. *Sci Hortic*. 2007;112(4):399-405. doi 10.1016/j.scienta.2007.01.004
- Tang J., Li Y., Zhang L., Mu J., Jiang Y., Fu H., Zhang Y., Cui H., Yu X., Ye Z. Biosynthetic pathways and functions of indole-3-acetic acid in microorganisms. *Microorganisms*. 2023;11(8):2077. doi 10.3390/microorganisms11082077
- Toporek S.M., Keinath A.P. Evaluating cucurbit rootstocks to prevent disease caused by *Pythium aphanidermatum* and *P. myriotylum* on watermelon. *Plant Dis*. 2020;104(11):3019-3025. doi 10.1094/PDIS-03-20-0474-RE
- Traka-Mavrona E., Koutsika-Sotiriou M., Pritsa T. Response of squash (*Cucurbita* spp.) as rootstock for melon (*Cucumis melo* L.). *Sci Hortic*. 2000;83(3-4):353-362. doi 10.1016/S0304-4238(99)00088-6
- Tsaballa A., Xanthopoulou A., Madesis P., Tsiftaris A., Nianiou-Obeidat I. Vegetable grafting from a molecular point of view: the involvement of epigenetics in rootstock-scion interactions. *Front Plant Sci*. 2021;11:621999. doi 10.3389/fpls.2020.621999

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

Received November 4, 2024. Revised January 17, 2025. Accepted March 25, 2025.

doi 10.18699/vjgb-25-60

Данные митохондриальной ДНК позволяют выделить субпопуляции широкоареального вида журавлей красавки (*Anthropoides virgo*)

Е.А. Мудрик , Е.И. Ильяшенко ^{1, 2}, П.А. Казимиров ¹, К.Д. Кондракова ^{1, 2}, Т.П. Арчимеева ³,
Л.Д. Базаров ⁴, О.А. Горошко ^{5, 6}, Ц.З. Доржиев ^{7, 8}, А.Н. Куксин ³, К.А. Постельных ⁹, В.В. Шуркина ¹⁰,
В.Ю. Ильяшенко ², А.В. Шатохина ¹, Д.В. Политов ¹

¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

² Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Россия

³ Тувинский институт комплексного освоения природных ресурсов Сибирского отделения Российской академии наук, Кызыл, Россия

⁴ Национальный парк «Тункинский», Кырен, Россия

⁵ Институт природных ресурсов, экологии и криологии Сибирского отделения Российской академии наук, Чита, Россия

⁶ Государственный природный биосферный заповедник «Даурский», Нижний Цасучей, Россия

⁷ Бурятский государственный университет им. Доржи Банзарова, Улан-Удэ, Россия

⁸ Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Улан-Удэ, Россия

⁹ Окский государственный природный биосферный заповедник, Брыкин Бор, Россия

¹⁰ Государственный природный заповедник «Хакасский», Абакан, Россия

 mudrik@vigg.ru

Аннотация. Впервые изучен полиморфизм последовательностей фрагмента гена мтДНК цитохрома *b* и на его основе охарактеризована популяционно-генетическая структура журавля красавки (*Anthropoides virgo* Linnaeus, 1778) на большей части ареала в России. Для 157 особей идентифицировано 18 гаплотипов, девять из которых оказались уникальными. Европейские выборки характеризовались большей гаплотипической и нуклеотидной изменчивостью и более сильной генетической дифференциацией, чем азиатские. Поток генов между разными частями ареала красавки, вероятно, осуществляется через птиц, гнездящихся в Зауралье. Общая генетическая дифференциация вида составила >20 % ($F_{ST} = 0.265$, $p < 0.001$). Структура генофонда сформирована тремя основными гаплотипами, один из которых преобладает в Азово-Черноморском регионе, второй – в Прикаспийском и Волго-Уральском, а третий наиболее распространен в азиатских выборках. Исходя из соответствия внутривидовой генетической дифференциации красавки пролетным путям птиц из разных частей ареала, мы предлагаем в структуре вида выделить следующие субпопуляции: 1) азово-черноморско-чадскую; 2) прикаспийско-суданскую; 3) зауральско-индийскую; 4) южносибирско-индийскую; 5) байкальско-индийскую; 6) забайкальско-индийскую. Полученные данные создают основу для мониторинга генетического разнообразия красавки и разработки научного обоснования мер охраны генофонда как вида в целом, так и его отдельных субпопуляций.

Ключевые слова: Gruidae; генофонд; цитохром *b*; гаплотип; генетическое разнообразие; генетическая дифференциация; популяционно-генетическая структура; пролетный путь

Для цитирования: Мудрик Е.А., Ильяшенко Е.И., Казимиров П.А., Кондракова К.Д., Арчимеева Т.П., Базаров Л.Д., Горошко О.А., Доржиев Ц.З., Куксин А.Н., Постельных К.А., Шуркина В.В., Ильяшенко В.Ю., Шатохина А.В., Политов Д.В. Данные митохондриальной ДНК позволяют выделить субпопуляции широкоареального вида журавлей красавки (*Anthropoides virgo*). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2025;29(4):568-577. doi 10.18699/vjgb-25-60

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 23-24-00613, соглашение от 13.01.2023, <https://rscf.ru/project/23-24-00613/>

Благодарности. Благодарим за помощь в полевых работах А.А. Абушина, Ю.В. Бабицева, Е.Н. Бадмаеву, С.Б. Бальжимаеву, В.П. Белика, Е.В. Гугуеву, А.В. Давыгору, Г.С. Джамирзоева, Н.Д. Карташова, В.А. Кызыл-оол, В.М. Михайловского, С.В. Пыжьянова, А.Ю. Скрипниченко, В.Н. Федосова.

Mitochondrial DNA data allow distinguishing the subpopulations in the widespread Demoiselle crane (*Anthropoides virgo*)

Е.А. Mudrik , Е.И. Ilyashenko ^{1, 2}, P.A. Kazimirov ¹, K.D. Kondrakova ^{1, 2}, T.P. Archimaeva ³,
L.D. Bazarov ⁴, O.A. Goroshko ^{5, 6}, Ts.Z. Dorzhiev ^{7, 8}, A.N. Kuksin ³, K.A. Postelnykh ⁹, V.V. Shurkina ¹⁰,
V.Yu. Ilyashenko ², A.V. Shatokhina ¹, D.V. Politov ¹

¹ Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

© Мудрик Е.А., Ильяшенко Е.И., Казимиров П.А., Кондракова К.Д., Арчимеева Т.П., Базаров Л.Д., Горошко О.А., Доржиев Ц.З., Куксин А.Н., Постельных К.А., Шуркина В.В., Ильяшенко В.Ю., Шатохина А.В., Политов Д.В., 2025

Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

³ Tuvini Institute for Exploration of Natural Resources of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Kyzyl, Russia

⁴ Tunkinsky National Park, Kyren, Russia

⁵ Institute of Nature Resources, Ecology and Cryology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Chita, Russia

⁶ Daurysky State Nature Biosphere Reserve, Nizhny Tsasuchey, Russia

⁷ Buryat State University named after Dorji Banzarov, Ulan-Ude, Russia

⁸ Institute of General and Experimental Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, Russia

⁹ Oka State Nature Biosphere Reserve, Brykin Bor, Russia

¹⁰ Khakassky State Nature Reserve, Abakan, Russia

 mudrik@vigg.ru

Abstract. The polymorphism of the mtDNA cytochrome *b* (cyt *b*) gene's partial sequences has been studied in the Demoiselle crane (*Anthropoides virgo* Linnaeus, 1778) for the first time. Based on cyt *b* variability, the population genetic structure of the species was characterized within most of its range in Russia. Among 157 individuals we identified 18 haplotypes, nine of which were unique. In the European samples, we observed greater haplotype and nucleotide diversity and stronger genetic differentiation than in the Asian ones. Gene flow between different parts of the Demoiselle crane range is probably mediated by birds breeding in the Trans-Urals. The overall genetic subdivision of the species as estimated by F_{ST} was 0.265 ($p < 0.001$). The structure of the gene pool is formed by three main haplotypes, one of which predominates in the Azov-Black Sea region, the second in the Caspian and Volga-Ural regions, and the third is most common in the Asian samples. Based on the correspondence of intraspecific genetic differentiation of the Demoiselle cranes from different parts of the range to their flyways, we propose to distinguish the following subpopulations: (1) Azov-Black Sea/Chadian; (2) Caspian/Sudanese; (3) Trans-Ural/Indian; (4) South Siberian/Indian; (5) Baikal/Indian and (6) Trans-Baikal/Indian. The obtained data create the basis for monitoring the genetic diversity of the Demoiselle crane and developing a scientific background for measures to protect the gene pool of the species as a whole and its subpopulations.

Key words: Gruidae; gene pool; cytochrome *b* (cyt *b*); haplotype; genetic diversity; genetic differentiation; population-genetic structure; flyway

For citation: Mudrik E.A., Ilyashenko E.I., Kazimirov P.A., Kondrakova K.D., Archimaeva T.P., Bazarov L.D., Goroshko O.A., Dorzhiev Ts.Z., Kuksin A.N., Postelnykh K.A., Shurkina V.V., Ilyashenko V.Yu., Shatokhina A.V., Politov D.V. Mitochondrial DNA data allow distinguishing the subpopulations in the widespread Demoiselle crane (*Anthropoides virgo*). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(4):568-577. doi 10.18699/vjgb-25-60

Введение

Красавка (*Anthropoides virgo*, Linnaeus, 1778) – евроазиатский вид журавлей, генофонд которого изучен фрагментарно. Гнездовая часть ареала красавки простирается в степной и полупустынной зонах континента от Азово-Черноморского региона России до Северо-Востока Китая. В Европе вид находится под угрозой исчезновения (BirdLife International, 2021) вследствие деградации мест обитания, продолжительной засухи и неуклонного сокращения численности, вызванного в том числе истребительной охотой на местах пролета и зимовки, тогда как в мировом масштабе его состояние пока не вызывает опасений (BirdLife International, 2018). Красавка занесена в Красную книгу Российской Федерации (Ильяшенко, 2021). На юге европейской части России локализованы сохранившиеся европейские гнездовые группировки красавки, а по южным регионам Зауралья и Сибири проходит северная граница азиатской части ареала вида, ядро которой находится в Казахстане и Монголии (Ильяшенко, 2019).

Первые и единственные к настоящему времени сведения о популяционно-генетической структуре красавки были получены нами с использованием микросателлитных локусов и контрольного региона мтДНК. По обоим типам маркеров выявлен высокий уровень генетического разнообразия во всех частях ареала и показано, что европейские группировки более подразделены, чем азиатские, а общая генетическая дифференциация вида невысока (Mudrik et al., 2018, 2022). Однако эти исследования были проведены на небольшом количестве особей из природы, особенно из азиатской части ареала, и с привлечением биоматериала из зоопарков. Кроме того, анализ

контрольного региона, преимуществом которого является высокая вариабельность этой некодирующей области мтДНК, может не отображать структуру генофонда, сформированную белок-кодирующими генами, среди которых одним из наиболее надежных маркеров признан цитохром *b* (Zardoya, Meyer, 1996). Большинство популяционно-генетических исследований журавлей выполнено по контрольному региону, тогда как информация о полиморфизме последовательностей более консервативного цитохрома *b* у этой группы птиц достаточно скудна (в Генбанке представлено несколько одинаковых сиквенсов красавки). Таким образом, нами была поставлена цель впервые на популяционном уровне и большой географической шкале оценить полиморфизм митохондриального гена цитохрома *b* у красавки и охарактеризовать ее генофонд в разных частях ареала с использованием более репрезентативного, чем в предыдущих работах, биоматериала из природы, прежде всего из ранее неизученных азиатских группировок.

Материалы и методы

Сбор биологического материала. В работе использовали биологические образцы от 157 особей. Исследование одобрено Локальным комитетом по биоэтике при Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (протоколы № 1 от 15.05.2017 и № 1 от 18.05.2023). Источником ДНК служила кровь (реже эпидермис) из растущих покровных перьев из области груди или шеи птенцов красавки в возрасте 15–35 дней. Образцы перьев собирали в течение 2016–2024 гг. в ходе собственных экспедиций в места гнездования красавки в период, когда птенцы еще не ле-

тали (июнь–июль). Птенцов ловили ручным способом в соответствии с разрешениями Федеральной службы по надзору в сфере природопользования Российской Федерации № 43 (2016 г.), № 104, 105, 106 (2017), № 52, 56 (2018), № 9, 60 (2019), № 21 (2023), № 78 (2024 г.). После забора биоматериала, который занимает 5–10 мин, птенцов отпускали к родителям. Растущие перья помещали в консервирующий раствор Лонгмайра в винтовые пробирки, транспортировали в лабораторию при комнатной температуре, а затем хранили в морозильной камере при -20°C . В норме выводок красавки состоит из двух птенцов, и при наличии биоматериала от обоих сибсов в анализ включали образец только одного.

Для обозначения выборок в европейской части ареала мы придерживались устоявшегося деления на гнездовые группировки (Белик и др., 2011), а в азиатской части присвоили выборкам топографические названия. Таким образом, мы анализировали 156 неродственных особей из 10 выборок с большей части ареала вида в России: азово-черноморской, прикаспийской, волго-уральской (включая несколько особей из Западного Казахстана), предуральской, зауральской, хакасской, алтайской, тувинской, байкальской и забайкальской. Некоторые небольшие выборки (Предуралье, Зауралье, Хакасия, Алтай) представлены максимально возможным количеством птиц по причинам малой численности красавок в соответствующих районах исследований и/или низкого успеха их размножения в годы полевых работ. Для увеличения алтайской выборки мы провели секвенирование биоматериала особи, содержащейся в Барнаульском зоопарке, по документам происходящей из природы Алтайского края.

Молекулярно-генетический анализ. Геномную ДНК экстрагировали из растущих перьев с применением набора К-сорб (НПК «Синтол», Россия) по протоколу производителя. Амплификацию фрагмента гена цитохрома *b* осуществляли с использованием прямого (F: CТАCTAC TAGCYGCACACTA) и обратного (R: AGGTTGGCGGT TAGGGTTC) праймеров (Sun et al., 2020) и набора реагентов GenPak PCR Core (ООО «Лаборатория Изоген», Россия) на приборе GeneExplorer, модель GE-96G (Bioer Technology Co LTD, КНР). Программа амплификации состояла из преденатурации (94°C , 5 мин), 30 циклов (94°C – 30 с, 55°C – 30 с, 72°C – 1 мин) и заключительной элонгации (72°C – 10 мин) (Sun et al., 2020). Размер и качество продуктов амплификации проверяли на электрофореze в 1.5 % агарозном геле, затем очищали их с помощью наборов Cleanup St PCR (ЗАО «Евроген», Россия) и секвенировали в прямом направлении на генетическом анализаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, США) в ЗАО «Евроген» (Россия).

Анализ молекулярно-генетических данных. Вываживание полученных в результате секвенирования по Сэнгеру нуклеотидных последовательностей цитохрома *b* длиной около 900 п. н. осуществляли друг относительно друга и единственной полной последовательности этого гена у красавки в Генбанке (NC_020573) с использованием алгоритма MAFFT (Katoh et al., 2002) в программе Geneious v. 9.1.8 (Kearse et al., 2012). Нуклеотидное разнообразие, тесты на селективную нейтральность, попарные

и общие оценки генетической подразделенности G_{ST} и F_{ST} , поток генов, осуществляемый через дисперсию самок N_m (число самок-мигрантов на поколение) рассчитывали с помощью DnaSP v. 6.11.01 (Librado, Rozas, 2009). Анализ молекулярной изменчивости AMOVA и построение медианной сети гаплотипов с применением алгоритма TCS (Clement et al., 2002) выполняли в программе PopART (Leigh, Bryant, 2015). Деревья гаплотипов по методу максимального правдоподобия (Maximal Likelihood) строили при помощи сервиса IQTree (Trifinopoulos et al., 2016; Kalyaanamoorthy et al., 2017; Minh et al., 2020) на основе модели нуклеотидных замен HKY+F (Hasegawa–Kishino–Yano) (Hasegawa et al., 1985), выбранной в качестве оптимальной по байесовскому критерию (BIC). Поддержку узлов ветвлений рассчитывали с помощью метода UltraFast Bootstrap для 1000 репликаций (Hoang et al., 2017). В качестве внешней группы использовали последовательность цитохрома *b* ближайшего родственника красавки – райской красавки (*Anthropoides paradiseus*) (номер в Генбанке U27557).

Графическую визуализацию деревьев проводили в среде R (R Core Team, 2022) с использованием пакетов ggtree (Yu et al., 2017, 2018; Yu, 2020, 2022), ggtreeExtra (Xu et al., 2021; Yu, 2022), tidytree (Yu, 2022), ggplot2 (Wickham, 2016), pals (Wright, 2024) и ggnewscale (Campitelli, 2024). Тепловую карту сходства гаплотипов на основе нуклеотидных замен конструировали в среде R по алгоритму, описанному в статье (Toparslan et al., 2020). Для создания карт с географической локализацией гаплотипов применяли пакеты ggmap (Kahle, Wickham, 2013), ggrepel (Slowikowski, 2024), smoothr (Strimas-Mackey, 2023), sp (Pebesma, Bivand, 2005; Bivand et al., 2013) и pals и базовые методы среды R.

Результаты

Характеристика гаплотипов

После выравнивания размер анализируемых последовательностей составил 771 п. н. В выборке из 157 птиц идентифицировано 18 гаплотипов (табл. 1, рис. 1, а), депонированных в Генбанк под номерами PQ663762–PQ663779. Девять из них (h1, h2, h3, h5, h7, h12, h14, h15, h18) обнаружены как минимум в двух гнездовых группировках. Самым распространенным (у 50.9 % особей) являлся гаплотип h18, он присутствовал во всех выборках, кроме Предуралья. Также почти по всему ареалу распространены гаплотипы h7 (кроме Предуралья и Хакасии, 23.6 % особей) и h5 (кроме Азово-Черноморья и Алтая, 11.5 % особей). Уникальные гаплотипы обнаружены в прикаспийской (h6, h10, h13), зауральской (h4, h16), тувинской (h8, h17), байкальской (h9) и забайкальской (h11) выборках. В азово-черноморской и волго-уральской выборках не выявлено уникальных гаплотипов, однако в них наиболее частыми были h7 и h5 соответственно, а не h18, как в остальных. У единственной особи из Предуралья гаплотип не был уникальным – такой же найден в Прикаспии (h2). Гаплотип красавки из Барнаульского зоопарка оказался таким же, как в Азово-Черноморье (h15) (см. табл. 1), но, поскольку достоверность происхождения

Таблица 1. Состав и распределение гаплотипов цитохрома *b* в изученных выборках красавки

Выборка	Гаплотип																		Всего особей
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Азово-черноморская (АЧ)																			21
Республика Крым			1				14								1			3	
Краснодарский край							2												
Прикаспийская (ПК)																			32
Республика Калмыкия	1	1			5		1			1			1					11	
Республика Дагестан	1		1		1	1	1											4	
Ставропольский край																		2	
Волго-уральская (ВУ)																			22
Волгоградская область	3				4		3							1				3	
Западноказахстанская область					3		3							1				1	
Предуральская (ПУ)																			1
Оренбургская область, Соль-Илецкий район		1																	
Зауральская (ЗУ)																			7
Оренбургская область, Светлинский район	1			1			1									1		2	
Костанайская область																		1	
Хакасская (ХК)																			4
Республика Хакасия													1					3	
Алтайская (АЛ)																			6
Республика Алтай	1						1											3	
Алтайский край*															1				
Тувинская (ТВ)																			24
Республика Тыва					2		9	1									1	11	
Байкальская (БК)																			20
Иркутская область																		2	
Республика Бурятия					2		2		1				3					10	
Забайкальская (ЗБ)																			20
Забайкальский край					1						1	4						14	
Всего особей	7	2	2	1	18	1	37	1	1	1	1	8	1	2	2	1	1	70	157

* Птица из Барнаульского зоопарка, предположительно из природы Алтайского края.

этой птицы неочевидна, мы исключили ее из последующего популяционно-генетического анализа, так же как и единственную предуральскую.

Генетическая изменчивость и дифференциация

Выборки из европейской и азиатской частей ареала сравнимы по количеству анализируемых особей. В них выявлено одинаковое число гаплотипов (11) и сегрегирующих сайтов (10) цитохрома *b* (табл. 2). В выборках с западной (азово-черноморская) и восточной (зabayкальская) окраин ареала обнаружено наиболее низкое гаплотипическое (Hd) и нуклеотидное (π) разнообразие по сравнению с другими выборками и со средними значениями

для Европы и Азии и вида в целом. Сниженные значения этих показателей зафиксированы также в хакасской выборке, которая является самой северной из исследованных.

Наибольшее число гаплотипов (9) обнаружено в прикаспийской выборке, а волго-уральская и зауральская обладали самым высоким гаплотипическим разнообразием. В целом значения показателей гаплотипического и нуклеотидного разнообразия, а также число нуклеотидных различий оказались выше в европейской части ареала ($Hd=0.768\pm0.027$, $\pi=0.00178\pm0.00018$, $k=1.371$) по сравнению с азиатской ($Hd=0.635\pm0.054$, $\pi=0.00130\pm0.00017$, $k=1.001$).

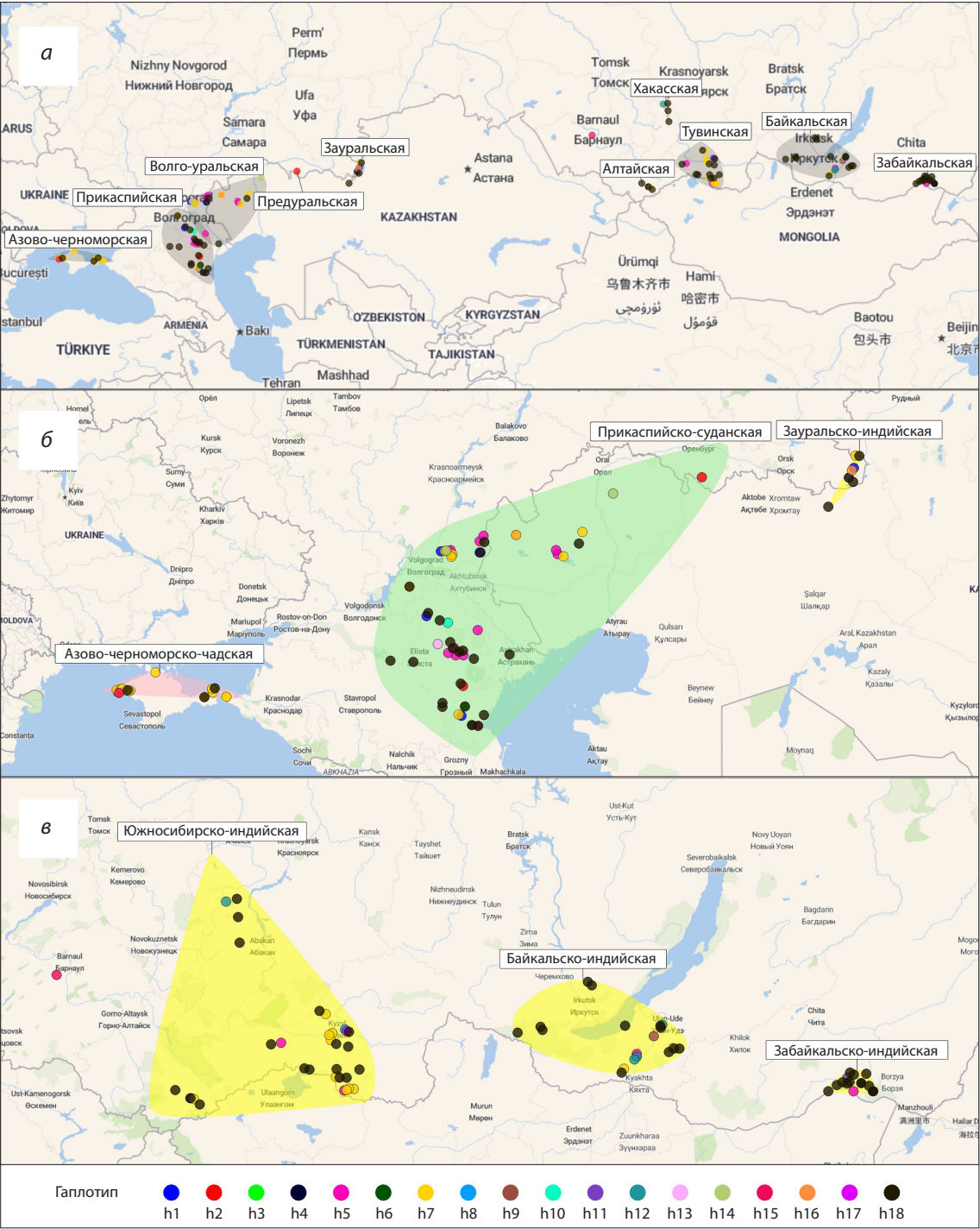


Рис. 1. Локализация гаплотипов цитохрома *b* красавки в изучаемых выборках (а) и субпопуляциях, выделенных по итогам исследования, в европейской (б) и азиатской (в) частях ареала.

Контуры субпопуляций условны, поскольку очерчивают только точки сбора материала.

Анализ сходства и пространственного распределения гаплотипов

На тепловой карте сходства гаплотипов выделяются два кластера (h1–h5 и h6–h18), внутри которых гаплотипы h5, h6, h7 и h18 демонстрируют наибольшее сходство с гаплотипами не из своей группы (рис. 2). Вероятно, это объясняется тем, что h5, h7 и h18 – самые распространенные гаплотипы, встречающиеся практически во всех

выборках изученной части ареала красавки. На медианной сети гаплотип h7 (и производный от него h6) находится между h5 и h18 (рис. 3).

Кластер, образованный h5, включает гаплотипы европейских выборок и географически близкой к ним зауральской, а кластер, в котором центральным является гаплотип h18, представлен по всему ареалу вида. Это также подтверждается кластеризацией особей на ML-дереве,

Таблица 2. Показатели полиморфизма и генетическая дифференциация выборок красавки по данным цитохрома *b*

Выборка	<i>N</i>	<i>Nh</i>	<i>S</i>	<i>Hd</i>	π	<i>k</i>	F_{ST}	G_{ST}	<i>Nm</i>
АЧ	21	4	5	0.414 ± 0.124	0.00091 ± 0.00037	0.705			
ПК	32	9	9	0.692 ± 0.079	0.00208 ± 0.00035	1.601			
ВУ	22	5	4	0.801 ± 0.043	0.00176 ± 0.00024	1.355			
Европа	75	11	10	0.768 ± 0.027	0.00178 ± 0.0018	1.371	0.105	0.158	2.13
ЗУ	7	5	5	0.857 ± 0.137	0.00247 ± 0.00062	1.905			
ХК	4	2	1	0.500 ± 0.265	0.00065 ± 0.00034	0.500			
АЛ	5	3	3	0.700 ± 0.218	0.00182 ± 0.00074	1.400			
ТВ	24	5	4	0.606 ± 0.062	0.00089 ± 0.00015	0.844			
БК	20	5	5	0.626 ± 0.110	0.00129 ± 0.00033	0.995			
ЗБ	20	4	4	0.489 ± 0.117	0.00090 ± 0.00029	0.695			
Азия	80	11	10	0.635 ± 0.054	0.00130 ± 0.00017	1.001	0.032	0.027	7.66
В среднем	Всего 155	18	16	0.732 ± 0.027	0.00170 ± 0.00014	1.263	0.116	0.128	1.91

Примечание. *N* – число особей; *Nh* – число гаплотипов; *S* – число сегрегирующих сайтов; *Hd* – гаплотипическое разнообразие; π – нуклеотидное разнообразие; *k* – среднее число нуклеотидных различий; F_{ST} и G_{ST} – показатели генетической дифференциации; *Nm* – поток генов. Выборки: АЧ – азово-черноморская, ПК – прикаспийская, ВУ – волго-уральская, ЗУ – зауральская, ХК – хакасская, АЛ – алтайская, ТВ – тувинская, БК – байкальская, ЗБ – забайкальская.

которое демонстрирует промежуточное положение особей с гаплотипом h7 относительно h5 и h18 с высокой степенью бутстреп-поддержки (рис. 4, а).

Дерево, построенное с использованием внешней группы, указывает на то, что гаплотипы цитохрома *b* не образуют одной монофилетической группы, а гаплотип h7 предположительно является анцестральным по отношению к двум другим наиболее распространенным гаплотипам h5 и h18 и их производным (см. рис. 4, б).

Генетическая дифференциация и поток генов

Генетические различия между изученными выборками в целом отражают их географическое положение друг относительно друга. Максимальные генетические различия установлены между наиболее удаленными азово-черноморской и забайкальской ($F_{ST} = 0.4675$), а также между самой северной хакасской выборкой и двумя европейскими – азово-черноморской и волго-уральской (табл. 3). Между географически близкими волго-уральской и зауральской; алтайской и тувинской; байкальской и забайкальской группировками генетическая дифференциация отсутствовала, так же как и между некоторыми другими выборками внутри европейской и азиатской частей ареала. Зауральская выборка, географически близкая к европейским, но относящаяся к азиатской группе, генетически не отличается от прикаспийской в Европе и алтайской и тувинской в Азии и слабо отличается от всех остальных изученных выборок, что, вероятно, обусловлено ее западным положением в азиатской части ареала. Генетическая дифференциация европейских выборок ($F_{ST} = 0.105$, $G_{ST} = 0.158$) сильнее, чем азиатских ($F_{ST} = 0.032$, $G_{ST} = 0.027$), что связано с более ограниченным потоком генов в Европе ($Nm = 2.13$) по сравнению с Азией ($Nm = 7.66$) (см. табл. 2). Средние значения этих показателей для вида

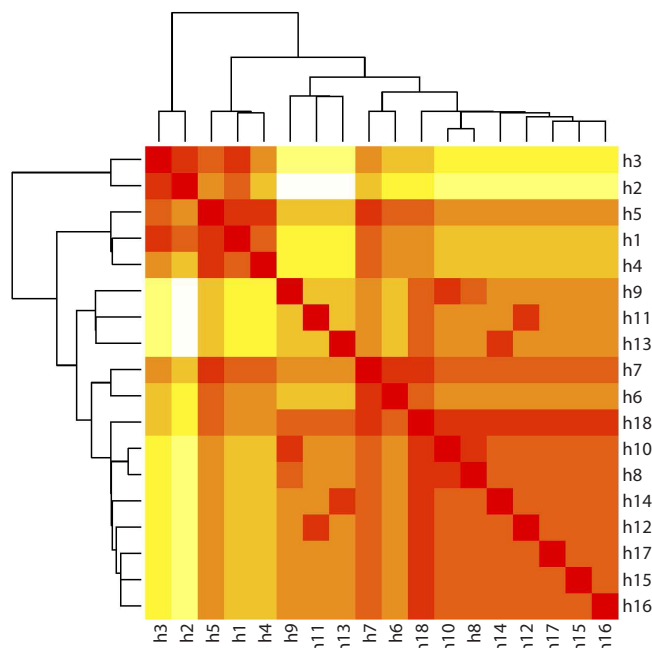


Рис. 2. Тепловая карта нуклеотидных различий между гаплотипами цитохрома *b* красавки.

Интенсивность цвета указывает на степень сходства (по убыванию от наиболее темного до самого светлого).

составили: $F_{ST} = 0.116$, $G_{ST} = 0.128$, $Nm = 1.91$. Тесты на селективную нейтральность цитохрома *b* были отрицательными и статистически незначимыми ($D = -1.514$, $F = -1.618$), что свидетельствует об отсутствии резких изменений численности вида в недавнем эволюционном прошлом, аналогично полученным нами ранее данным по контрольному региону (Mudrik et al., 2018, 2022).

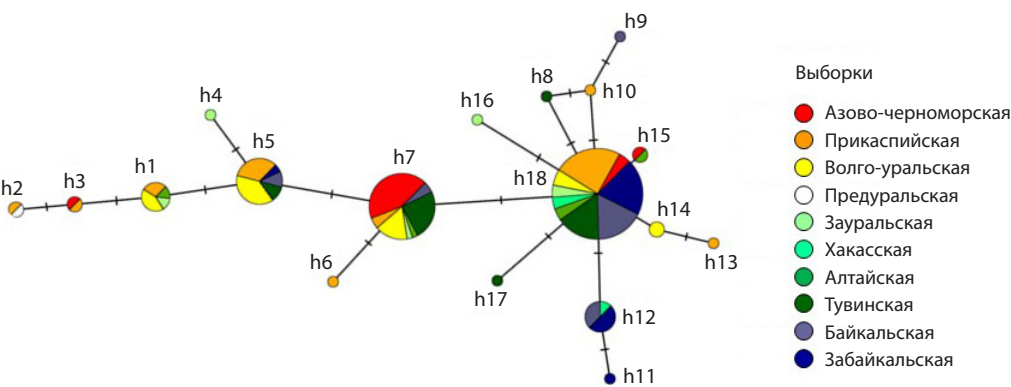


Рис. 3. Медианная сеть гаплотипов цитохрома *b* красавки, построенная с применением алгоритма TCS. Размер кружков пропорционален числу изученных особей, длина ветвей соответствует генетическим дистанциям, засечки обозначают число мутационных событий, сектора диаграмм отображают частоты гаплотипов в изученных выборках.

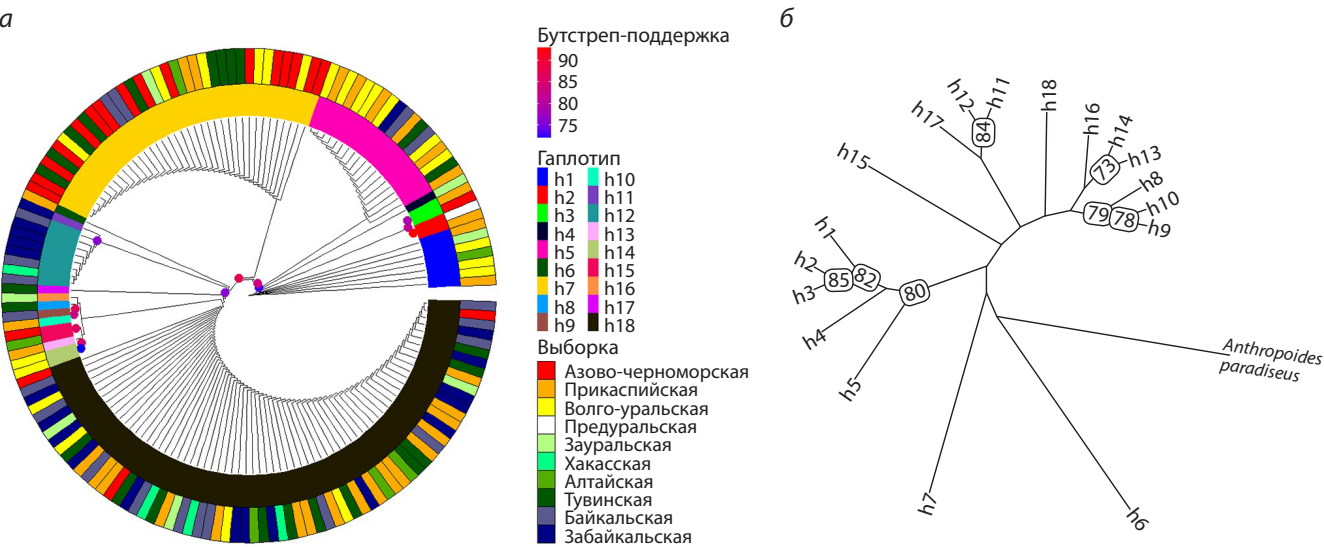


Рис. 4. Кластеризация по методу максимального правдоподобия (ML-деревья) особей (а) и гаплотипов (б) красавки по нуклеотидным последовательностям цитохрома *b*. На левом рисунке внешний круг иллюстрирует принадлежность особей к выборкам, внутренний – к гаплотипам.

Таблица 3. Парные значения показателей генетической подразделенности F_{ST} между выборками красавки по данным цитохрома *b*

Выборка	АЧ	ПК	ВУ	ЗУ	ХК	АЛ	ТВ	БК	ЗБ
АЧ	–								
ПК	0.1505	–							
ВУ	0.1237	0.0507	–						
ЗУ	0.0734	–0.0669	0	–					
ХК	0.5181	0.1996	0.4409	0.1367	–				
АЛ	0.0555	–0.1012	0.0096	–0.1566	0.0952	–			
ТВ	0.1148	0.0310	0.1487	–0.0354	0.2318	–0.0947	–		
БК	0.3015	0.0625	0.2551	0.0099	–0.0308	–0.0411	0.0549	–	
ЗБ	0.4675	0.1746	0.3939	0.1166	–0.1378	0.0812	0.2074	0.0003	–

Примечание. АЧ – азово-черноморская выборка, ПК – прикаспийская, ВУ – волго-уральская, ЗУ – зауральская, ХК – хакасская, АЛ – алтайская, ТВ – тувинская, БК – байкальская, ЗБ – забайкальская.

Таблица 4. Результаты распределения молекулярной изменчивости AMOVA в общей выборке красавки и при разделении ее на европейскую и азиатскую группы по данным цитохрома *b*

Источник изменчивости	df	Изменчивость, %	F_{ST}
I. Вся выборка			0.18570***
Между особями	9	18.56972	
Внутри особей	147	81.43028	
II. Европа и Азия			0.26524***
Между группами	1	16.82040	
Между особями	8	9.70327	
Внутри особей	147	73.47633	

Примечание. df – число степеней свободы; *** $p < 0.001$.

Согласно иерархическому анализу AMOVA, генетическая дифференциация всей изученной выборки красавки составила 18.57 % (уровень I: $F_{ST} = 0.18570$, $p < 0.001$), а при разделении на европейскую и азиатскую группы – 26.52 % (уровень II: $F_{ST} = 0.26524$, $p < 0.001$) (табл. 4).

Обсуждение

Анализ нуклеотидных последовательностей цитохрома *b* у красавки на большой географической шкале в репрезентативной выборке птиц из природы выявил полиморфизм рассматриваемого гена и более выраженную популяционно-генетическую структурированность вида по сравнению с данными, полученными ранее по контрольному региону мтДНК (Mudrik et al., 2018, 2022). Самое низкое гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие обнаружено в самой западной (Азово-Черноморье), самой восточной (Забайкалье) и самой северной (Хакасия) выборках, что может быть обусловлено обитанием вида на краях ареала. Наивысшие значения этих показателей выявлены за Волгой и по обе стороны Урала в волго-уральской и зауральской выборках. Самое большое число гаплотипов, в том числе уникальных, обнаружено в Прикаспии.

Структура генофонда красавки по цитохрому *b* сформирована тремя наиболее распространенными гаплотипами, h5, h7 и h18, из которых предположительно анцестральным является наиболее частый гаплотип из Азово-Черноморья – h7. Следует отметить, что азово-черноморские красавки отличаются от других европейских и тем более азиатских своими миграционными путями над Черным и Средиземным морями и местом зимовки в Республике Чад на стыке Северной и Центральной Африки, которое обнаружено недавно с помощью GPS-GSM-телеметрии (Ильяшенко и др., 2021). По всей видимости, такая особенность и большее по сравнению с другими гаплотипами сходство с аутгруппой (африканским видом – райской красавкой) имеют под собой эволюционную основу, которую надо изучать далее с применением геномных методов.

Самый частый во всей изученной выборке красавки гаплотип h18, преобладающий на Алтае и в Хакасии и в равных долях с высокими частотами встречающийся в Тыве, Бурятии и Забайкалье (см. рис. 1, а), формирует «звезду», от которой произошло большинство остальных гаплотипов цитохрома *b*, в том числе уникальных (см.

рис. 3). Птицы из упомянутых азиатских выборок используют общие места зимовки в штатах Раджастан и Гуджарат в Индии и совершают кольцевые миграции, осенью пересекая Гималаи, а весной обигая Тянь-Шань с запада и используя совместно значительную часть пролетного пути (Ильяшенко и др., 2021), что может способствовать потоку генов и снижению генетической подразделенности красавок в Азии. Генетические различия между забайкальскими и байкальскими; алтайскими и тувинскими; байкальскими, алтайскими и хакасскими выборками практически отсутствуют (см. табл. 3).

Наконец, третий из вышеупомянутых структурообразующих гаплотипов, h5, лежащий на медианной сети по другую, нежели h18, сторону от центрального гаплотипа h7, наиболее распространен в Прикаспии и Заволжье и образует ветвь «европейских» гаплотипов, куда также входят гаплотипы из Предуралья и Зауралья. Следует отметить, что ранее выделенные волго-уральская и прикаспийская гнездовые группировки (Белик и др., 2011) по сути представляют собой единую генетически однородную (см. табл. 3, рис. 1, б) субпопуляцию, использующую один миграционный маршрут над Аравийским полуостровом и Красным морем на места зимовки в Африке – Судан и частично Эфиопию (Ильяшенко и др., 2021). Единственная изученная особь из Предуралья обладала таким же гаплотипом, как одна из птиц в Калмыкии (прикаспийская выборка) (см. табл. 1), и использовала тот же пролетный путь и предотлетное место скопления в долине Маныча, что и прикаспийские и волго-уральские красавки (Ильяшенко и др., 2021, 2024), что тоже позволяет отнести ее к данной субпопуляции. Особенный интерес в «европейской» группе гаплотипов вызывает присутствие половины гаплотипов из Зауралья. Хотя зауральская выборка географически близка к европейским в гнездовой части ареала (см. рис. 1, а), ее место зимовки находится в Индии, как у всех остальных азиатских красавок. Однако птицы из Зауралья летят и осенью, и весной одним и тем же маршрутом через Казахстан, Узбекистан, Таджикистан и Пакистан, не совершая кольцевой миграции (Ильяшенко и др., 2021). Согласно значениям F_{ST} , у зауральских красавок отсутствуют генетические различия с волго-уральской и прикаспийской выборками на западе ареала и с алтайской, тувинской и байкальской выборками на востоке, а с географически краевыми (азово-черномор-

ской, забайкальской и северной хакасской) различия находилась в пределах 7–13 % (см. табл. 3). Таким образом, мы предполагаем, что Зауралье в определенной степени интегрирует генофонд красавки, возможно, благодаря потоку генов между европейской и азиатской частями ареала через Центральный и Восточный Казахстан, что требует дальнейшего изучения с помощью ДНК-маркеров и проверки независимыми методами. Для более полного представления о генофонде красавки необходимы популяционно-генетические исследования в Казахстане и Монголии – странах с наибольшей численностью вида.

Заключение

Мы показали эффективность использования последовательностей менее вариабельного, чем контрольный регион, но демонстрирующего более высокую степень межпопуляционной дифференциации митохондриального гена цитохрома *b* для выявления популяционно-генетической структуры красавки. Исходя из определения термина «субпопуляция» (скрещивающиеся между собой особи с сильно ограниченной миграцией) и соответствия данных внутривидовой генетической дифференциации красавки пролетным путям птиц из разных частей ареала, охарактеризованным ранее с помощью дистанционного слежения (Ильяшенко и др., 2021), мы предлагаем выделить в структуре вида субпопуляции, отражающие в названии их места гнездования и зимовки: 1) азово-черноморско-чадскую (Азово-Черноморье – Чад); 2) прикаспийско-суданскую (Прикаспий, Заволжье, Предуралье – Судан); 3) зауральско-индийскую (восток Оренбургской области, Северный Казахстан и предположительно Челябинская область – Индия); 4) южносибирско-индийскую (Алтай, Хакасия, Тыва – Индия); 5) байкальско-индийскую (Бурятия, Иркутская область – Индия) и 6) забайкальско-индийскую (Забайкальский край – Индия) (см. рис. 1, б, в).

Полученные результаты создают основу для мониторинга генетического разнообразия красавки и разработки научного обоснования мер ее охраны на уровне вида, субпопуляций и локальных гнездовых группировок. Дальнейшие комплексные исследования (дистанционное слежение и молекулярно-генетический анализ) в других частях ареала будут способствовать более полному пониманию факторов изоляции и интеграции генофонда этого вида журавлей.

Список литературы / References

Белик В.П., Гугуева Е.В., Ветров В.В., Милобог Ю.В. Красавка в Северо-Западном Прикаспии: распространение, численность, успешность размножения. В: Журавли Евразии (биология, распространение, миграции, управление). Т. 4. М.: Т-во науч. изданий КМК, 2011;157-174
[Belik V.P., Guguyeva E.V., Vetrov V.V., Milobog Y.V. The Demoiselle Crane in the northwestern Caspian lowland: distribution, number, and breeding success. In: Cranes of Eurasia (Biology, Distribution, Migrations, Management). Vol. 4. Moscow, 2011;157-174 (in Russian)]
Ильяшенко Е.И. Журавль-красавка *Anthropoides virgo* (Linnaeus, 1758). В: Красная книга Российской Федерации. Животные. М.: ВНИИ Экология, 2021;689-691
[Ilyashenko E.I. Demoiselle crane. In: The Red Book of the Russian Federation. Animals. Moscow: VNIИ Ecologiya Publ., 2021;689-691 (in Russian)]

Ильяшенко Е.И., Мудрик Е.А., Андрищенко Ю.А., Белик В.П., Белялов О.В., Вikelьски М., Гаврилов А.Э., Горошко О.А., Гугуева Е.В., Корепов М.В., Мнацеканов Р.А., Политов Д.В., Постельных К.А., Лей С., Ильяшенко В.Ю. Миграции красавки (*Anthropoides virgo*, Gruiformes): дистанционное слежение на путях пролета и зимовках. *Зоологический журнал*. 2021;100(9): 1028-1054. doi 10.31857/S0044513421070059
[Ilyashenko E.I., Mudrik E.A., Andryushchenko Yu.A., Belik V.P., Belyalov O.V., Wikelski M., Gavrilov A.E., Goroshko O.A., Guguyeva E.V., Korepov M.V., Mnatsekanov R.A., Politov D.V., Postelnykh K.A., Lei C., Ilyashenko V.Yu. Migrations of the Demoiselle Crane (*Anthropoides virgo*, Gruiformes): remote tracking along flyways and at wintering grounds. *Biol Bull*. 2022;49(7):863-888. doi 10.1134/S1062359022070068]
Ильяшенко Е.И., Кондракова К.Д., Мудрик Е.А., Вikelьски М., Лей С., Ильяшенко В.Ю. Характер использования красавкой (*Anthropoides virgo*, Linnaeus 1758) европейской части ареала в весенне-летний и предмиграционный периоды. *Аридные экосистемы*. 2024;30(2):81-90. doi 10.24412/1993-3916-2024-2-81-90
[Ilyashenko E.I., Kondrakova K.D., Mudrik E.A., Wikelski M., Lei S., Ilyashenko V.Yu. The feature of the use by the Demoiselle Crane (*Anthropoides virgo*, Linnaeus 1758) the European part of the range in the spring-summer and the pre-migratory periods. *Arid Ecosystems*. 2024;14(2):209-217. doi 10.1134/S2079096124700100]
BirdLife International. *Anthropoides virgo*. The IUCN Red List of Threatened Species. 2018. Available at: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T22692081A131927771.en>
BirdLife International. *Anthropoides virgo* (Europe assessment). The IUCN Red List of Threatened Species. 2021. Available at: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-3.RLTS.T22692081A166235355.en>
Bivand R.S., Pebesma E., Gomez-Rubio V. Applied Spatial Data Analysis with R. NY: Springer, 2013. doi 10.1007/978-1-4614-7618-4
Campitelli E. ggnewscale: Multiple Fill and Colour Scales in 'ggplot2'. R package version 0.5.0.9000. 2024. doi 10.5281/zenodo.2543762
Clement M., Snell Q., Walke P., Posada D., Crandall K. TCS: estimating gene genealogies. In: Proceedings 16th International Parallel and Distributed Processing Symposium. IEEE, 2002;184. doi 10.1109/IPDPS.2002.1016585
Hasegawa M., Kishino H., Yano T.-A. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol*. 1985; 22(2):160-174. doi 10.1007/BF02101694
Hoang D.T., Chernomor O., von Haeseler A., Minh B.Q., Vinh L.S. UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol Biol Evol*. 2018;35(2):518-522. doi 10.1093/molbev/msx281
Ilyashenko E.I. Demoiselle Crane (*Anthropoides virgo*). In: Miranda C.M., Harris J.T. (Eds) Crane Conservation Strategy. Baraboo, Wisconsin, USA: International Crane Foundation, 2019;383-396
Kahle D., Wickham H. ggmap: spatial visualization with ggplot2. *R J*. 2013;5(1):144-161. doi 10.32614/RJ-2013-014
Kalyaanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K.F., von Haeseler A., Jermiin L.S. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods*. 2017;14(6):587-589. doi 10.1038/nmeth.4285
Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(14):3059-3066. doi 10.1093/nar/gkf436
Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T., Ashton B., Mentjies P., Drummond A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012;28(12):1647-1649. doi 10.1093/bioinformatics/bts199
Leigh J.W., Bryant D. PopART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol*. 2015;6(9):1110-1116. doi 10.1111/2041-210X.12410

- Librado P., Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 2009;25(11):1451-1452. doi 10.1093/bioinformatics/btp187
- Minh B.Q., Schmidt H.A., Chernomor O., Schrempf D., Woodhams M.D., von Haeseler A., Lanfear R. IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol Biol Evol*. 2020;7(5):1530-1534. doi 10.1093/molbev/msaa015
- Mudrik E.A., Ilyashenko E.I., Goroshko O.A., Kashentseva T.A., Korepov M.V., Sikorskiy I.A., Dzhmirzoev G.S., Ilyashenko V.Yu., Politov D.V. The Demoiselle crane (*Anthropoides virgo*) population genetic structure in Russia. *Vavilov J Genet Breed*. 2018;22(5):586-592. doi 10.18699/VJ18.398
- Mudrik E.A., Ilyashenko E.I., Ilyashenko V.Yu., Postelnykh K.A., Kashentseva T.A., Korepov M.V., Goroshko O.A., Nechaeva A.V., Politov D.V. Genetic diversity and differentiation of the widespread migratory Demoiselle Crane, *Grus virgo*, on the northern edge of the species' distribution. *J Ornithol*. 2022;163(1):291-299. doi 10.1007/s10336-021-01919-4
- Pebesma E.J., Bivand R. Classes and methods for spatial data in R. *R News*. 2005;5(2):9-13
- R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Manual. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2022
- Slowikowski K. ggrepel: Automatically Position Non-Overlapping Text Labels with 'ggplot2'. 2024. Available at: <https://ggrepel.slowkow.com/>
- Strimas-Mackey M. smoothr: Smooth and Tidy Spatial Features. 2023. Available at: <https://github.com/mstrimas/smoothr>
- Sun C.-H., Liu H.-Y., Xu P., Lu C.-H. Genetic diversity of wild wintering red-crowned crane (*Grus japonensis*) by microsatellite markers and mitochondrial *Cyt B* gene sequence in the Yancheng reserve. *Anim Biotechnol*. 2020;32(5):531-536. doi 10.1080/10495398.2020.1725538
- Toparslan E., Karabag K., Bilge U. A workflow with R: phylogenetic analyses and visualizations using mitochondrial cytochrome *b* gene sequences. *PLoS One*. 2020;15(12):e0243927. doi 10.1371/journal.pone.0243927
- Trifinopoulos J., Nguyen L.-T., von Haeseler A., Minh B.Q. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(1):W232-W235. doi 10.1093/nar/gkw256
- Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer, 2016. doi 10.1007/978-3-319-24277-4
- Wright K. pals: Color Palettes, Colormaps, and Tools to Evaluate Them. R package version 1.9. 2024. Available at: <https://kwstat.github.io/pals/>
- Xu S., Dai Z., Guo P., Fu X., Liu S., Zhou L., Tang W., Feng T., Chen M., Zhan L., Wu T., Hu E., Jiang Y., Bo X., Yu G. ggtreeExtra: compact visualization of richly annotated phylogenetic data. *Mol Biol Evol*. 2021;38(9):4039-4042. doi 10.1093/molbev/msab166
- Yu G. Using ggtree to visualize data on tree-like structures. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2020;69(1):e96. doi 10.1002/cpbi.96
- Yu G. Data Integration, Manipulation and Visualization of Phylogenetic Treess. Chapman and Hall, 2022. doi 10.1201/9781003279242
- Yu G., Smith D., Zhu H., Guan Y., Lam T.T.-Y. ggtree: an R package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods Ecol Evol*. 2017;8(1):28-36. doi 10.1111/2041-210X.12628
- Yu G., Lam T.T.-Y., Zhu H., Guan Y. Two methods for mapping and visualizing associated data on phylogeny using ggtree. *Mol Biol Evol*. 2018;35(2):3041-3043. doi 10.1093/molbev/msy194
- Zardoya R., Meyer A. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates. *Mol Biol Evol*. 1996;13(7):933-942. doi 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025661

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 03.10.2024. После доработки 10.12.2024. Принята к публикации 10.12.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-61

Генетическая изменчивость и филогеография сорок рода *Pica* Голарктики

А.П. Крюков 

Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

 kryukov@biosoil.ru

Аннотация. Для объяснения истории формирования популяционно-генетической структуры видов часто привлекают теорию плейстоценовых рефугиумов. Однако она не может охватить все многообразие видоспецифических особенностей и природных ситуаций. Широко распространенный в Голарктике род сорок *Pica* оказался удобным для построения картины филогеографии с целью познания процессов диверсификации и видообразования. Маркеры митохондриальной ДНК по-прежнему широко используются в филогеографических исследованиях, несмотря на прогресс методов полногеномного секвенирования. Представлен обзор результатов анализа изменчивости контрольного региона (CR) митохондриальной ДНК по опубликованным нами данным от 279 образцов, представляющих подавляющее большинство таксонов сорок. На филогенетических деревьях и сетях гаплотипов мы обнаружили, помимо реципрокной монофилии аллопатрических видов и подвидов, примеры парафилии и полифилии. Контурные диаграммы демографии популяций показали разную продолжительность жизни линий после их основания либо прохождения «бутылочного горлышка», как в камчатской популяции, и неодинаковую интенсивность экспансий. Видообразование сорок проходило, вероятно, по географической модели за счет расселения и викарирования, в том числе с изоляцией и дивергенцией в рефугиумах. В ряде случаев предполагается перипатрическое видообразование за счет отделения краевых изолятов. По гаплотипическому составу молодых популяций островов Хоккайдо и Кюсю прослежены материковые источники их происхождения. Случаи незавершенного видообразования выявлены по наличию неполной сортировки линий, приводящей к парафилии, либо современной межвидовой интрогрессии ядерных генов. Предложены гипотезы формирования ареалов некоторых таксонов сорок. Привлечение большого объема литературы позволило сопоставить отмеченные в роде *Pica* разнообразные эволюционные сценарии с описанными для других видов птиц.

Ключевые слова: митохондриальная ДНК; контрольный регион; видообразование; рефугиум; ареал; плейстоцен

Для цитирования: Крюков А.П. Генетическая изменчивость и филогеография сорок рода *Pica* Голарктики. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2025;29(4):578-593. doi 10.18699/vjgb-25-61

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 121031500274-4).

Благодарности. За участие в проектах, положивших основу данной работе, я благодарен Л.Н. Спиридоновой, Э. Харинг (Австрия), О.А. Горошко, С. Эдвардсу, К. Коллиер и Б. Фану (США), С.-И. Ли (Корея), Б. Дорда (Испания), Х. Сузуки и С. Мори (Япония), К.А. Крюкову, Е.Г. Лобкову, А.Ю. Архипову и А.П. Тюнину. Приношу благодарность Я.А. Редькину за предоставление карты ареалов сорок.

Genetic variation and phylogeography of the magpie's genus *Pica* in the Holarctic

A.P. Kryukov 

Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

 kryukov@biosoil.ru

Abstract. The theory of Pleistocene refugia is often used to explain the population genetic structure of species. However, it does not fully account for the diversity of species-specific characteristics and natural conditions. The genus *Pica*, which is widespread in the Holarctic, provides an ideal model for studying phylogeographic patterns in order to better understand processes of diversification and speciation. Markers of mitochondrial DNA remain widely used in phylogeographic studies, despite advances of whole genome techniques. We have summarized published research on the mitochondrial DNA Control Region (CR) variation, based on data from 279 samples which represent the majority of extant taxa across the entire distribution range of the genus. In the phylogenetic trees and networks, we found several cases of reciprocal monophyly among most allopatric species and subspecies, and in addition some examples of paraphyly and polyphyly. Bayesian skyline plots were calculated to explore population dynamics over time. They showed varying longevity of the lineages since their origin or after experiencing a bottleneck, e. g., in the case of the Kamchatka popula-

tion, as well as unequal rates of expansion. In most cases, speciation followed a geographic model involving expansion and vicariance, sometimes with divergence in refugia. Somewhere, peripatric speciation may have happened due to separation of a marginal populations. By comparing haplotype composition among populations, we traced the origin of the recently established populations on Hokkaido and Kyushu islands from a limited number of colonizers from the mainland. Isolated cases of species *in statu nascendi* were identified through evidence of incomplete lineage sorting, leading to paraphyly, or signs of limited unidirectional interspecies introgression of nuclear genes in secondary contact zones. Several hypotheses regarding the formation of the magpie's range are proposed. Various evolutionary scenarios found in the genus *Pica* were compared to those reported for the other bird species in a number of literature sources.

Key words: mitochondrial DNA; Control Region; speciation; refugia; range; Pleistocene

For citation: Kryukov A.P. Genetic variation and phylogeography of the magpie's genus *Pica* in the Holarctic. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(4):578–593. doi 10.18699/vjgb-25-61

Введение

Современное распространение и генетическая структура видов определяются в основном событиями, произошедшими в четвертичном периоде (Avice, Walker, 1998; Hewitt, 2000). При этом часто недооцениваются процессы, накладывающиеся на предыдущие, такие как инвазии и движения границ ареалов, экологические и антропогенные изменения, колебания численности популяций и вторичные контакты с гибридизацией или без нее. Разграничение их генетических последствий необходимо для более полного понимания многообразных процессов диверсификации и видообразования. Широко распространенные политипические виды или комплексы близких видов представляют особый интерес для построения гипотез формирования ареалов и познания механизмов дивергенции. На решение обширного круга эволюционно-генетических проблем направлены подходы современной филогеографии (Avice, 2000; Банникова, 2004; Абрамсон, 2007; Zink, Barrowclough, 2008; Холодова, 2009; Edwards et al., 2015, 2016a, b, 2022).

В филогеографии птиц и других животных достигнуты большие успехи (Zink, 1996; Joseph, Omland, 2009; Hickerson et al., 2010; Toews, Brelsford, 2012; McCormack et al., 2013; Ottenburghs et al., 2019; Pârâu, Wink, 2021; Fu, Wen, 2023). Расширяются мультилокусные и геномные базы данных, усложняются аналитические подходы и тестирования гипотез, моделируются экологические ниши, развивается сравнительная и статистическая филогеография. С использованием главным образом традиционных маркеров митохондриальной ДНК выявлены филогеографические структуры у многих видов птиц, прежде всего Европы и Америки. Эти структуры и видообразование обычно связывают с феноменом рефугиумов, когда повторяющиеся циклы ледниковых периодов приводили к отступлению популяций южнее с образованием изолятов (Taberlet et al., 1998; Hewitt, 2000, 2004). Популяции в них дивергировали ввиду дрейфа генов и/или отбора, и при достаточно длительной изоляции, например в течение нескольких циклов, могло начинаться видообразование. В рефугиумах популяции проходили «бутылочное горлышко» с падением изменчивости; в других случаях она, напротив, повышалась, если там сливались дивергировавшие популяции. В короткие межледниковые периоды происходили экспансии ареалов, особенно после последнего ледникового максимума (LGM), когда популяции встречались с новыми условиями и тоже могли дивергировать в одних случаях либо образовывать зоны контакта с другими популяциями.

Однако теория рефугиумов не может объяснить все многообразие природных ситуаций. Соответственно, гипотеза постгляциальной экспансии предоставляет альтернативный путь видообразования за короткое время, в отличие от процесса изоляции в рефугиуме на протяжении ряда ледниковых циклов (Hansson et al., 2008). Исключительно быстрое видообразование описано для рода *Junco*, когда всего за ~10 тыс. лет за счет единственной широкой постледниковой экспансии возникло пять генетически обособленных морфотипов видового уровня (Mila et al., 2007). Это противоречит представлениям о видообразовании в течение всего плейстоцена (Avice, Walker, 1998) или за последние 250 тыс. лет (Johnson, Cicero, 2004). По другим данным, наоборот, основные события диверсификации и видообразования начинались раньше, еще в плиоцене, но завершались в плейстоцене (Klicka, Zink, 1997). В некоторых случаях филогеографические разрывы могут возникать на непрерывном ареале без географических барьеров, особенно когда дистанции индивидуального расселения и/или размеры популяций уменьшаются, как показано для зеленой пеночки *Phylloscopus trochiloides* (Irwin, 2002). Все эти процессы многообразны, как правило, видоспецифичны и недостаточно изучены.

Одна из самых банальных птиц – сорока – таит немало загадок. Виды рода сорока (*Pica*) широко распространены в Голарктике от Западной Европы до Северной Америки и от арктической тундры до пустынь Аравии (рис. 1) и включают формы разной степени близости и родства. Помимо «хороших» аллопатрических видов, некоторые формы уровня подвидов интерградируют в Евразии, другие образуют изоляты, что вызывает закономерные споры об их таксономическом ранге: вид – подвид. Интересно, что симпатрических видов сорок не существует. Долгое время всех сорок относили к одному виду *P. pica* (Linnaeus, 1758) с 9–15 подвидами, но с внедрением генетических подходов его значительно раздробили. Современные схемы выделяют до 7 видов сорок (Song et al., 2018; Madge et al., 2020; Gill et al., 2021), хотя таксономия рода до сих пор дискуссионна.

Изолированные популяции Северной Африки, Аравийского полуострова и Центрального Китая по анализу митохондриальных генов и отчасти по ядерным маркерам признаны отдельными видами: магрийская сорока *P. mauritanica* Malherbe, 1845, аравийская сорока *P. asirensis* Bates, 1936 и тибетская сорока *P. bottanensis* Delessert, 1840 (изоляция последнего неполная) соответственно (Song et al., 2018). Аналогично две аллопатрические формы Северной Америки – черноклювая сорока *P. hudsonia* (Sabine,

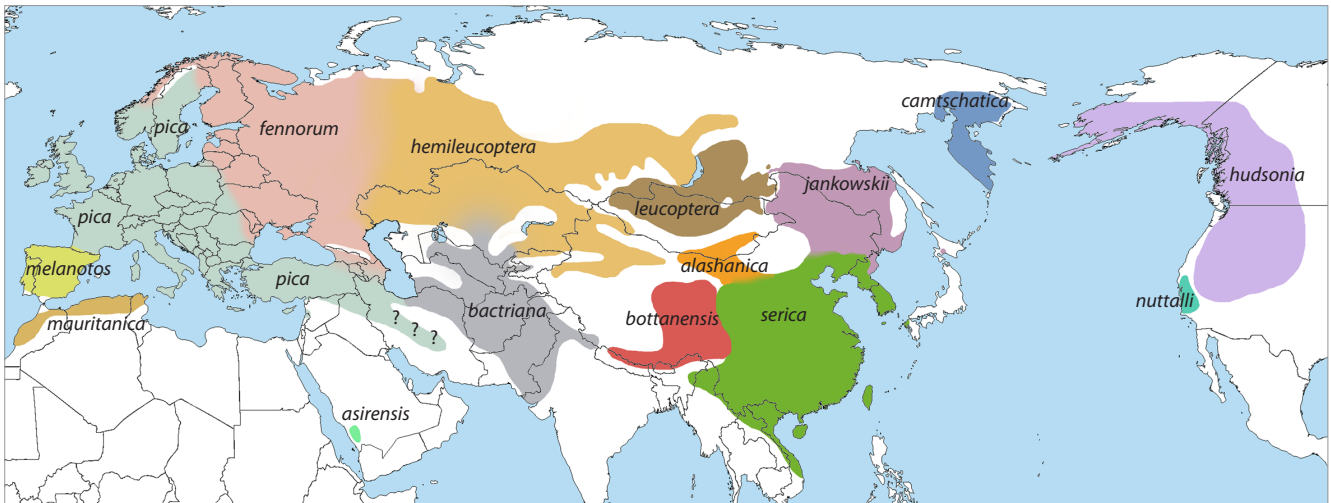


Рис. 1. Ареал сорок рода *Pica*, по (Kryukov et al., 2022), с изменениями.

1823) и желтоклювая сорока *P. nuttalli* (Audubon, 1837) – обладают выраженными фенотипическими различиями и незначительной, но явной генетической дивергенцией при реципрокной монофилии на деревьях по отдельным генам (Song et al., 2018) и полным митогеномам (Kryukov et al., 2020, 2024), что подтверждает их видовой статус. При этом изолят Камчатки и прилежащих территорий оказался сестринским с номинативным подвидом (Lee S. et al., 2003) и традиционно считается подвидом *P. pica camtschatica*, однако обсуждается поднятие его ранга до видowego.

Обнаружен и обследован разрыв ареалов между западной и восточной группами подвидов в Южной Сибири с дивергенцией между ними 4–5 % по гену *cytB* и CR мтДНК (Kryukov et al., 2004, 2017; Haring et al., 2007) и отличиями в звуковой коммуникации (Ebels, 2003; Kryukov et al., 2017), помимо фенотипических различий. Все это послужило достаточным основанием для выделения восточной сороки *P. serica* Gould, 1845 из прежде единого вида сороки *P. pica* (Song et al., 2018; Madge et al., 2020). Таким образом, таксономическая схема рода включает монотипические виды *P. mauritanica*, *P. asirensis*, *P. botanensis*, *P. hudsonia* и *P. nuttalli* и политипические виды *P. pica* с подвидами *P. p. pica* (Linnaeus, 1758), *P. p. fenorum* Lönnberg, 1927, *P. p. hemileuoptera* Stegmann, 1928, *P. p. bactriana* Bonaparte, 1850, *P. p. leucoptera* Gould, 1862, *P. p. melanotos* A.E. Brehm, 1857 и *P. p. camtschatica* Stejneger, 1884 и *P. serica* с подвидами *P. s. serica* Gould, 1845, *P. s. jankowskii* Stegmann, 1928 и *P. s. alashanica* Stegmann, 1928 (Winkler et al., 2020; Gill et al., 2021, с небольшими уточнениями в подвидах).

Упомянутый разрыв ареала между *P. pica* и *P. serica* заслуживает особого внимания. Он отмечался орнитологами еще в прошлом веке (Штегман, 1932; Рустамов, 1954), но в большинстве крупных сводок игнорировался, и ареал *P. pica* выглядел как сплошной от Пиренейского полуострова до Охотского моря (Goodwin, 1986; del Hoyo, Collar, 2016). Мы выяснили, что этот разрыв существует и совпадает с разрывом по мтДНК, однако заполняется на наших глазах за счет расселения восточного подвида *P. s. jankowskii* на запад вдоль долины Амура и сибирского

подвида *P. p. leucoptera* в обратном направлении (Горошко и др., 2018). Несколько десятилетий назад они начали гибридизировать, чему посвящено недавнее интегративное исследование с выявлением асимметричной интрогрессии по ядерному однонуклеотидному полиморфизму (SNP) (Kryukov et al., 2022). При этом показана достоверно пониженная успешность размножения в гибридогенной популяции Восточной Монголии, очевидно, приводящая к отбору против гибридов и ограничивающая интрогрессию (Kryukov, 2019; Крюков, Горошко, 2024).

Несмотря на неплохую изученность распространения, экологии и изменчивости сорок на протяжении всего ареала рода, полной картины взаимоотношений и происхождения таксонов и рода в целом нет. Цель работы – подытожить собственные и литературные данные по генетической изменчивости, филогеографии и популяционной демографии всех таксонов сорок и предложить гипотезу формирования ареалов. Основным генетическим маркером для анализа послужил контрольный регион митохондриальной ДНК (CR) – один из самых распространенных маркеров, успешно работающий на низших уровнях таксономической иерархии и широко используемый для целей филогеографии. Этот некодирующий участок относится к наиболее изменчивым и филогенетически информативным регионам мтДНК (Baker, Marshall, 1997; Saunders, Edwards, 2000; Barker et al., 2012). Всего нами получено и проанализировано 279 последовательностей протяженностью от 1298 до 1310 пар нуклеотидов у образцов, представляющих большинство таксонов рода *Pica* (Kryukov et al., 2004, 2017, 2022; Haring et al., 2007). Источники образцов и каталожные номера, места сборов с координатами и номера доступа в ГенБанке указаны в табл. S1¹. Для *P. hudsonia* и *P. nuttalli* фрагменты CR извлечены из полных митогеномов (Kryukov et al., 2024). При обсуждении результатов привлечены литературные данные по митохондриальным и ядерным генам. Для анализа нуклеотидной и гаплотипической изменчивости, тестов нейтральности, построения филогенетических и

¹ Табл. S1 и рис. S1 см. по адресу:

<https://vavilov-jcg.ru/download/pict-2025-29/appx21.pdf>

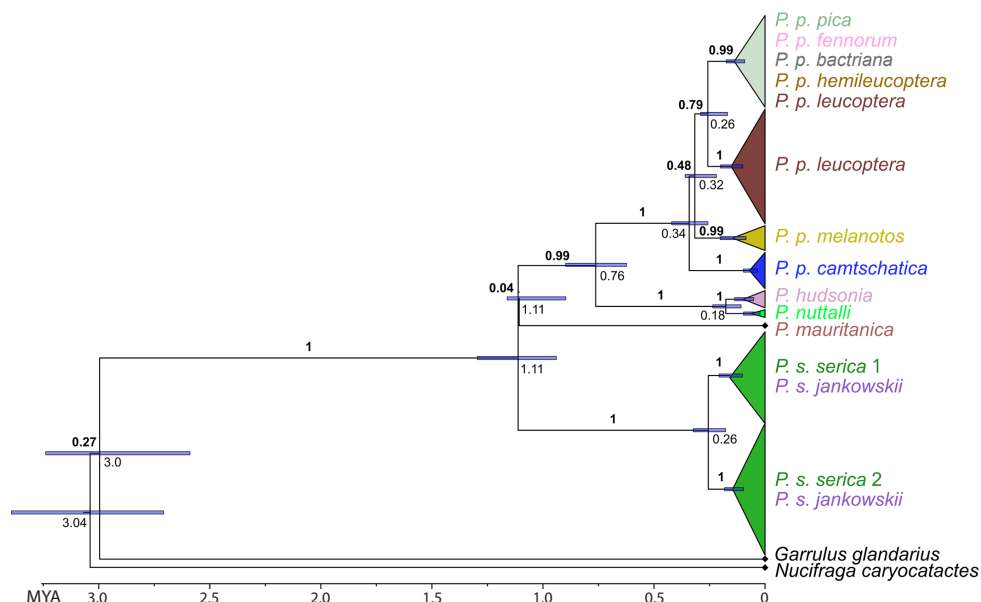


Рис. 2. Калиброванное по времени древо сорок, построенное по байесовому методу в программе Beast. Апостериорные вероятности узлов даны жирным шрифтом. Синие прямоугольники показывают 95 % доверительный интервал для оценки времен дивергенции, указанных рядом с узлами. Цвета имен таксонов соответствуют цветам на карте ареалов и сети гаплотипов. Ширина треугольников соответствует числу образцов.

байесовых деревьев, сетей гаплотипов, моделирования динамики популяций и оценки времен дивергенции линий применены общепринятые подходы, описанные в приведенных выше публикациях автора с необходимой библиографией.

История формирования рода *Pica*

Происхождение рода *Pica* и родственные связи сорок до сих пор не установлены. Согласно молекулярно-филогенетическим реконструкциям, предковые формы врановых Corvidae, ранее именовавшиеся “core Corvoidea”, диверсифицировали при островной радиации в результате формирования архипелага прото-Папуа после отделения от Австралии в позднем эоцене–олигоцене (Jönsson et al., 2011; Aggerbeck et al., 2014) и позже распространились по Азиатскому и другим континентам. Семейство Corvidae *sensu stricto* предположительно формировалось в Юго-Восточной Азии (Ericson et al., 2005), но филогенетическое положение рода *Pica* не установлено, и в разных работах указываются разные близкородственные и сестринские рода. В качестве ближайших к *Pica* сестринских родов определены: *Ptilostomus* и *Podoces* – по анализу последовательностей одного митохондриального и двух ядерных генов (Ericson et al., 2005), *Zavattariornis* – по гену *cytB* (Ekman, Ericson, 2006), *Nucifraga* и *Perisoreus* – по митохондриальному контрольному региону (Haring et al., 2012), *Podoces* и *Carrulus* – по полному митогеному (Iqbal et al., 2020). Однако ни в одной работе не приведен полный набор возможных родственных родов, поэтому представления о происхождении рода *Pica* остаются умозрительными.

Базальное положение восточной сороки *P. serica* на филогенетическом древе (рис. 2) подтверждает положение о происхождении рода *Pica* в Юго-Восточной Азии. Даль-

нейшее распространение восточной сороки по континенту связывают с голоценовыми центрами агрокультуры в Южном Китае и Месопотамии (Назаренко, 1982). Однако наши датировки относят события дивергенции основных линий к более раннему времени, 1 млн–200 тыс. лет назад (далее тыс. л. н.) (см. рис. 2). Есть основания полагать, что формирование сороки как рода связано с пастбищными млекопитающими, которые предоставляли им пищу в виде эктопаразитов на их теле, насекомых и других мелких животных, выпугиваемых из травостоя при пастыбе; предполагался даже мутуализм с копытными (Londei, 2018). Длинный ступенчатый хвост сорок первоначально мог служить балансиrom на спинах копытных и лишь вторично способствовать маневренному полету среди деревьев (Londei, 2018). Соответственно, сорока могла распространяться преимущественно по травянистым экосистемам и пастбищам. С появлением и ростом населения сорока, благодаря своей высокой адаптивности, внедрилась в антропогенные ландшафты и населенные пункты и интенсивно в них размножилась. Сороки оседлы, но склонны к бродяжничеству и расселению путем случайных заносов на кораблях (hitchhiking), что описано ниже.

Филогения сорок

Несмотря на довольно короткий участок проанализированного митогенома, нами впервые получено филогенетическое древо с высоким разрешением всех основных ветвей, представляющих почти все таксоны рода *Pica* (см. рис. 2). Выявлена глубокая дивергенция между всеми основными линиями, в целом соответствующая современной таксономической схеме на уровне видов (рис. 2 и 3). Три основные ветви филогенетического древа выглядят как политомия с глубокой дивергенцией. Эти ветви представлены: 1) линией восточной сороки *P. serica*, 2) линией

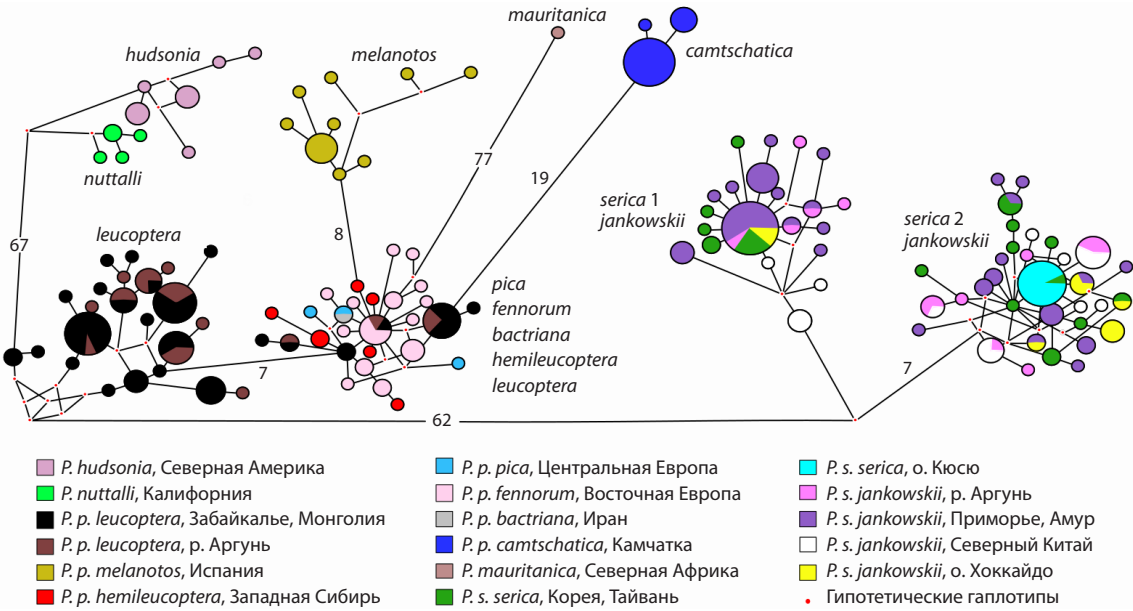


Рис. 3. Филогенетическая сеть гаплотипов, построенная на полном контрольному региону мтДНК сорок по методу Median Joining в программе Network.
Диаметр кругов соответствует количеству идентичных гаплотипов. Длина ветвей соответствует числу замен, которые показаны цифрами, когда они превышают 6.

Таблица 1. Параметры изменчивости, тесты нейтральности и время до ближайшего общего предка (tMRCA) для восьми гаплогрупп сорок рода *Pica*

Гаплогруппа/ таксон	N	S	k	$\pi \pm SD, \%$	h	Hd $\pm$ SD	D	Fs	R ₂	r	tMRCA, тыс. л.	
											по кривой BSP	по BEAST +Tracer (95 % HPD)
<i>melanotos</i>	14	19	4.088	0.312 $\pm$ 0.081	9	0.835 $\pm$ 0.101	-1.314	-2.046	0.081	0.024	54	113.0 (54–179)
<i>leucoptera</i>	61	28	4.861	0.371 $\pm$ 0.019	23	0.920 $\pm$ 0.017	-0.782	-6.871	0.081	0.047	66	118.2 (66–178)
<i>pica, fennorum</i> <i>bactriana</i> , <i>hemileucoptera</i> , <i>leucoptera</i>	49	34	3.301	0.252 $\pm$ 0.019	28	0.955 $\pm$ 0.017	-1.912*	-22.798***	0.043***	0.031	36	70.0 (36–111)
<i>serica 1</i>	49	26	2.592	0.198 $\pm$ 0.027	21	0.864 $\pm$ 0.042	-1.829*	-13.445***	0.044**	0.023	32	76.4 (32–132)
<i>serica 2</i>	70	30	2.694	0.207 $\pm$ 0.016	30	0.942 $\pm$ 0.017	-1.803*	-25.189***	0.042*	0.037	37	73.9 (37–116)
<i>camtschatica</i>	20	5	1.032	0.079 $\pm$ 0.022	4	0.489 $\pm$ 0.117	-0.820	0.063	0.120	0.284	6	35.7 (6–72)
<i>hudsonia</i>	10	9	3.067	0.236 $\pm$ 0.000	6	0.867 $\pm$ 0.085	-0.158	-0.763	0.162	0.085	29	75.0 (29–131)
<i>nuttalli</i>	5	4	1.600	0.123 $\pm$ 0.000	4	0.900 $\pm$ 0.161	-1.094	-1.405	0.187	0.150	6	34.2 (6–72)

Примечание. N – размер выборки; S – число полиморфных сайтов; k – среднее число попарных нуклеотидных различий; $\pi \pm SD$ – нуклеотидное разнообразие и его стандартное отклонение; h – число гаплотипов; Hd – гаплотипическое разнообразие и его стандартное отклонение. Тесты нейтральности: D – тест Tajima; Fs – тест Fu; R₂ – тест Ramos-Onsins & Rozas; их уровни значимости: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. r – raggedness-индекс, недостоверные значения которого ($p > 0.05$) показаны жирным шрифтом; tMRCA – время до ближайшего общего предка по кривой на графике BSP и по таблице в программе Tracer, с 95 % доверительным интервалом, в тыс. лет.

P. pica с подвидами и близкородственными *P. hudsonia* и *P. nuttalli*, 3) линией северо-африканского вида *P. mauritanica*. Виды *P. mauritanica*, *P. hudsonia* и *P. nuttalli* и подвиды *P. p. camtschatica* и *P. p. melanotos* реципрочно монофилетичны. Вид *P. serica* монофилетичен, но содержит две линии: *serica* + *jankowskii* 1 и *serica* + *jankowskii* 2 (далее сокращенно *serica* 1 и *serica* 2). Подвид *P. p. leucoptera* парафиетичен относительно других подвидов *P. pica*.

Наибольшие нуклеотидная изменчивость и число попарных различий обнаружены у линии *leucoptera*, наименьшие – у *camtschatica* (табл. 1). Гаплотипическая изменчивость у всех примерно одинакова, за исключением пониженной у *camtschatica*. Уровень замен между видами составляет от 4 до 77 нуклеотидов, или 1–6 % по *p*-дистанции, а между подвидами – от 0 до 19 замен, или до 2 % (см. рис. 3, табл. 2). Ближе всего друг к другу

P. hudsonia и *P. nuttalli*. Некоторые линии объединяют ряд таксонов (подвиды *P. p. pica*, *P. p. fennorum*, *P. p. bactriana*, *P. p. hemileuoptera* и *P. p. leucoptera*, далее они вместе обозначены «смешанной» линией), и наоборот, *P. serica* представлена двумя высокодостоверными кладами. Для расчета времени дивергенции мы взяли скорость мутирования в 0.025 замены на сайт за 1 млн лет, что близко к принятым ранее для птиц скоростям замен в контрольном регионе мтДНК (Freeland, Boag, 1999; Fok et al., 2002; Omland et al., 2006). Если принять эти калибровки, дивергенция основных линий сороки произошла в среднем плейстоцене, примерно 1.1 млн лет назад (далее млн л. н.) (см. рис. 2), что несколько моложе прежней оценки в 2.5–3.1 млн л. н. (Song et al., 2018). Наиболее близкие общие предки каждой из линий обитали в позднем плейстоцене, не ранее 70 тыс. л. н. (см. табл. 1).

Глубокая дивергенция юго-восточной линии *serica* от остальных обнаружена ранее по митохондриальным генам *16s rDNA*, *tRNA-Leu* и *ND1* (Lee S. et al., 2003), также по *cytB* (Kryukov et al., 2004) и позже подтверждена по CR мтДНК (Haring et al., 2007; Kryukov et al., 2017). Также ранее было выявлено сестринское положение камчатской линии *P. p. camtschatica* относительно номинативного подвида, но удаленное от линии восточной сороки *P. serica* (Lee S. et al., 2003). Показанная нами значительная дивергенция между ветвями *camtschatica* и общей ветвью *hudsonia* и *nuttalli* на древе и сети гаплотипов (см. рис. 2 и 3) противоречит предположению о происхождении американских сорок от камчатского подвида (Lee S. et al., 2003), хотя филогении в цитируемой работе этого и не показывают. Оба американских вида имеют общие корни с южносибирскими популяциями *P. p. leucoptera*, тогда как африканский *P. mauritanica* и пиренейский *P. p. melanotos* связаны скорее с европейско-сибирской группировкой (см. рис. 3). Взаимоотношения всех подвидов *P. pica* имеют низкое разрешение и выглядят на древе как политомия (см. рис. 2). Тем не менее, судя по сети гаплотипов и локализации подвидов, есть основания предполагать гаплогруппу *P. p. leucoptera* исходной для всех остальных подвидов.

Подвид *P. p. leucoptera* парафилетичен относительно группы подвидов *pica*, *fennorum*, *bactriana* и *hemileuoptera* (см. рис. 2 и 3). Парафилия на уровне видов широко встречается в филогениях по митохондриальным генам животных и создает противоречия в разграничении таксонов и несоответствия между генными и видовыми филогениями. Из 2319 обследованных видов птиц 23 % оказались парафилетичны или полифилетичны по мтДНК (Funk, Omland, 2003). Митохондриальная парафилия распространена у 44 % видов птиц Австралии (Joseph, Omland, 2009). При неправильной интерпретации парафилии можно прийти к ложным эволюционным построениям. Есть многочисленные примеры ошибочной таксономии, и поднятие подвидового статуса до видового может устранить парафилию. Так, поднятие ранга *Corvus corax clarionensis* до видового решает проблему парафилии у американских воронов (McKay, Zink, 2010). В ходе дивергенции от общего предка линии на генных деревьях под действием их стохастической сортировки проходят стадию полифилии, затем парафилии и наконец реципрокной монофилии (Avise, 2000). Поэтому частая при-

чина парафилии – неполная сортировка линий (incomplete lineage sorting) в результате недавнего видообразования (Funk, Omland, 2003). Также причиной парафилии может стать интрогрессивная гибридизация, древняя или современная, и отличить ее от неполной сортировки линий нельзя без анализа ядерных генов с привлечением теории коалесценции (Peters et al., 2007). У сорок наиболее вероятной причиной парафилии на подвидовом уровне служит неполная сортировка линий. Она подтверждается наблюдением, что на ранней стадии дивергенции общие гаплотипы находятся в основном в центре клады, а таксон-специфичные – на периферии (Omland et al., 2006). Именно это наблюдается у «смешанной» гаплогруппы на сети (см. рис. 3).

На построенных нами сетях гаплотипов присутствуют хорошо дифференцированные группы, каждая из которых соответствует одному или нескольким таксонам. На сети, построенной NeighborNet методом, ясно видны близкое родство *P. hudsonia* и *P. nuttalli* и сестринские отношения между подгруппами *serica* 1 и *serica* 2 (рис. S1). Остальные группы хорошо дифференцированы. *P. p. camtschatica* ближе всех к «смешанной» группе. Более детальную картину представляет сеть Median Joining, где межгрупповые дистанции достигают 77 замен (см. рис. 3). Звездообразная структура для «смешанной» линии обладает центром из трех гаплотипов. Эта линия наиболее разнородна относительно таксономии. Подвид *P. p. leucoptera* присутствует в двух гаплогруппах: «смешанной» и собственно *leucoptera*. В группе *serica* 1 центральный гаплотип обнаружен в четырех популяциях, а в группе *serica* 2 центр звезды образует гаплотип из Кореи. Группы *serica* 1 и *serica* 2 отличаются на 10 замен и более, или на 1.1 % по *p*-дистанции. В каждой из них отмечены представители одних и тех же популяций из обоих подвидов *P. s. serica* и *P. s. jankowskii*. Интересно отметить, что камчатский подвид связан со «смешанной» группой, а оба американских вида, *P. hudsonia* и *P. nuttalli*, ближе всего к сибирскому подвиду *P. p. leucoptera*. Таким образом, филогенетическое древо и сети гаплотипов взаимодополняют друг друга, позволяя судить о дивергенции линий и реконструировать происходящие эволюционные события.

Динамика численности популяций

Контурные диаграммы, построенные на основе байесова анализа митохондриальных гаплотипов, отражают динамику эффективного размера материнских популяций и время от ближайшего общего предка линии (tMRCA). Самое раннее время появления линии либо прохождения ею «бутылочного горлышка» отмечено для популяции *leucoptera* из Забайкалья и Монголии, самое позднее – для *nuttalli* и *camtschatica* (рис. 4). Эти две последние популяции вместе с *hudsonia* демонстрируют относительно постоянный размер популяций, тогда как все остальные претерпели рост численности (см. рис. 4). Из них рост только трех линий («смешанной» и обеих линий *serica*) поддержан достоверными результатами по трем тестам на нейтральность (см. табл. 1). По индексу *r* популяционный рост не исключается для большинства линий, кроме *melanotos* и линии *serica* 1. Графики попарных нуклеотидных различий (не приведены) показывают одиночные лево-

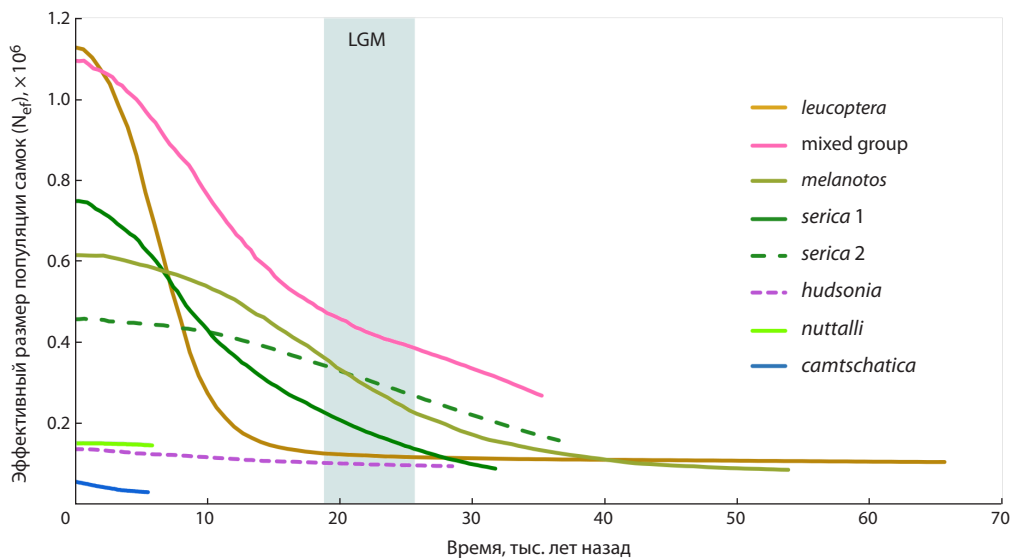


Рис. 4. Байесовы контурные диаграммы динамики эффективного размера популяций (BSP) для гаплогрупп, выделенных по контрольному региону мтДНК сорок.

Кривые показывают медианные значения, цветная заливка – период последнего ледникового максимума (LGM).

сторонние пики для всех популяций, кроме *melanotos*, что не противоречит гипотезам о популяционном росте.

Разнообразие картин контурных диаграмм динамики численности линий или популяций наводит на следующие заключения. Линия *leucoptera* выглядит сформированной раньше других, и ее наиболее быстрый рост модель предсказывает на период после LGM (см. рис. 4). «Смешанная» линия, обладающая звездообразной структурой на сети гаплотипов, также претерпела интенсивный рост, начавшийся ранее, чем у *leucoptera*, и происходивший одновременно с параллельным ростом линии *melanotos*. Эти три линии относятся к западной части ареала *P. pica*. На востоке Евразии из двух линий *P. serica* быстрее росла менее многочисленная линия *serica 1*, что соответствует звездообразной картине с высокой представленностью общего центрального гаплотипа (см. рис. 3) и более короткой кривой роста (см. рис. 4). Недавний рост «смешанной» линии и обеих линий *serica* подтверждается тремя тестами на нейтральность (см. табл. 1). Североамериканские сестринские виды *P. hudsonia* и *P. nuttalli* демонстрируют популяционную стабильность. *P. nuttalli*, обитающая на крайнем юге американской части ареала рода, отделилась от общего с *P. hudsonia* предка совсем недавно, о чем свидетельствует ее высокая гаплотипическая и низкая нуклеотидная изменчивость (см. табл. 1) в соответствии с принципом основателя. Короткое время жизни и низкие показатели гаплотипической и нуклеотидной изменчивости камчатского подвида *P. p. camtschatica* (см. рис. 4, табл. 1) могут означать, скорее, прохождение им «бутылочного горлышка», чем влияние основателя. В целом картина динамики численности напоминает полученную ранее по аналогичным расчетам демографического роста восточно-китайской клады – после 100 тыс. л. н. (Zhang R. et al., 2012), а также роста восточно-азиатской линии после 60 тыс. л. н., евразийской после 40 тыс. л. н. и американской после 20 тыс. л. н. (Song et al., 2018).

Филогеография птиц, и в частности сорок

Филогеографическая структура вида проявляется, прежде всего, в наличии генетических клад (групп гаплотипов), распространенных аллопатрически или парапатрически и выявляемых в основном по данным мтДНК. Так, в Западной Палеарктике отмечено 14 видов птиц с четким различием между географическими линиями внутри видов (Pârâu, Wink, 2021). Это в основном оседлые виды. Три аллопатрические гаплогруппы, соответствующие подвидам, обнаружены у зеленого дятла *Picus viridis* (Pons et al., 2011), две – у среднего пестрого дятла *Dendrocopos medius*, с несколькими исходными рефугиумами при LGM для каждой группы (Kamp et al., 2019), три – у пеночки-таловки *Phylloscopus borealis* (Saitoh et al., 2010), три – у черноголового ополовника *Aegithalos concinnus* в Восточном Китае (Dai et al., 2011), три линии и соответствующие морфотипы – у стеллеровой сойки *Cyanocitta stelleri* (Cicero et al., 2022). Наличие трех хорошо поддержанных гаплогрупп, произошедших из трех южно-европейских плейстоценовых рефугиумов, показано для неясыти *Strix aluco* (Brito, 2005). У большой синицы *Parus major* обнаружено пять монофилетических групп с глубокой дивергенцией в раннем–среднем плейстоцене и с экспансией перед LGM (Zhao et al., 2012). Оляпка *Cinclus cinclus* сформировала сложную структуру с пятью линиями, произошедшими от двух основных рефугиумов – итальянского и балкано-карпатского, изолированных во время межледниковий (Hourlay et al., 2008). В ряде случаев наличие подобных дивергировавших клад, часто поддерживаемое дивергенцией и по другим признакам, привело к предложениям о присвоении им видового ранга, как для подвидов жаворонка *Eremophila alpestris* (Drovetski et al., 2014), крапивника *Troglodytes troglodytes* (Toews, Irwin, 2008), длиннохвостого снегиря *Carpodacus sibiricus* (Liu et al., 2020) и таловки *Phylloscopus borealis* (Alström et al., 2011). Есть и противоположные примеры сведения в один

вид, например трех видов горных вьюрков рода *Leucosticte* (Drovetski et al., 2009).

Однако чаще встречается отсутствие четкой генетической структурированности ареалов. Так, 90 % от 145 проанализированных видов птиц западной Палеарктики обладают высокой степенью панмиксии (46 видов) либо слабой дифференциацией по ареалу (85 видов) (Pârâu, Wink, 2021). Это объясняется перемешиванием популяций как при их отступлении от ледников в южные рефугиумы, так и при послеледниковой экспансии. Перекрытие ареалов гаплогрупп известно для овсянки *Emberiza schoeniclus* (Zink et al., 2008), чечевицы *Carpodacus erythrinus* (Pavlova et al., 2005) и бородача *Gypaetus barbatus* (Godoy et al., 2004). У комплекса ополовников *Aegithalos caudatus* выявлено четыре группы, из них две в Южном Китае аллопатричны, а другие две группы, широко распространенные по северной Палеарктике, перекрываются (Song et al., 2016). Из четырех четких клад у трясогузки *Motacilla alba* три (N, SE и SW) частично перекрываются (Li X. et al., 2016). У горлицы *Streptopelia turtur* популяционно-генетической структуры не обнаружено, и три наиболее общих гаплотипа отмечены у представителей всех европейских популяций, от Греции до Испании и Великобритании (Calderon et al., 2016). Эти гаплотипы различаются между собой на 2–6 замен, что много меньше различий между перекрывающимися группами *serica* 1 и 2 (16 замен между центрами групп на сети, см. рис. 3). Нестрогая филогеографическая структура обнаружена в комплексе чеканов *Saxicola torquata* с тремя далеко дивергировавшими кладами в Палеарктике, которые местами перекрываются (Zink et al., 2009). У кустарницы *Leucodioptron canorum* три клады частично перекрываются в Восточном Китае, и интенсивный поток генов между потомками разных рефугиумов поддерживает высокий эффективный размер популяции (Li S.H. et al., 2009). Аналогично у сютory *Paradoxornis webbianus* две линии частично перекрываются в результате недавнего потока генов (Qu et al., 2012). У ворона *Corvus corax* две гаплогруппы с 4 % уровнем дивергенции перекрываются на западе США в результате вторичного контакта и свободно скрещиваются (Webb et al., 2011).

К видам с широким потоком генов принадлежат угод *Upupa epops* в Европе (Wang et al., 2017), пухляк *Parus montanus* (Kvist et al., 2001; Pavlova et al., 2006) и перевозчик *Actitis hypoleucos* (Zink et al., 2008). У большого пестрого дятла *Dendrocopos major* отмечена панмиксия по всему центру Палеарктики (Perktaş, Quintero, 2013), а у болотной камышевки *Acrocephalus palustris* – по Европе (Arbabi et al., 2014). В большинстве приведенных примеров имело место «бутылочное горлышко» или экспансия из единого рефугиума. Генетическая близость ряда западных подвидов сороки, за исключением подвида Иберии, может объясняться таким современным потоком генов между ними (см. рис. 2 и 3, рис. S1).

Важный филогеографический разрыв в ареале сороки обнаружен в Южной Сибири (Kryukov et al., 2004), что привело к необходимости выделения из прежде единого вида *P. pica sensu lato* вида восточная сорока *P. serica*. Подобный разрыв между западными и восточными родственными таксонами часто наблюдается у видов с широ-

кими палеарктическими ареалами и проявляется в четкой дивергенции по маркерам мтДНК. К таким примерам относятся: голубая сорока *Cyanopica cyanus* (Fok et al., 2002; Kryukov et al., 2004), грач *Corvus frugilegus* (Haring et al., 2007; Salinas et al., 2021), горихвостка *Ficedula parva* и жаворонок *Alauda arvensis* (Zink et al., 2008), а также узкочерепная полевка *Microtus gregalis* (Abramson et al., 2006), сибирский углозуб *Salamendrella keyserlingii* (Берман и др., 2005) и паук *Argiope bruennichi* (Krehenwinkel et al., 2016). При этом локализация разрывов у разных видов совпадает редко. У крапивника *Nannus troglodytes* обнаружена сложная структура с делением на западную кладу (Европа, Кавказ) и восточную (Центральная, Восточная Азия и Сино-Гималаи) (Albrecht et al., 2020). У чечевицы *Carpodacus erythrinus* выделяется клад северо-востока Евразии (Hung et al., 2013). У черной и серой ворон *Corvus corone* – *C. cornix* разрывы по мтДНК не совпадают с таксономическим подразделением (Крюков, Сузуки, 2000; Haring et al., 2007). В других случаях разделение на подвиды соответствует филогеографическим разрывам. Так, у черного коршуна *Milvus migrans* найдены дивергировавшие по мтДНК западная и восточная клады, соответствующие двум подвидам с широкой зоной интерградации в Сибири (Andreyenkova et al., 2021). В то же время у других широкоареальных видов таких разрывов нет, что может свидетельствовать об их молодости и/или потоке генов.

История формирования ареалов сорок

Формирование ареала рода *Pica* на протяжении огромного трансголарктического ареала претерпело много стадий, и реконструировать их полностью невозможно. Отметим лишь некоторые ключевые моменты. Основным путем видообразования сорок можно считать викарирование по причине фрагментации обширных ареалов, образовавшихся путем расселения, и локальные адаптации. Краевые популяции могли диверсифицировать из краевых изолятов путем перипатрической модели, как разновидность географического видообразования (Майр, 1968). Это подробно обосновано для узкоареального эндемика *P. nuttalli* в работе по полным митогеномам (Kryukov et al., 2024). Этот же путь был возможен для *P. mauritanica*, *P. bottanensis* и *P. p. camtschatica*. Аравийская сорока *P. asirensis*, представляющая собой удаленный изолят, остается самой малоизученной формой и генетически обследована лишь недавно (Song et al., 2018). Филогении по двум митохондриальным генам показали ее сестринские отношения с цинхай-тибетским видом *P. bottanensis*, что позволяет предположить распространение сороки по полосе степей и полупустынь от Восточной Азии до Аравии и далее до Северной Африки одной или несколькими волнами при циклических изменениях климата. При этом могла происходить фрагментация ареала с образованием реликтовых изолятов в виде популяций аравийской и магрибской сорок – одних из древнейших линий, судя по реконструкциям митохондриальных филогений (Song et al., 2018). Маловероятно, что сорока успела пройти из Северной Африки на Пиренейский полуостров, поскольку Гибралтарский пролив полностью разделил их еще к началу плиоцена, 5 млн л. н. (Krijgsman, 2002). Это подтверж-

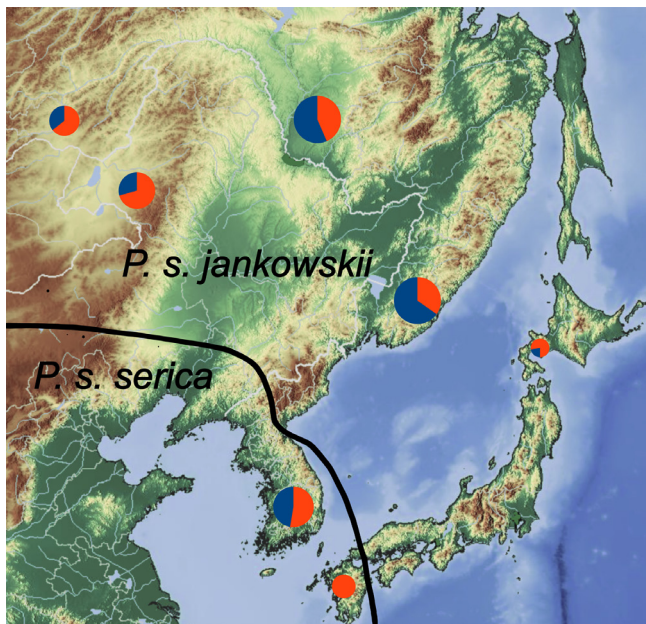


Рис. 5. Генотипический состав популяций восточной сороки *P. serica*. Доля представителей гаплогруппы *serica* 1 показана синим цветом, *serica* 2 – красным.

дается приведенными генетическими данными о глубокой дивергенции магрибской сороки от мавританской сороки и других европейских форм, и первая выглядит как тупиковая ветвь. Сценарий с малыми удаленными друг от друга изолятами предполагает вымирание каких-то промежуточных линий.

Выше показано, что базальное положение на древе занимает восточная сорока *P. serica*, которая разошлась с остальными линиями в среднем плейстоцене (см. рис. 2). Наличие двух дивергировавших гаплогрупп в пределах *P. serica* (с *p*-дистанцией 1.1 %) оказалось неожиданным (см. рис. 2 и 3). Подвиды *P. s. serica* и *P. s. jankowskii* разграничены географически и сходны по окраске, но имеют стойкие различия по размерам и пропорциям (Редькин и др., 2021). Важно отметить, что совместное присутствие носителей обеих гаплогрупп – *serica* 1 и *serica* 2 (за исключением популяции о. Кюсю) – обнаружено в популяциях по всему ареалу вида: от долины р. Аргунь в Забайкалье на западе ареала до Кореи и Хоккайдо на востоке (рис. 5). Соотношение обеих гаплогрупп в разных популяциях различается, но недостаточно.

Практически такую же симпатрическую картину описали для сорокопута-жулана *Lanius collurio*, где две четко дивергировавшие гаплогруппы (с дистанцией 2.8 %) обнаружены в популяциях по всей Европе (Pârâu et al., 2019). Еще один пример касается горихвостки *Phoenicurus phoenicurus*, у которой две дивергировавшие на 5.1 % гаплогруппы симпатричны по всей Западной Европе (Hogner et al., 2012). В обоих случаях наиболее вероятным объяснением этого редкого феномена могут быть последствия периодически повторяющихся ледниковых циклов на протяжении плейстоцена. При похолоданиях популяции отступали на юг и смешивались в рефугиумах, например в Иберии и на Балканах, а при потеплениях рас-

пространялись на север с очередным перемешиванием. У дроздовидной камышевки *Acrocephalus arundinaceus* в Европе найдено две митохондриальных клады с большим перекрытием их ареалов и дивергировавших 65–87 тыс. л. н. (Hansson et al., 2008). Показано, что они сформировались независимо из двух рефугиумов на юге Европы и на Ближнем Востоке, причем первая экспансия привела к заселению всего ареала, а более поздняя вторая заняла только центральную его часть. Эти клады не изолированы репродуктивно, что подтверждает гипотезу о постледниковой экспансии как причине видообразования (тогда как времени изоляции в рефугиумах оказалось недостаточно для выработки изоляции). Сходным образом у шурки *Merops apiaster* каждая из двух звездообразных гаплогрупп, различающихся всего одной заменой, объединяет гаплотипы популяций от юга Африки до Западной Европы и Китая, иллюстрируя панмиксию в результате смешения гаплотипов как после рефугиумов, так и сейчас (Moura et al., 2019). Другие примеры приведены выше в разделе Филогеография.

Возникновение и формирование гаплогрупп *serica* 1 и 2 в исследованной нами части ареала в Азии также можно предполагать в двух рефугиумах, о чем говорят позднеплейстоценовые датировки времени их дивергенции и tMRCA (см. рис. 2, табл. 1). Южная часть ареала *P. serica* нами не обследована, но в Восточном Китае не обнаружено генетической структуры по двум ядерным генам, что предполагает распространение из единого рефугиума и наличие потока генов между популяциями (Zhang R. et al., 2012). Звездообразные структуры на сети и тесты нейтральности для обеих гаплогрупп *serica* 1 и *serica* 2 не противоречат предположению о росте численности, который начался еще до LGM (см. рис. 3 и 4, табл. 1). Аналогично у синицы *Parus major* широкая экспансия клады Восточной Азии началась ~50 тыс. л. н., и LGM на нее не повлиял (Song et al., 2020).

В целом регион умеренной Восточной Азии мог включать множество больших и малых рефугиумов, не обязательно совпадающих у разных видов, в отличие от ситуации в Европе, где основные рефугиумы были в Пиренеях, Апеннингах и на Балканах (Hewitt, 1996; Fu, Wen, 2023). Ряд видов дальневосточных позвоночных имеют глубокую дивергенцию между гаплогруппами Корейского полуострова, с одной стороны, и северо-востока Китая и Приморья, с другой. Такая картина обнаружена у сибирского бурндука *Tamias sibiricus* с уровнем дивергенции групп 11 % (Lee M.Y. et al., 2008), лесной мыши *Apodemus peninsulae* (Serizawa et al., 2002; Kim H.R., Park, 2015; Chelomina et al., 2024), полевой мыши *Apodemus agrarius* (Sakka et al., 2010), квакши группы *Hyla japonica* (Dufresnes et al., 2016), жабы *Bufo gargarizans* (Borzée et al., 2017) и отчасти у енотовидной собаки *Nyctereutes procyonoides* с экспансией после LGM (Kim S.-I. et al., 2013). У лягушки *Pelophylax nigromaculata* отмечены две линии с уровнем дивергенции 7.7 %, сформированные в рефугиумах в Восточном Китае и Корее (Zhang H. et al., 2008). Для некоторых видов предполагается несколько рефугиумов, например, для куropsатки *Bambusicola thoracica* (Huang et al., 2010). Осцилляции климата проходили без сплошного оледенения, и средняя температура

Таблица 2. Число попарных нуклеотидных замен на сайт (D_{xy}) и p -дистанции между гаплогруппами (в %)

Гаплогруппа	1	2	3	4	5	6	7	8
1. <i>leucoptera</i> , $n = 62$		0.997	1.494	1.977	4.990	4.471	4.859	4.829
2. Смешанная группа, $n = 49$	0.998		0.986	1.618	4.708	4.631	5.060	5.040
3. <i>melanotos</i> , $n = 14$	1.499	0.987		1.814	4.486	4.492	4.902	5.096
4. <i>camtschatica</i> , $n = 20$	1.976	1.616	1.815		5.373	5.274	5.770	5.720
5. <i>hudsonia</i> , $n = 10$	4.491	4.499	4.290	5.123		0.921	5.894	6.309
6. <i>nuttalli</i> , $n = 5$	4.276	4.275	4.295	5.030	0.919		5.635	6.014
7. <i>serica</i> 1, $n = 49$	4.665	4.850	4.706	5.524	5.526	5.286		1.081
8. <i>serica</i> 2, $n = 70$	4.701	4.892	4.953	5.532	6.051	5.779	1.081	

Примечание. Среднее число попарных нуклеотидных замен на сайт между гаплогруппами (D_{xy}) – над диагональю, некорректированные p -дистанции – под диагональю.

понижалась на Корейском полуострове в LGM всего на 5–6 °C (Yi, Kim, 2010). Многие виды пережили LGM на месте и после него расселялись на север, но не только (Fu, Wen, 2023).

Гипотеза о существовании рефугиумов у сорок, и именно двух рефугиумов, легко объясняет наличие двух достаточно глубоко генетически дивергировавших гаплогрупп: *serica* 1 и *serica* 2. Один из рефугиумов мог находиться на Корейском полуострове – самом известном для Восточной Азии, поскольку центральный гаплотип группы *serica* 2 на сети (см. рис. 3) происходит именно оттуда. Исходная популяция для другой группы – *serica* 1 – сформировалась позже и росла быстрее (см. рис. 4). Ее центральный гаплотип широко распространен от Забайкалья до Хоккайдо, и она менее дивергировала от не найденного предкового для обеих групп гаплотипа. Этот рефугиум мог быть расположен в Приморье или Маньчжурии, по аналогии с описанными выше для других видов. Дивергенция двух гаплогрупп *serica* (1.1 %, см. табл. 2) ниже, чем в приведенных выше примерах, и произошла, вероятнее всего, во время непродолжительной изоляции в рефугиумах, недостаточной для формирования репродуктивной изоляции, которая воспрепятствовала бы слиянию дочерних популяций при вторичном контакте. После слияния обе группы продолжали интенсивно расширяться без сортировки линий. В Северо-Восточном Китае и Корее самым интенсивным холодным периодом был не LGM, как в Европе и Америке, а период Дали с началом 54–44 тыс. л. н. (Li J.J. et al., 2004; Zhang H. et al., 2008), когда могли образоваться рефугиумы. Это близко к нашей оценке предполагаемой постледниковой экспансии группы *serica* 2 из Кореи (37 тыс. л. н.) и несколько более поздней, но более интенсивной экспансии группы *serica* 1 из Северо-Восточного Китая или Приморья (32 тыс. л. н.) (см. табл. 1, рис. 4). Альтернативная гипотеза, предполагающая независимое мутирование и параллельную эволюцию с формированием в нескольких популяциях одних и тех же двух гаплогрупп, крайне маловероятна. Такой симпатрический путь можно было бы обсуждать при условии развития экологических адаптаций, но сороки относятся к эврибионтам и разобшение их по экологическим нишам представить невозможно.

Входящая в группу *serica* 2 единственная гомогенная популяция о. Кюсю произошла всего от нескольких переселенных из Кореи особей-основателей, среди которых случайно могло не оказаться представителей другой гаплогруппы (см. рис. 3). А еще более поздняя, современная экспансия на запад по долине Амура и на Хоккайдо идет из общей популяции, несущей обе гаплогруппы. Итак, формирование современной структуры в пределах ареала *P. serica* предполагает викариантную дивергенцию в рефугиумах с последующей экспансией и перемешиванием популяций ввиду непрекращающегося потока генов между представителями обеих гаплогрупп, при незавершенной сортировке линий.

Сороки относятся к оседлым птицам, но склонны к кочевничеству. Первоначальная диверсификация предковой линии произошла более 1 млн л. н. (см. рис. 2), возможно, в процессе расселения. Экспансия из исходного ареала в Юго-Восточной Азии могла проходить двумя путями – южным, южнее пустынь и гор Центральной Азии, оставившим по пути реликтовые популяции аравийской и магрибской сорок, и северным, к югу Сибири и далее на запад. Современные популяции формировались много позднее, в позднем плейстоцене. В Южной Сибири в последнем межледниковье после ~126 тыс. л. н. леса замещались степями, а лесостепные ландшафты и редколесья сохранялись даже при максимуме оледенения (Назаренко, 1982; Granoszewski et al., 2005; Allen et al., 2010). Достаточно развитая травянистая растительность могла обеспечить выживание копытных, таких как сайгаки, что способствовало распространению сорок. Частичная сортировка линий в ходе расселения сорок на север могла привести к формированию двух исходных гаплогрупп с дивергенцией 1 % (см. табл. 2). Одна из групп (*leucoptera*) сформировалась около 66 тыс. л. н., в течение холодного периода Marine Isotope Stage (MIS) 4 (71–57 тыс. л. н.), и накопила значительную нуклеотидную и гаплотипическую изменчивость (см. табл. 1), сохраняя низкую стабильную численность вплоть до быстрого роста после LGM (см. рис. 4), когда она расселилась по югу Сибири. Потомки этой же линии, видимо, мигрировали на Аляску через Берингскую сушу и дали начало двум американским видам – *P. hudsonia* и *P. nuttalli*. Другая

(«смешанная») линия могла сформироваться позже, около 36 тыс. л. н., в относительно теплом периоде MIS 3 (см. рис. 4) в Алтае-Саянском рефугиуме (Pavelková Řičánková et al., 2014), именуемом центром расселения (de Lattin, 1957), либо в Хэнтэйском субцентре (Назаренко, 1982) при малой численности или после «бутылочного горлышка», судя по звездообразной картине на сети (см. рис. 3), и позже претерпела более интенсивный рост, чем сестринская (см. рис. 4). При продвижении на запад она дала начало серии подвидов от *P. p. hemileucoptera* вплоть до номинативного *P. p. pica* (см. рис. 1) без сортировки линий, что привело к парафилии у *P. p. leucoptera* (см. рис. 2 и 3). В этом ряду «изоляция расстоянием» проявляется в клинальной изменчивости по размерам и окраске (Cramp, Perrins, 1994), но генетическая близость данных подвидов *P. pica* по мтДНК несомненна (см. рис. 3, табл. 2), а потоку генов, очевидно, не мешали такие преграды, как Урал. *P. p. melanotos* произошла от этой же линии, но дивергировала за Пиренеями, как показано ниже. Эта же линия дала начало камчатскому подвиду гораздо позже и независимо от формирования американских видов.

Формирование популяций островов и полуостровов

Единственная из обследованных популяций, обладающая одним гаплотипом, обитает на о. Кюсю. Известно, что она произошла от ограниченного числа особей, завезенных с Корейского полуострова примерно 400 лет назад (Eguchi, Kubo, 1992). Вероятно, случайно среди немногих основателей этой популяции не оказалось представителей гаплогруппы *serica* 1. Популяция долгое время охранялась и занимала очень локальный ареал, и лишь в последние 40 лет стала распространяться на север острова (Eguchi, 2016). Крайняя генетическая гомогенность иллюстрирует принцип основателя. Ее происхождение подтверждается наличием гаплотипа из Кореи, общего с гаплотипом всех птиц из Кюсю (см. рис. 3), а также результатами анализа по шести микросателлитным локусам (Mori et al., 2014).

В этой же работе доказано происхождение другой островной популяции – о. Хоккайдо – из Приморья или Кореи, а не с Кюсю. По аллельному составу наиболее близки популяции Хоккайдо и Приморья. Митотипы образцов с Хоккайдо столь же высоко изменчивы, как и в предположительно родительской приморской популяции, и тоже представлены в двух митогруппах (см. рис. 3). Это свидетельствует о большом числе основателей популяции Хоккайдо. В портовых городах юга-западного Хоккайдо первые пары сорок были обнаружены на гнездовье только в 1993 г. (Horimoto, 2004), а сейчас популяция насчитывает уже более 200 пар (О. Hasegawa, перс. сообщ.). Причем на соседних островах Сахалин и Хонсю сорока не гнездится. Крылья сороки не приспособлены к далекому перелету через море. Наиболее вероятный путь ее появления на Хоккайдо – случайная инвазия на лесовозных и других кораблях в 1980–1990-х годах, когда грузовой трафик между Приморьем и Хоккайдо был велик. Привлекательность кораблей в портах для ночевки сорок следует из наблюдений орнитологов (Kryukov et al., 2017). Тем же способом, по-видимому, появляются сороки в Австралии

(GWA, 2017), на о. Маврикий (Reinegger, Bhandal, 2024) и на востоке США (Ebels, 2003); широко расселяются домовые вороны *Corvus splendens* (Ryall, 2016) и другие птицы.

Популяция сорок Камчатки имеет общих предков с западными формами и произошла, видимо, за счет миграции из Сибири, но не с юга от *P. serica*. Возможно, Камчатка была заселена сорокой еще в плейстоцене. На протяжении значительной части последнего ледникового периода не менее 40 % поверхности полуострова были покрыты льдом (Камчатка..., 1974), поэтому сорока могла пережить самый суровый период позднеплейстоценового похолодания в рефугиумах древесно-кустарниковой растительности Центральной Камчатской депрессии. Последнее ледниковое расселение на север и за пределы Камчатки могло быть частично связано с появлением поселений человека и оленеводства. Сорока до сих пор еще слабо проникла в антропогенный ландшафт Камчатки и в городах заселяет лишь парки. Предельно низкая нуклеотидная изменчивость и низкое гаплотипическое разнообразие *P. p. camtschatica* (см. табл. 1) и короткая кривая контурной диаграммы (см. рис. 4) указывают на прохождение ею жесткого «бутылочного горлышка» в недавнем прошлом.

Пиренейский полуостров относится к известным европейским плейстоценовым рефугиумам, наряду с Апеннинскими и Балканскими (Hewitt, 1996). Вероятно, сорока в Иберии появилась с севера, но в периоды наступающих оледенений оказывалась изолированной за Пиренейским хребтом в рефугиуме и дивергировала там. Сороки заселили почти весь полуостров, и отмечен недавний рост численности, что соответствует нашим построениям (см. рис. 4). Гаплотипическая изменчивость *P. p. melanotos* не ниже, чем у остальных широко распространенных линий (см. табл. 1), что дает основание предположить наличие в прошлом не одного, а нескольких рефугиумов, согласно концепции “refugia within refugia” (Gómez, Lunt, 2007; Abellán, Svenning, 2014). Генетические свидетельства наличия нескольких рефугиумов в пределах общего иберийского описаны для куропатки *Alectoris rufa* (Ferrero et al., 2011), ящерицы *Lacerta lepida* (Miraldo et al., 2011), ряда рыб, амфибий и пр. (Gómez, Lunt, 2007), причем не менее чем в семи случаях рефугиальные области для разных видов совпадают (Hewitt, 2011). Общих гаплотипов *P. p. melanotos* с номинативным подвидом мы не обнаружили, поэтому нет свидетельств о потоке генов за пределы полуострова. Тем не менее исключить этого нельзя, поскольку мы не располагали образцами из Пиренеев, но оттуда описаны промежуточные по фенотипам экземпляры *melanotos* × *pica* (Martínez, 2016). Для Пиренейских гор отмечены контакты ареалов ряда видов животных и растений (Hewitt, 2011; Poschel et al., 2018; Pons et al., 2019), что позволяет отнести этот хребет к «шовным» гибридным зонам (suture-zone) (Remington, 1968). В отличие от сороки, иберийская популяция грача послужила источником популяций к северу, но, по анализам мтДНК и микросателлитов, она сохраняет свою генетическую специфику (Salinas et al., 2021). По-видимому, Пиренеи служат причиной внутривидового разрыва только для оседлых видов птиц (Neto et al., 2012), а также для ряда малоподвижных амфибий и рептилий.

Заключение

Род сороки *Pica* представляет большой интерес для филогеографического исследования благодаря широкому голарктическому распространению и высокому фенотипическому разнообразию. Генетическая изменчивость сорок изучена недостаточно, почти нет данных по ядерным генам. Вместе с тем использование высокоизменчивого некодирующего контрольного региона мтДНК подтвердило его эффективность для популяционно-генетического анализа. Показаны значительные филогеографические разрывы всех основных генетических линий сороки, не всегда соответствующие современной таксономической схеме. При этом степень изоляции и дивергенции между отдельными линиями широко варьирует – от строгой изоляции при аллопатрии (все виды рода, кроме одной пары) до вторичных контактов с ограниченным потоком генов и отбором против гибридизации (*P. pica* × *P. serica*) и полного успешного перемешивания после предполагаемой дивергенции в рефугиумах (*serica* 1 × *serica* 2). Интересно, что строгость репродуктивной изоляции слабо коррелирует с уровнем генетической дивергенции по мтДНК. Так, далеко дивергировавшие *P. pica* и *P. serica* относительно успешно скрещиваются, и наоборот, близкие по мтДНК парапатрические виды *P. hudsonia* и *P. nuttalli* репродуктивно изолированы.

Видообразование сорок шло преимущественно по аллопатрическому пути за счет расселения с последующей изоляцией (викарированием), в том числе отделением краевых изолятов (перипатрическое видообразование). Для объяснения внутривидовой генной парафилии у белокрылой сороки *P. p. leucoptera* предложена гипотеза, сочетающая частичную сортировку линий с дивергенцией в рефугиуме и современным потоком генов между западными подвидами. Наличие двух различающихся генотипически симпатрических гаплогрупп у восточной сороки *P. serica* аналогично объясняется гипотезой о дивергенции в рефугиумах с последующей взаимной интрогрессией и современной экспансией. О незавершенности видообразования говорит ситуация в Забайкалье и Монголии, где неполная репродуктивная изоляция видов *P. pica* – *P. serica* ведет к ограниченной асимметричной интрогрессии по ядерным генам. Состав молодых популяций островов Кюсю и Хоккайдо отражает генофонды родительских популяций по принципу основателя, а пережившая оледенение популяция Камчатки, по-видимому, прошла «бутылочное горлышко». Так, помимо исторических процессов, современная динамика видовых ареалов формирует филогеографическую структуру видов. Обо всех этих явлениях можно судить по традиционному анализу контрольного участка мтДНК. В целом мы имеем дело с едва ли не уникальным по разнообразию набором микроэволюционных процессов и их результатов в пределах широко распространенного банального таксона – обыкновенная сорока.

Список литературы / References

Абрамсон Н.И. Филогеография: итоги, проблемы, перспективы. Информационный вестник ВООГ. 2007;11(2):307-331
[Abramson N.I. Phylogeography: results, issues and perspectives. Informatsionnyy Vestnik VOGiS. 2007;11(2):307-331 (in Russian)]

- Банникова А.А. Молекулярные маркеры и современная филогенетика млекопитающих. Журнал общей биологии. 2004;65(4):278-305
[Bannikova A.A. Molecular markers and modern phylogenetics of mammals. Zhurnal Obshchei Biologii = Journal of General Biology. 2004;65(4):278-305 (in Russian)]
- Берман Д.И., Деренко М.В., Малярчук Б.А., Гржибовский Т., Крюков А.П., Мишчицка-Шливка Д. Генетический полиморфизм сибирского углозуба (*Salamandrella keyserlingii*, Amphibia, Caudata) и криптический вид углозуба *S. schrenckii* из Приморья. Доклады Академии наук. 2005;403(3):427-429
[Berman D.I., Derenko M.V., Malyarchuk B.A., Grzybowski T., Kryukov A.P., Miscicka-Sliwka D. Genetic polymorphism of Siberian newt (*Salamandrella keyserlingii*, Caudata, Amphibia) in its range and the cryptic species of the newt *S. schrenckii* from Primorie. Doklady Biological Sciences. 2005;403(1-6):275-278. doi 10.1007/s10630-005-0110-1]
- Горошко О.А., Крюков А.П., Лю Сонтао, Доу Хуашань, Базыроол Б.К. О распространении, подвидовой принадлежности и таксономическом статусе сорок (*Pica pica*) в бассейне реки Хайлар-Аргунь (северо-восточный Китай и Забайкалье, Россия). Байкальский зоологический журнал. 2018;2(23):38-45
[Goroshko O.A., Kryukov A.P., Liu Songtao, Dou Huashan, Bazyr-ool B.K. On distribution, subspecies and taxonomic rank of the magpie (*Pica pica*) in the Hailar-Argun' river basin (North-East China and Transbaikalia, Russia). Baykal'skiy Zoologicheskii Zhurnal = Baikal Zoological Journal. 2018;2(23):38-45 (in Russian)]
- Камчатка, Курильские и Командорские острова. История развития рельефа Сибири и Дальнего Востока. М.: Наука, 1974
[Kamchatka, Kurils and Komandor Islands. History of landscape development in Siberia and Far East. Moscow: Nauka Publ., 1974 (in Russian)]
- Крюков А.П., Горошко О.А. Успешность размножения межвидовых гибридов: пониженная плодовитость в гибридной популяции сорок (*Pica pica* × *Pica serica*, Aves). Журнал общей биологии. 2024;85(4):332-342. doi 10.31857/S0044459624040054
[Kryukov A.P., Goroshko O.A. Breeding success of interspecies hybrids: reduced fertility in a hybrid magpie population (*Pica pica* × *Pica serica*, Aves). Biol Bull Rev. 2025;15(3):377-384. doi 10.1134/S2079086425700057]
- Крюков А.П., Сузуки Х. Филогеография черной, серой и большеклювой ворон (Aves, Corvidae) по данным частичного секвенирования гена цитохрома *b* митохондриальной ДНК. Генетика. 2000;36(8):1111-1118
[Kryukov A.P., Suzuki H. Phylogeography of carrion, hooded and jungle crows (Aves, Corvidae) inferred from partial sequencing of the mitochondrial Cytochrome *b* gene. Russian Journal of Genetics. 2000;36(8):922-929]
- Майр Э. Зоологический вид и эволюция. М.: Мир, 1968
[Mayr E. Animal Species and Evolution. Cambridge, MA, USA: Belknap Press, 1963]
- Назаренко А.А. О фаунистических циклах (вымирание-расселение-вымирание...) на примере дендрофильной орнитофауны Восточной Палеарктики. Журнал общей биологии. 1982;43(6):823-835
[Nazarenko A.A. On faunistic cycles (extinction-expansion-extinction...) with special reference to the East Palearctic dendrophilous avifauna. Zhurnal Obshchei Biologii = Journal of General Biology. 1982;43(6):823-835 (in Russian)]
- Редькин Я.А., Архипов В.Ю., Жигир Д.Р. К вопросу о подвидовой систематике и номенклатуре дальневосточных подвидов сороки *Pica pica* Linnaeus, 1758 группы "serica". Русский орнитологический журнал. 2021;30(2053):1535-1544
[Red'kin Y.A., Arkhipov V.Yu., Zhigir D.R. On subspecies taxonomy and nomenclature of Far Eastern subspecies of magpie *Pica pica* Linnaeus, 1758 of the group "serica". Russian Journal of Ornithology. 2021;30(2053):1535-1544 (in Russian)]

- Рустамов А.К. Семейство вороновые. В: Птицы Советского Союза. Т. 5. М.: Сов. наука, 1954; 13-105
[Rustamov A.K. Family Corvidae. In: Birds of the Soviet Union, Vol. 5. Moscow: Sovetskaya Nauka Publ., 1954; 13-104 (in Russian)]
- Холодова М.В. Сравнительная филогеография: молекулярные методы, экологическое осмысление. *Молекулярная биология*. 2009; 43(5):910-917
[Kholodova M.V. Comparative phylogeography: molecular methods, ecological interpretation. *Mol Biol*. 2009;43(5):847-854. doi 10.1134/S002689330905015X]
- Штегман Б.К. Вороновые птицы. Л.: Изд-во АН СССР, 1932
[Stegmann B.K. Corvid Birds. Leningrad: USSR Acad. Sci. Publ., 1932 (in Russian)]
- Abellán P., Svenning J.-C. Refugia within refugia – patterns in endemism and genetic divergence are linked to Late Quaternary climate stability in the Iberian Peninsula. *Biol J Linn Soc*. 2014;113(1):13-28. doi 10.1111/bj.12309
- Abramson N.I., Kostygov A.Yu., Gambaryan N.G. Phylogeography of narrow-skulled vole (*Microtus gregalis*, Cricetidae, Rodentia) inferred from the variation of mitochondrial *cyt b* and a number of nuclear genes. *Hystrix It J Mamm (N.s.)*. Supp. 10th Int. Conf. Rodens & Spatium. 2006;155-156
- Agerbeck M., Fjeldså J., Christidis L., Fabre P.-H., Jönsson K.A. Resolving deep lineage divergences in core corvid passerine birds supports a proto-Papuan island origin. *Mol Phylogenet Evol*. 2014; 70:272-285. doi 10.1016/j.ympev.2013.09.027
- Albrecht F., Hering J., Fuchs E., Illera J.C., Ihlow F., Shannon T.J., Collinson J.M., Wink M., Martens J., Päckert M. Phylogeny of the Eurasian Wren *Nannus troglodytes* (Aves: Passeriformes: Troglodytidae) reveals deep and complex diversification patterns of Ibero-Maghrebian and Cyrenaican populations. *PLoS One*. 2020;15(3):e0230151. doi 10.1371/journal.pone.0230151
- Allen J.R., Hickler T., Singarayer J.S., Sykes M.T., Valdes P.J., Huntley B. Last glacial vegetation of northern Eurasia. *Quaternary Sci Rev*. 2010;29(19-20):2604-2618. doi 10.1016/j.quascirev.2010.05.031
- Alström P., Saitoh T., Williams D., Nishiumi I., Shigeta Y., Ueda K., Irestedt M., Björklund M., Olsson U. The Arctic Warbler *Phylloscopus borealis* – three anciently separated cryptic species revealed. *Ibis*. 2011;153(2):395-410. doi 10.1111/j.1474-919X.2011.01116.x
- Andreyenkova N.G., Karyakin I.V., Starikov I.J., Sauer-Gürth H., Litrák I., Andreykov O.V., Shnayder E.P., Bekmansurov R.H., Alexeyenko M.N., Wink M., Zhimulev I.F. Phylogeography and demographic history of the black kite *Milvus migrans*, a widespread raptor in Eurasia, Australia and Africa. *J Avian Biol*. 2021;52(10):e02822. doi 10.1111/jav.02822
- Arbabi T., Gonzalez J., Wink M. Mitochondrial evidence for genetic diversity and low phylogeographic differentiation in the Marsh Warbler *Acrocephalus palustris* (Aves: Acrocephalidae). *Org Divers Evol*. 2014;14:409-417. doi 10.1007/s13127-014-0177-3
- Avise J.C. Phylogeography: the history and formation of species. Boston, MA: Harvard Univ. Press, 2000
- Avise J.C., Walker D. Pleistocene phylogeographic effects on avian populations and the speciation process. *Proc R Soc B Biol Sci*. 1998; 265(1395):457-463. doi 10.1098/rspb.1998.0317
- Baker A.J., Marshall H.D. Mitochondrial control region sequences as tools for understanding evolution. In: Mindell D.P. (Ed.) Avian Molecular Evolution and Systematics. San Diego, California: Acad. Pr., 1997;51-82
- Barker F.K., Benesh M.K., Vandergon A.J., Lanyon S.M. Contrasting evolutionary dynamics and information content of the avian mitochondrial control region and ND2 gene. *PLoS One*. 2012;7(10): e46403. doi 10.1371/journal.pone.0046403
- Borzée A., Santos J.L., Sánchez-Ramírez S., Bae Y., Heo K., Jang Y., Jowers M.J. Phylogeographic and population insights of the Asian common toad (*Bufo gargarizans*) in Korea and China: population isolation and expansions as response to the ice ages. *PeerJ*. 2017;5: e4044. doi 10.7717/peerj.4044
- Brito P.H. The influence of Pleistocene glacial refugia on tawny owl genetic diversity and phylogeography in Western Europe. *Mol Ecol*. 2005;14(10):3077-3094. doi 10.1111/j.1365-294X.2005.02663.x
- Calderon L., Campagna L., Wilke T., Lormee H., Eraud C., Dunn J.C., Rocha G., Zehindjiev P., Bakaloudis D.E., Metzger B., Cecere J.G. Genomic evidence of demographic fluctuations and lack of genetic structure across flyways in a long distance migrant, the European turtle dove. *BMC Evol Biol*. 2016;16(1):237. doi 10.1186/s12862-016-0817-7
- Chelomina G.N., Meschersky I.G., Gajduchenko H., Borisov Y.M. Phylogeography of Korean field mouse *Apodemus peninsulae* (Rodentia: Muridae): an update. *Zool J Linn Soc*. 2024;zlae016. doi 10.1093/zoolinnea/zlae016
- Cicero C., Mason N.A., Oong Z., Title P.O., Morales M.E., Feldheim K.A., Koo M.S., Bowie R.C. Deep ecomorphological and genetic divergence in Steller's Jays (*Cyanocitta stelleri*, Aves: Corvidae). *Ecol Evol*. 2022;12(12):e9517. doi 10.1002/ece3.9517
- Cramp S., Perrins C.M. (Eds) Handbook of the Birds of Europe the Middle East and North Africa. The Birds of the Western Palearctic. Vol. VIII. Crows to Finches. Oxford: Oxford Univ. Press, 1994
- Dai C., Zhao N., Wang W., Lin C., Gao B., Yang X., Zhang Z., Lei F. Profound climatic effects on two East Asian black-throated tits (Aves: Aegithalidae), revealed by ecological niche models and phylogeographic analysis. *PLoS One*. 2011;6(12):e29329. doi 10.1371/journal.pone.0029329
- de Lattin G. Die Ausbreitungszentren der Holarktischen Landtierwelt. In: Pflugfelder O. (Ed.) Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, vom 21. bis 26. Mai 1956 in Hamburg. Zoologischer Anzeiger, 20. Supplementband. 1957;380-410
- del Hoyo J., Collar N.J. HBW and BirdLife International Illustrated Checklist of the Birds of the World. 2. Passerines. Barcelona: Lynx Edicions, 2016
- Drovetski S.V., Zink R.M., Mode N.A. Patchy distributions belie morphological and genetic homogeneity in rosy-finches. *Mol Phylogenet Evol*. 2009;50(3):437-445. doi 10.1016/j.ympev.2008.12.002
- Drovetski S.V., Raković M., Semenov G., Fadeev I.V., Red'kin Y.A. Limited phylogeographic signal in sex-linked and autosomal loci despite geographically, ecologically, and phenotypically concordant structure of mtDNA variation in the Holarctic avian genus *Eremophila*. *PLoS One*. 2014;9(1):e87570. doi 10.1371/journal.pone.0087570
- Dufresnes C., Litvinchuk S.N., Borzée A., Jang Y., Li J.T., Miura I., Perrin N., Stöck M. Phylogeography reveals an ancient cryptic radiation in East-Asian tree frogs (*Hyla japonica* group) and complex relationships between continental and island lineages. *BMC Evol Biol*. 2016;16(1):253. doi 10.1186/s12862-016-0814-x
- Ebels E.B. Speciation in *Pica* magpies. *Dutch Birding*. 2003;25(2): 103-116
- Edwards S., Schultz A., Campbell-Staton S. Next-generation sequencing and the expanding domain of phylogeography. *Folia Zool*. 2015; 64(3):187-206. doi 10.25225/fozo.v64.i3.a2.2015
- Edwards S.V., Potter S., Schmitt C.J., Bragg J.G., Moritz C. Reticulation, divergence, and the phylogeography-phylogenetics continuum. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016a;113(29):8025-8032. doi 10.1073/pnas.1601066113
- Edwards S.V., Xi Z., Janke A., Faircloth B.C., McCormack J.E., Glenn T.C., Zhong B., Wu S., Lemmon E.M., Lemmon A.R., Leaché A.D. Implementing and testing the multispecies coalescent model: a valuable paradigm for phylogenomics. *Mol Phylogenet Evol*. 2016b;94:447-462. doi 10.1016/j.ympev.2015.10.027
- Edwards S.V., Robin V.V., Ferrand N., Moritz C. The evolution of comparative phylogeography: putting the geography (and more) into comparative population genomics. *Genome Biol Evol*. 2022;14(1): evab176. doi 10.1093/gbe/evab176
- Eguchi K. The Eurasian Magpie. *Jpn J Ornithol*. 2016;65(1):5-30

- Enguchi K., Kubo H. The origin of the Magpie *Pica pica sericea* in Japan – an investigation of historical records. *J Yamashina Inst Ornithol.* 1992;24:32-39 (in Japanese with English abstract)
- Ekman J., Ericson P.G.P. Out of Gondwanaland; the evolutionary history of cooperative breeding and social behaviour among crows, magpies, jays and allies. *Proc Biol Sci.* 2006;273(1590):1117-1125. doi 10.1098/rspb.2005.3431
- Ericson P.G.P., Jansen A.-L., Johansson U.S., Ekman J. Inter-generic relationships of the crows, jays, magpies and allied groups (Aves: Corvidae) based on nucleotide sequence data. *J Avian Biol.* 2005; 36(3):222-234. doi 10.1111/j.0908-8857.2001.03409.x
- Ferrero M.E., Blanco-Aguilar J.A., Loughheed S.C., Sánchez-Darbudó I., De Nova P.J., Villafuerte R., Dávila J.A. Phylogeography and genetic structure of the red-legged partridge (*Alectoris rufa*): more evidence for refugia within the Iberian glacial refugium. *Mol Ecol.* 2011;20(12):2628-2642. doi 10.1111/j.1365-294X.2011.05111.x
- Fok K.W., Wade C.M., Parkin D.T. Inferring the phylogeny of disjunct populations of the azure-winged magpie *Cyanopica cyanus* from mitochondrial control region sequences. *Proc Biol Sci.* 2002; 269(1501):1671-1679. doi 10.1098/rspb.2002.2057
- Freeland J.R., Boag P.T. Phylogenetics of Darwin's finches: paraphyly in the tree-finches, and two divergent lineages in the Warbler Finch. *The Auk.* 1999;116(3):577-588
- Fu J., Wen L. Impacts of Quaternary glaciation, geological history and geography on animal species history in continental East Asia: a phylogeographic review. *Mol Ecol.* 2023;32(16):4497-4514. doi 10.1111/mec.17053
- Funk D.J., Omland K.E. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Ann Rev Ecol Evol Syst.* 2003;34(1):397-423. doi 10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132421
- Gill F., Donsker D., Rasmussen P. (Eds) IOC World Bird List (v 11.2). 2021. doi 10.14344/IOC.ML.11.2
- Godoy J.A., Negro J.J., Hiraldo F., Donázar J.A. Phylogeography, genetic structure and diversity in the endangered bearded vulture (*Gypaetus barbatus*, L.) as revealed by mitochondrial DNA. *Mol Ecol.* 2004;13(2):371-390. doi 10.1046/j.1365-294x.2003.02075.x
- Gómez A., Lunt D.H. Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. In: Weiss S., Ferrand N. (Eds) *Phylogeography of Southern European Refugia*. Dordrecht: Springer, 2007;155-188. doi 10.1007/1-4020-4904-8_5
- Goodwin D. *Crows of the World*. Seattle, WA, 1986
- Granoszewski W., Demske D., Nita M., Heumann G., Andreev A.A. Vegetation and climate variability during the Last Interglacial evidenced in the pollen record from Lake Baikal. *Global Planet Change.* 2005;46(1-4):187-198. doi 10.1016/j.gloplacha.2004.09.017
- GWA (Government of Western Australia). Keep eyes peeled for unusual birds at ports. 2017. Available at <https://www.agric.wa.gov.au/news/media-releases/keep-eyes-peeled-unusual-birds-ports>. Accessed January 8, 2024
- Hansson B., Hasselquist D., Tarka M., Zehntindjiev P., Bensch S. Postglacial colonisation patterns and the role of isolation and expansion in driving diversification in a passerine bird. *PLoS One.* 2008;3(7):e2794. doi 10.1371/journal.pone.0002794
- Haring E., Gamauf A., Kryukov A. Phylogeographic patterns in widespread corvid birds. *Mol Phylogenet Evol.* 2007;45:840-862. doi 10.1016/j.ympev.2007.06.016
- Haring E., Däubel B., Pinsker W., Kryukov A., Gamauf A. Genetic divergences and intraspecific variation in corvids of the genus *Corvus* (Aves: Passeriformes: Corvidae) – a first survey based on museum specimens. *J Zool Syst Evol Res.* 2012;50(3):230-246. doi 10.1111/j.1439-0469.2012.00664.x
- Hewitt G.M. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol J Linn Soc.* 1996;58(3):247-276. doi 10.1006/bjls.1996.0035
- Hewitt G. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature.* 2000; 405(6789):907-913. doi 10.1038/35016000
- Hewitt G.M. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2004;359(1442): 183-195. doi 10.1098/rstb.2003.1388
- Hewitt G.M. Quaternary phylogeography: the roots of hybrid zones. *Genetica.* 2011;139(5):617-638. doi 10.1007/s10709-011-9547-3
- Hickerson M.J., Carstens B.C., Cavender-Bares J., Crandall K.A., Graham C.H., Johnson J.B., Rissler L., Victoriano P.F., Yoder A.D. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Mol Phylogenet Evol.* 2010;54(1):291-301. doi 10.1016/j.ympev.2009.09.016
- Hogner S., Laskemoen T., Lifjeld J.T., Porkert J., Kleven O., Albayrak T., Kabasakal B., Johnsen A. Deep sympatric mitochondrial divergence without reproductive isolation in the common redstart *Phoenicurus phoenicurus*. *Ecol Evol.* 2012;2(12):2974-2988. doi 10.1002/ece3.398
- Horimoto T. Records of magpie *Pica pica* in Iburi district, South-western Hokkaido. *J Yamashina Inst Ornithol.* 2004;36:87-90 (in Japanese with English abstract)
- Hourlay F., Libois R., D'Amico F., Sarà M., O'Halloran J., Michaux J.R. Evidence of a highly complex phylogeographic structure on a specialist river bird species, the dipper (*Cinclus cinclus*). *Mol Phylogenet Evol.* 2008;49(2):435-444. doi 10.1016/j.ympev.2008.07.025
- Huang Z., Liu N., Liang W., Zhang Y., Liao X., Ruan L., Yang Z. Phylogeography of Chinese bamboo partridge, *Bambusicola thoracica* (Aves: Galliformes) in south China: inference from mitochondrial DNA control-region sequences. *Mol Phylogenet Evol.* 2010;56(1):273-280. doi 10.1016/j.ympev.2010.01.028
- Hung C.M., Drovetski S.V., Zink R.M. Recent allopatric divergence and niche evolution in a widespread Palearctic bird, the common rosefinch (*Carpodacus erythrinus*). *Mol Phylogenet Evol.* 2013; 66(1):103-111. doi 10.1016/j.ympev.2012.09.012
- Iqbal F., Ayub O., Song B.K., Wilson R., Fahim M., Rahman S. Sequence and phylogeny of the complete mitochondrial genome of the Himalayan jungle crow (Corvidae: *Corvus macrorhynchos intermedius*) from Pakistan. *Mitochondrial DNA B Resour.* 2020;5(1): 348-350. doi 10.1080/23802359.2019.1704637
- Irwin D.E. Phylogeographic breaks without geographic barriers to gene flow. *Evolution.* 2002;56(12):2383-2394. doi 10.1111/j.0014-3820.2002.tb00164.x
- Johnson N.K., Cicero C. New mitochondrial DNA data affirm the importance of Pleistocene speciation in North American birds. *Evolution.* 2004;58(5):1122-1130. doi 10.1111/j.0014-3820.2004.tb00445.x
- Jönsson K.A., Fabre P.-H., Ricklefs R.E., Fjeldså J. Major global radiation of corvid birds originated in the proto-Papuan archipelago. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(6):2328-2333. doi 10.1073/pnas.1018956108
- Joseph L., Omland K.E. Phylogeography: its development and impact in Australo-Papuan ornithology with special reference to paraphyly in Australian birds. *Emu-Austral Ornith.* 2009;109(1):1-23. doi 10.1071/MU08024
- Kamp L., Pasinelli G., Milanese P., Drovetski S.V., Kosiński Z., Koszenko S., Robles H., Schweizer M. Significant Asia-Europe divergence in the middle spotted woodpecker (Aves, Picidae). *Zool Scripta.* 2019;48(1):17-32. doi 10.1111/ZSC.12320
- Kim H.R., Park Y.C. Genetic isolation of Korean populations of *Apodemus peninsulae* (Rodentia: Muridae) from their neighboring populations. *Genes Genomics.* 2015;37:999-1005. doi 10.1007/s12558-015-0331-0
- Kim S.-I., Park S.-K., Lee H., Oshida T., Kimura J., Kim Y.-J., Nguyen S.T., Sashika M., Min M.-S. Phylogeography of Korean raccoon dogs: implications of peripheral isolation of a forest mammal in East Asia. *J Zool.* 2013;290(3):225-235. doi 10.1111/jzo.12031
- Klicka J., Zink R.M. The importance of recent ice ages in speciation: a failed paradigm. *Science.* 1997;277(5332):1666-1669. doi 10.1126/science.277.5332.1666

- Krehenwinkel H., Graze M., Rödder D., Tanaka K., Baba Y.G., Muster C., Uhl G. A phylogeographical survey of a highly dispersive spider reveals eastern Asia as a major glacial refugium for Palaearctic fauna. *J Biogeogr.* 2016;43(8):1583-1594. doi 10.1111/jbi.12742
- Krijgsman W. The Mediterranean: *Mare Nostrum* of Earth sciences. *Earth Planet Sci Lett.* 2002;205(1-2):1-12. doi 10.1016/S0012-821X(02)01008-7
- Kryukov A.P. Phylogeography and hybridization of corvid birds in the Palearctic region. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov J Genet Breed.* 2019;23(2):232-238. doi 10.18699/VJ19.487
- Kryukov A., Iwasa M.A., Kakizawa R., Suzuki H., Pinsker W., Haring E. Synchronic east-west divergence in azure-winged magpies (*Cyanopica cyanus*) and magpies (*Pica pica*). *J Zool Syst Evol Res.* 2004;42:342-351. doi 10.1111/j.1439-0469.2004.00287.x
- Kryukov A., Spiridonova L., Mori S., Arkhipov V., Redkin Ya., Goroshko O., Lobkov E., Haring E. Deep phylogeographic breaks in magpie *Pica pica* across the Holarctic: concordance with bioacoustics and phenotypes. *Zool Sci.* 2017;34(3):185-200. doi 10.2108/zs160119
- Kryukov A.P., Spiridonova L.N., Tyunin A.P., Kryukov K.A., Dorda B.A. Complete mitochondrial genomes of five subspecies of the Eurasian magpie *Pica pica*, obtained with Oxford Nanopore MinION, and their interpretation regarding intraspecific taxonomy. *Mitochondrial DNA B.* 2020;5(3):3792-3793. doi 10.1080/23802359.2020.1838354
- Kryukov A.P., Goroshko O.A., Arkhipov V.Y., Red'kin Y.A., Lee S.I., Dorda B.A., Kryukov K.A., Kapun M., Haring E. Introgression at the emerging secondary contact zone of magpie *Pica pica* subspecies (Aves: Corvidae): integrating data on nuclear and mitochondrial markers, vocalizations and field observations. *Org Divers Evol.* 2022;22:1037-1064. doi 10.1007/s13127-022-00568-6
- Kryukov A.P., Kryukov K.A., Collier K., Fang B., Edwards S. Mitogenomics clarifies the position of the Nearctic magpies (*Pica hudsonia* and *Pica nuttalli*) within the Holarctic magpie radiation. *Curr Zool.* 2024;70(5):618-630. doi 10.1093/cz/zoad048
- Kvist L., Martens J., Ahola A., Orell M. Phylogeography of a Palaearctic sedentary passerine, the willow tit (*Parus montanus*). *J Evol Biol.* 2001;14(6):930-941. doi 10.1046/j.1420-9101.2001.00354.x
- Lee M.Y., Lisovsky A.A., Park S.K., Obolenskaya E.V., Dokuchaev N.E., Zhang Y.P., Yu L., Kim Y.J., Voloshina I., Myslenkov A., Choi T.Y., Min M.-S., Lee H. Mitochondrial cytochrome *b* sequence variation and population structure of Siberian chipmunk (*Tamias sibiricus*) in Northeastern Asia and population subdivision in South Korea. *Mol Cells.* 2008;26(6):566-575. doi 10.1016/S1016-8478(23)25237-1
- Lee S., Parr C.S., Hwang Y., Mindell D.P., Choe J.C. Phylogeny of magpies (genus *Pica*) inferred from mtDNA data. *Mol Phylogenet Evol.* 2003;29:250-257. doi 10.1016/S1055-7903(03)00096-4
- Li J.J., Shu Q., Zhou S.Z., Zhao Z.J., Zhang J.M. Review and prospects of Quaternary glaciation research in China. *J Glaciol Geocryol.* 2004;26(3):235-243. doi 10.7522/j.issn.1000-0240.2004.0041
- Li S.H., Yeung C.K.L., Feinstein J., Han L., Le M.H., Wang C.X., Ding P. Sailing through the Late Pleistocene: unusual historical demography of an East Asian endemic, the Chinese Hwamei (*Leucodioptron canorum canorum*), during the last glacial period. *Mol Ecol.* 2009;18(4):622-633. doi 10.1111/j.1365-294X.2008.04028.x
- Li X., Dong F., Lei F., Alström P., Zhang R., Ödeen A., Fjeldsäll J., Ericson P.G., Zou F., Yang X. Shaped by uneven Pleistocene climate: mitochondrial phylogeographic pattern and population history of white wagtail *Motacilla alba* (Aves: Passeriformes). *J Avian Biol.* 2016;47(2):263-274. doi 10.1111/jav.00826
- Liu S., Wei C., Leader P.J., Carey G.J., Jia C., Fu Y., Alström P., Liu Y. Taxonomic revision of the Long-tailed Rosefinch *Carpodacus sibiricus* complex. *J Ornithol.* 2020;161:1061-1070. doi 10.1007/s10336-020-01801-9
- Londei T. Association of *Pica* magpies with grazing ungulates: a clue to the genus' origins. *Rivista Italiana Ornitologia.* 2018;87(2):39-42. doi 10.4081/rio.2017.295
- Madge S., Christie D.A., Kirwan G.M. Oriental Magpie (*Pica serica*), version 1.0. In: Billerman S.M., Keeney B.K., Rodewald P.G., Schulenberg T.S. (Eds) Birds of the World. Ithaca, NY, USA: Cornell Lab. Ornithology, 2020. doi 10.2173/bow.orumag1.01
- Martínez J.G. Urraca – *Pica pica*. In: Salvador A., Morales M.B. (Eds) Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales, 2016;1-23. doi 10.20350/digital-CSIC/8709
- McCormack J.E., Hird S.M., Zellmer A.J., Carstens B.C., Brumfield R.T. Applications of next-generation sequencing to phylogeography and phylogenetics. *Mol Phylogenet Evol.* 2013;66(2):526-538. doi 10.1016/j.ympev.2011.12.007
- McKay B.D., Zink R.M. The causes of mitochondrial DNA gene tree paraphyly in birds. *Mol Phylogenet Evol.* 2010;54(2):647-650. doi 10.1016/j.ympev.2009.08.024
- Mila B., McCormack J.E., Castaneda G., Wayne R.K., Smith T.B. Recent postglacial range expansion drives the rapid diversification of a songbird lineage in the genus *Junco*. *Proc Biol Sci.* 2007;274(1626):2653-2660. doi 10.1098/rspb.2007.0852
- Miraldo A., Hewitt G.M., Paulo O.S., Emerson B.C. Phylogeography and demographic history of *Lacerta lepida* in the Iberian Peninsula: multiple refugia, range expansions and secondary contact zones. *BMC Evol Biol.* 2011;11:170. doi 10.1186/1471-2148-11-170
- Mori S., Hasegawa O., Eguchi K., Hayashi Y., Fujioka M., Kryukov A., Nishiumi I. The origin and trend of common magpie in Japan: microsatellite analysis of old and new introduced populations. *Ornithol Sci.* 2014;13(Suppl.):59. Available at: https://ioc26.ornithology.jp/ioc26_abst-all.pdf
- Moura C.C.D.M., Bastian H.V., Bastian A., Wang E., Wang X., Wink M. Pliocene origin, ice ages and postglacial population expansion have influenced a panmictic phylogeography of the European Bee-Eater *Merops apiaster*. *Diversity.* 2019;11(1):12. doi 10.3390/d11010012
- Neto J.M., Arroyo J.L., Bargain B., Monros J.S., Matrai N., Prochazka P., Zehindjiev P. Phylogeography of a habitat specialist with high dispersal capability: the Savi's warbler *Locustella luscinioides*. *PLoS One.* 2012;7(6):e38497. doi 10.1371/journal.pone.0038497
- Omland K.E., Baker J.M., Peters J.L. Genetic signatures of intermediate divergence: population history of Old and New World Holarctic ravens (*Corvus corax*). *Mol Ecol.* 2006;15(3):795-808. doi 10.1111/j.1365-294X.2005.02827.x
- Ottensburghs J., Lavretsky P., Peters J.L., Kawakami T., Kraus R.H. Population genomics and phylogeography. In: Kraus R.H.S. (Ed.) Avian Genomics in Ecology and Evolution. Springer Nature Switzerland AG, 2019;237-265. doi 10.1007/978-3-030-16477-5_8
- Pârâu L.G., Wink M. Common patterns in the molecular phylogeography of western palearctic birds: a comprehensive review. *J Ornithol.* 2021;162(4):937-959. doi 10.1007/s10336-021-01893-x
- Pârâu L.G., Frias-Soler R.C., Wink M. High genetic diversity among breeding Red-Backed Shrikes *Lanius collurio* in the Western Palearctic. *Diversity.* 2019;11(3):31. doi 10.3390/d11030031
- Pavelková Řičánková V., Robovský J., Riegert J. Ecological structure of recent and last glacial mammalian Faunas in Northern Eurasia: the case of Altai-Sayan refugium. *PLoS One.* 2014;9(1):e85056. doi 10.1371/journal.pone.0085056
- Pavlova A., Zink R.M., Rohwer S. Evolutionary history, population genetics, and gene flow in the common rosefinch (*Carpodacus erythrinus*). *Mol Phylogenet Evol.* 2005;36(3):669-681. doi 10.1016/j.ympev.2005.02.010
- Pavlova A., Rohwer S., Drovetski S.V., Zink R.M. Different post-Pleistocene histories of Eurasian parids. *J Heredity.* 2006;97(4):389-402. doi 10.1093/jhered/esl011
- Perktaş U., Quintero E. A wide geographical survey of mitochondrial DNA variation in the great spotted woodpecker complex, *Dendrocopos major* (Aves: Picidae). *Biol J Linn Soc.* 2013;108:173-188. doi 10.1111/j.1095-8312.2012.02003.x
- Peters J.L., Zhuravlev Y., Fefelov I., Logie A., Omland K.E. Nuclear loci and coalescent methods support ancient hybridization as cause of mitochondrial paraphyly between gadwall and falcated duck

- (*Anas* spp.). *Evolution*. 2007;61(8):1992-2006. doi 10.1111/j.1558-5646.2007.00149.x
- Pons J.-M., Oliso G., Cruaud C., Fuchs J. Phylogeography of the Eurasian green woodpecker (*Picus viridis*). *J Biogeogr*. 2011;38(2): 311-325. doi 10.1111/j.1365-2699.2010.02401.x
- Pons J.-M., Masson C., Oliso G., Fuchs J. Gene flow and genetic admixture across a secondary contact zone between two divergent lineages of the Eurasian Green Woodpecker *Picus viridis*. *J Ornithol*. 2019;160:935-945. doi 10.1007/s10336-019-01675-6
- Poschel J., Heltai B., Gracia E., Quintana M.F., Velo-Antón G., Arribas O., Valdeón A., Wink M., Fritz U., Vamberge M. Complex hybridization patterns in European pond turtles (*Emys orbicularis*) in the Pyrenean Region. *Sci Rep*. 2018;8(1):15925. doi 10.1038/s41598-018-34178-0
- Qu Y., Zhang R., Quan Q., Song G., Li S.H., Lei F. Incomplete lineage sorting or secondary admixture: disentangling historical divergence from recent gene flow in the Vinous-throated parrotbill (*Paradoxornis webbianus*). *Mol Ecol*. 2012;21(24):6117-6133. doi 10.1111/mec.12080
- Reinegger R.D., Bhandal G. First sighting of Eurasian magpie (*Pica pica*) in Mauritius. *Bull Phaethon*. 2024;59:51-55
- Remington C.L. Suture-zones of hybrid interaction between recently joined biotas. In: Dobzhansky T., Hecht M.K., Steere W.C. (Eds) *Evolutionary Biology*. Boston, MA: Springer, 1968;321-428. doi 10.1007/978-1-4684-8094-8_8
- Ryall C. Further records and updates of range expansion in House Crow *Corvus splendens*. *Bull Br Ornithol Club*. 2016;136(1):39-45
- Saitoh T., Alström P., Nishiumi I., Shigeta Y., Williams D., Olsson U., Ueda K. Old divergences in a boreal bird supports long-term survival through the Ice Ages. *BMC Evol Biol*. 2010;10:35. doi 10.1186/1471-2148-10-35
- Sakka H., Quere J.P., Kartavtseva I., Pavlenko M., Chelomina G., Atopkin D., Bogdanov A., Michaux J. Comparative phylogeography of four *Apodemus* species (Mammalia: Rodentia) in the Asian Far East: evidence of Quaternary climatic changes in their genetic structure. *Biol J Linn Soc*. 2010;100(4):797-821. doi 10.1111/j.1095-8312.2010.01477.x
- Salinas P., Morinha F., Literak I., García J., Milá B., Blanco G. Genetic diversity, differentiation and historical origin of the isolated population of rooks *Corvus frugilegus* in Iberia. *J Avian Biol*. 2021; 52(3):e02689. doi 10.1111/jav.02689
- Saunders M.A., Edwards S.V. Dynamics and phylogenetic implications of MtDNA control region sequences in New World Jays (Aves: Corvidae). *J Mol Evol*. 2000;51(2):97-109. doi 10.1007/s002390010070
- Serizawa K., Suzuki H., Iwasa M., Tsuchiya K., Pavlenko M.V., Kartavtseva I.V., Chelomina G.N., Dokuchaev N.E., Han S.-H. A spatial aspect of mitochondrial DNA genealogy in *Apodemus peninsulae* from East Asia. *Biochem Genet*. 2002;40(5-6):149-161. doi 10.1023/a:1015841424598
- Song G., Zhang R., DuBay S.G., Qu Y., Dong L., Wang W., Zhang Y., Lambert D.M., Lei F. East Asian allopatry and north Eurasian sympatry in Long-tailed Tit lineages despite similar population dynamics during the late Pleistocene. *Zool Scripta*. 2016;45(2):115-126. doi 10.1111/zsc.12148
- Song G., Zhang R., Alström P., Irestedt M., Cai T., Qu Y., Ericson P.G.P., Fjeldsø J., Lei F. Complete taxon sampling of the avian genus *Pica* (magpies) reveals ancient relictual populations and synchronous Late-Pleistocene demographic expansion across the Northern Hemisphere. *J Avian Biol*. 2018;49(2):e01612. doi 10.1111/jav.01612
- Song G., Zhang R., Machado-Stredel F. Great journey of Great Tits (*Parus major* group): origin, diversification and historical demographics of a broadly distributed bird lineage. *J Biogeogr*. 2020;47: 1585-1598. doi 10.1111/jbi.13863
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A.G., Cosson J.F. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Mol Ecol*. 1998;7(4):453-464. doi 10.1046/j.1365-294x.1998.00289.x
- Toews D.P., Brelsford A. The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Mol Ecol*. 2012;21(16):3907-3930. doi 10.1111/j.1365-294X.2012.05664.x
- Toews D.P., Irwin D.E. Cryptic speciation in a Holarctic passerine revealed by genetic and bioacoustic analyses. *Mol Ecol*. 2008;17(11): 2691-2705. doi 10.1111/j.1365-294X.2008.03769.x
- Wang E., Van Wijk R.E., Braun M.S., Wink M. Gene flow and genetic drift contribute to high genetic diversity with low phylogeographical structure in European hoopoes (*Upupa epops*). *Mol Phylogenet Evol*. 2017;113:113-125. doi 10.1016/j.ympev.2017.05.018
- Webb W.C., Marzluff J.M., Omland K.E. Random interbreeding between cryptic lineages of the Common Raven: evidence for speciation in reverse. *Mol Ecol*. 2011;20(11):2390-2402. doi 10.1111/j.1365-294X.2011.05095.x
- Winkler D.W., Billerman S.M., Lovette I.J. Crows, Jays, and Magpies (Corvidae), version 1.0. In: Billerman S.M., Keeney B.K., Rodewald P.G., Schulenberg T.S. (Eds) *Birds of the World*. Ithaca, NY, USA: Cornell Lab. of Ornithology, 2020. doi 10.2173/bow.corvid1.01
- Yi S., Kim S.J. Vegetation changes in western central region of Korean Peninsula during the last glacial (ca. 21.1–26.1 cal kyr BP). *Geosciences J*. 2010;14:1-10. doi 10.1007/s12303-010-0001-9
- Zhang H., Yan J., Zhang G., Zhou K. Phylogeography and demographic history of Chinese black-spotted frog populations (*Pelophylax nigromaculata*): evidence for independent refugia expansion and secondary contact. *BMC Evol Biol*. 2008;8:21. doi 10.1186/1471-2148-8-21
- Zhang R., Song G., Qu Y., Alstrom P., Ramos R., Xing X., Ericson P., Fjeldsø J., Wang H., Yang X., Krustin A., Shestopalov A., Choe L.C., Fumin L. Comparative phylogeography of two widespread magpies: importance of habitat preference and breeding behavior on genetic structure in China. *Mol Phylogenet Evol*. 2012;65(2):562-572. doi 10.1016/j.ympev.2012.07.011
- Zhao N., Dai C., Wang W., Zhang R., Qu Y., Song G., Chen K., Yang X., Zou F., Lei F. Pleistocene climate changes shaped the divergence and demography of Asian populations of the great tit *Parus major*: evidence from phylogeographic analysis and ecological niche models. *J Avian Biol*. 2012;43(4):297-310. doi 10.1111/j.1600-048X.2012.05474.x
- Zink R.M. Comparative phylogeography in North American birds. *Evolution*. 1996;50(1):308-317. doi 10.1111/j.1558-5646.1996.tb04494.x
- Zink R.M., Barrowclough G.F. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Mol Ecol*. 2008;17:2107-2121. doi 10.1111/j.1365-294X.2008.03737.x
- Zink R.M., Pavlova A., Drovetski S., Rohwer S. Mitochondrial phylogeographies of five widespread Eurasian bird species. *J Ornithology*. 2008;149:399-413. doi 10.1007/s10336-008-0276-z
- Zink R.M., Pavlova A., Drovetski S., Wink M., Rohwer S. Taxonomic status and evolutionary history of the *Saxicola torquata* complex. *Mol Phylogenet Evol*. 2009;52(3):769-773. doi 10.1016/j.ympev.2009.05.016

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.12.2024. После доработки 04.02.2025. Принята к публикации 05.02.2025.

doi 10.18699/vjgb-25-62

Генетический потенциал к образованию биопленок клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa*

У.М. Немченко , Н.Л. Белькова  , Е.С. Клименко , Н.Е. Смурова , Р.Е. Зугеева , В.В. Синьков , Е.Д. Савилов 

Институт эпидемиологии и микробиологии, Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Россия

 nlbelkova@gmail.com

Аннотация. Бактерии вида *Pseudomonas aeruginosa* являются одной из ведущих причин нозокомиальных инфекций дыхательного тракта и играют важную роль в инфицировании нижних дыхательных путей у больных муковисцидозом (МВ). Биопленки, представляя собой организованные скопления клеток, обеспечивают выживаемость микроорганизмов в неблагоприятных условиях окружающей среды и способствуют хронизации инфекции и формированию персистирующих форм. Целью работы стало определение фенотипической способности и генетического потенциала к биопленкообразованию у клинических штаммов *P. aeruginosa*, персистирующих у пациентов с МВ на фоне постоянного приема антимикробных препаратов. Для характеристики пяти штаммов *P. aeruginosa*, полученных от пациентов с МВ, в работе применены бактериологические, молекулярно-генетические и биоинформатические методы. Фенотипически все штаммы отнесены к умеренно-образующим биопленку, при этом коэффициент биопленкообразования варьировал от 2.10 до 3.15. Анализ драфт-геномов выявил различия в представленности некоторых генов или отдельных локусов трех из четырех известных сигнальных путей, cAMP/Vfr, Gac/Rsm и c-di-GMP, которые описаны в геномах *P. aeruginosa* и имеют отношение к регуляции образования биопленок. Дополнительно показаны отличия в представленности таких генов, как *frzE*, *tcpE* и *rscC*. Несомненно интересен анализ генов *pppA*, *icmF*, *clpV1*, *trpE*, *trpG* и *stp1*, которые используются для расширенного мультилокусного типирования PubMLST и различаются по структуре локусов у всех проанализированных штаммов. Эти гены потенциально могут быть применены для типирования клинических штаммов *P. aeruginosa* с целью характеристики их биопленкообразующих свойств. Таким образом, в геномах клинических штаммов *P. aeruginosa*, длительно персистирующих у пациентов на фоне постоянного получения антибиотикотерапии, охарактеризованы гены, которые потенциально могут участвовать как в процессе биопленкообразования, так и в его регуляции. Характеристика генетического потенциала к образованию биопленок дает возможность поиска надежных генетических маркеров этого процесса для мониторинга эволюции возбудителя в результате длительной персистенции в организме хозяина.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*; муковисцидоз; биопленки; полногеномное секвенирование; сигнальные пути

Для цитирования: Немченко У.М., Белькова Н.Л., Клименко Е.С., Смурова Н.Е., Зугеева Р.Е., Синьков В.В., Савилов Е.Д. Генетический потенциал к образованию биопленок клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2025;29(4):594-599. doi 10.18699/vjgb-25-62

Финансирование. Работа выполнена в рамках поисковой технологии № 123051600027-1.

Genetic potential for biofilm formation of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*

U.M. Nemchenko , N.L. Belkova  , E.S. Klimenko , N.E. Smurova , R.E. Zugeeva , V.V. Sinkov , E.D. Savilov 

Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia

 nlbelkova@gmail.com

Abstract. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the leading causes of nosocomial respiratory tract infections and plays an important role in lower respiratory tract infection in patients with cystic fibrosis (CF). Biofilms, which are organized cell clusters, ensure the survival of microorganisms in unfavorable environmental conditions and contribute to the chronicity of infection and the formation of persistent forms. The aim of this study was to determine the phenotypic ability and genetic potential for biofilm formation in clinical strains of *P. aeruginosa* persisting in patients with CF against the background of constant intake of antimicrobial drugs. Bacteriological, genetic, and bioinformatic methods were used to characterize five *P. aeruginosa* strains obtained from patients with CF. Phenotypically, all strains were classified as moderately biofilm-forming, while the biofilm formation coefficient varied from 2.10 to 3.15. Analysis of draft genomes revealed differences in the representation of some genes or individual loci of three of the four known signaling pathways (cAMP/Vfr, Gac/Rsm, and c-di-GMP) that have been described in *P. aeruginosa* genomes and are related to the regulation of biofilm formation. In addition, differences in the representation of genes such as *frzE*, *tcpE*, and *rscC* are

shown. Of undoubted interest is the analysis of genes such as *pppA*, *icmF*, *clpV1*, *trpE*, *trpG*, and *stp1*, which are used for extended multilocus typing PubMLST and differed in the structure of loci in all analyzed strains. These genes can be used to identify clinical strains of *P. aeruginosa* and to characterize their biofilm-forming properties. Thus, genes potentially participating in both biofilm formation and regulation have been characterized in the genomes of clinical *P. aeruginosa* strains that persist for a long time in patients receiving continuous antibiotic therapy. Characterization of the genetic potential for biofilm formation makes it possible to search for reliable genetic markers of this process in order to monitor the evolution of the pathogen as a result of long-term persistence in the host organism.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; cystic fibrosis; biofilms; whole genome sequencing; signaling pathways

For citation: Nemchenko U.M., Belkova N.L., Klimenko E.S., Smurova N.E., Zugeeva R.E., Sinkov V.V., Savilov E.D. Genetic potential for biofilm formation of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(4):594-599. doi 10.18699/vjgb-25-62

Введение

Бактерии вида *Pseudomonas aeruginosa* являются одной из ведущих причин нозокомиальных инфекций дыхательного тракта и играют важную роль в инфицировании нижних дыхательных путей у больных муковисцидозом (МВ) (Parkins et al., 2018; Шагинян и др., 2019). Поверхностная колонизация и последующие образование и развитие биопленки дают инфекционным агентам многочисленные преимущества. Представляя собой организованные скопления клеток, заключенных в полисахаридный матрикс и защищенных от неблагоприятных условий окружающей среды, в том числе противомикробных препаратов, дезинфицирующих и антисептических средств биопленки обеспечивают выживаемость микроорганизмов. Такая структурная организация способствует повышению гетерогенности бактериальной популяции и отбору клеток, препятствующих повреждающим воздействиям путем приобретения и накопления генетических мутаций. Именно поэтому биопленкообразующие микроорганизмы – это значимый фактор, способствующий хронизации инфекции и формированию персистирующих форм (Pepesyan et al., 2021).

При рассмотрении патогенетического потенциала, который реализуется у *P. aeruginosa* в биопленочном состоянии у пациентов с МВ, следует отметить толерантность бактериальных клеток не только к антимикробным препаратам, дезинфицирующим и антисептическим средствам, но и к факторам врожденной и адаптивной защитной системы организма (Jurado-Martín et al., 2021; Fernández-Billón et al., 2023). В ответ на анаэробные условия, конкуренцию за ресурсы, высокие концентрации антибиотиков и иммунные реакции организма, такие как атаки нейтрофилов, реализуемые в легких при МВ, *P. aeruginosa* претерпевает микроэволюцию, приобретая спонтанные мутации, которые приводят к отбору клеток, лучше выживающих при длительной колонизации (Winstanley et al., 2016; Jurado-Martín et al., 2021). В экспериментальных исследованиях была показана способность *P. aeruginosa* образовывать биопленочные структуры в мокроте пациентов с МВ (Bjarnsholt et al., 2009), что является решающим фактором выживания и толерантности к антибиотикам, а невозможность полностью элиминировать бактерии напрямую связана с хронизацией инфекции (Elfadadny et al., 2024). Понимание механизмов адаптации и эволюции патогена во время хронических респираторных инфекций при МВ может стать ключом к поиску новых методов лечения инфекций *P. aeruginosa*.

Современные технологии секвенирования позволяют проводить анализ полных геномов условно-патогенных микроорганизмов не только для их типирования, но и для выявления молекулярных маркеров, потенциально значимых для инфекционного агента. В настоящее время на платформе KEGG PATHWAY Database создана карта основных сигнальных путей, охарактеризованных в геномах *P. aeruginosa* и имеющих отношение к регуляции образования биопленок (PATHWAY: ko02025; https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko02025). Карта ko02025 содержит информацию о 90 локусах, включенных в четыре основных сигнальных пути: путь цАМФ/Vfr, системы чувство кворума (англ. quorum sensing, QS), путь Gac/Rsm и сигнальный путь c-di-GMP.

Цель работы – определение фенотипической способности и генетического потенциала к биопленкообразованию у клинических штаммов *P. aeruginosa*, персистирующих у пациентов с МВ на фоне постоянного приема антимикробных препаратов.

Материалы и методы

Объектами исследования стали пять клинических штаммов *P. aeruginosa* из рабочей коллекции лаборатории микробиома и микрoэкологии Института эпидемиологии и микробиологии НЦ ПЗСРЧ. Штаммы выделены из мокроты от пациентов с МВ, проходивших лечение в ОГАУЗ Городская Ивано-Матренинская детская клиническая больница (г. Иркутск, Россия) и длительно получавших антибиотикотерапию. Идентификация штаммов проведена на основании морфо-биохимических тестов и подтверждена масс-спектрометрическим анализом (Немченко и др., 2022). Чувствительность к антимикробным препаратам определяли согласно критериям EUCAST (Немченко и др., 2024).

Способность штаммов к образованию биопленок (БП) изучали с помощью планшетного метода G.A. O'Toole (2011), с собственными модификациями (Немченко и др., 2020; Ситникова и др., 2022). Кратко: определение способности культур образовывать БП проводили с использованием 96-луночного стерильного плоскодонного пластикового иммунологического планшета. Суточную культуру бактерий стандартизировали в стерильном мяско-пептонном бульоне (МПБ) до 1×10^6 КОЕ/мл. Взвесь культур и контроль инокулировали по 150 мкл в лунку планшета в четырех повторностях. Контролем фона служил стерильный МПБ. Планшет инкубировали в суховоздушном термостате 18–20 ч при 37 °C. Окраску

Таблица 1. Краткие результаты сборки и аннотации геномов штаммов *P. aeruginosa*

Показатель	ИМБ101	ИМБ105	ИМБ103	ИМБ100	ИМБ104
Сборка геномов					
Число прочтений	12 369 102	13 477 896	3 737 929	36 044 976	14 328 761
Число контигов	121	274	278	258	487
N50	255 738	298 770	550 311	65 489	238 191
Покрытие	279	686	592	1500	179
Аннотация геномов					
GC, %	66	66	66	66	65
Число CDS	5895	5874	5910	5548	5935

био пленок выполняли по модифицированному методу G.A. O’Toole: планктонные клетки удаляли пипетированием, трехкратно промывали планшет стерильным физиологическим раствором, высушивали в течение 10–15 мин без крышки, окрашивали био пленки 1 % генцианвиолетом с последующей спиртовой экстракцией согласно методике (O’Toole, 2011). Биомассу сформированных пленок оценивали по оптической плотности (ОП) полученных экстрактов красителя генцианфиолетового при 492 нм (спектрофотометр STAT FAX®4300, США). Коэффициент био пленкообразования (КБП) рассчитывали как отношение A492эксп/A492контроль. Считали, что при значениях КБП ≤ 2 единицы штаммы относились к слабообразующим БП; при КБП от 2 до 3.99 – обладали умеренной способностью к образованию БП (Немченко и др., 2020; Григорова и др., 2021).

Полногеномное секвенирование. Геномную ДНК выделяли набором Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research, США). Полногеномное секвенирование штаммов проводили на оборудовании Illumina NextSeq 550 с использованием наборов реагентов для приготовления библиотек Illumina® DNA Prep Tagmentation, IDT® for Illumina® DNA/RNA UD Indexes Set Tagmentation и NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (300 Cycles) согласно рекомендациям производителя.

Биоинформатический анализ. Сборку геномов проводили с использованием программы SPAdes v3.11.1 (Bankevich et al., 2012). Упорядочивание контигов и коррекцию их ориентации выполняли с помощью MAUVE 2.4.0 (Rissman et al., 2009) и референсного генома *P. aeruginosa* PAO1 (GenBank AE004091.2) (табл. 1). Функциональную аннотацию осуществляли с использованием Prokka 1.14.6 (Seemann, 2014). Поиск генов, участвующих в био пленкообразовании, проводили с помощью базы данных KEGG (Kanehisa et al., 2022), PubMLST (Jolley et al., 2018). Полные геномы штаммов, полученные в работе, депонированы в базу данных NCBI, проект PRJNA1026796.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Центр разработки прогрессивных персонализированных технологий здоровья» и УНУ «Коллекция микробиоты человека Иркутской области» ФГБНУ ИЦ ПЗСРЧ (г. Иркутск).

Результаты

В работе проанализировано пять клинических штаммов *P. aeruginosa*, изолированных от пациентов с МБ, дли-

тельно получавших антибиотикотерапию. Фенотипически все штаммы отнесены к умеренно-образующим био пленку, при этом КБП варьировал от 2.10 до 3.15 (табл. 2). Минимальное значение КБП определено для штамма ИМБ101, максимальные – для ИМБ100 и ИМБ104 – 3.11 и 3.15 соответственно.

Для всех штаммов осуществлено полногеномное секвенирование. Основная задача настоящего исследования заключалась в поиске генов, которые потенциально могут участвовать как в процессе био пленкообразования, так и в его регуляции. Для рутинного поиска применяли карту ko02025 (KEGG PATHWAY Database). Дополнительно анализировали локусы, используемые в типировании штаммов вида *P. aeruginosa* на платформе PubMLST (Jolley et al., 2018), и вручную выполняли поиск генов, для которых ранее было показано участие в процессе био пленкообразования или его регуляции (Thelin, Taylor, 1996; Kearns, Shinkets, 1998; Wall et al., 2018).

Нами обнаружено, что все тестируемые гены локализованы в хромосомной ДНК. Различия между геномами исследованных штаммов найдены в наличии или отсутствии некоторых генов или в представленности локусов трех сигнальных путей: цАМФ/Vfr, Gac/Rsm и c-di-GMP (см. табл. 2). Дополнительный поиск генов, участвующих в био пленкообразовании, позволил выявить различия в наличии или отсутствии генов, преимущественно участвующих в регуляторных процессах: *frzE* (gliding motility regulatory protein – белок, регулирующий скользящую подвижность), *tcpE* (toxin coregulated pilus biosynthesis protein E – токсин-корегулируемый белок биосинтеза пилей E) и *rcsC* (sensor histidine kinase RcsC – сенсорная гистидинкиназа RcsC) (см. табл. 2). Наибольший интерес представляют гены, которые не только участвуют в сигнальных путях, согласно карте ko02025 (KEGG PATHWAY Database), но и используются для расширенного мультилокусного типирования PubMLST (табл. 3).

Для генов *hcp1* и *gacA* показана полная идентичность в геномах исследованных штаммов. Такие гены, как *ppkA*, *fha1*, *gacS*, не идентифицированы в штамме ИМБ100, который показал достаточно высокий коэффициент био пленкообразования (3.11). Следует отметить отсутствие гена *retS* в геномах штаммов ИМБ103 и ИМБ105, имеющих коэффициент био пленкообразования 2.91 и 2.50 соответственно. Несомненный интерес представляет анализ генов *pppA*, *icmF*, *clpV1*, *trpE*, *trpG* и *stp1*, которые различались по структуре локусов у всех проанализированных

Таблица 2. Фенотипическая характеристика и генетический потенциал исследуемых штаммов *P. aeruginosa* к биопленкообразованию

Показатель	ИМБ101	ИМБ105	ИМБ103	ИМБ100	ИМБ104
Коэффициент биопленкообразования	2.10	2.50	2.91	3.11	3.15
Путь цАМФ/Vfr					
<i>pil</i> ; twitching motility proteins	<i>pilT/Y/Q</i>	<i>pilT/Y/Q/A</i>	<i>pilT/Y/Q/A</i>	<i>pilT/Y/Q</i>	<i>pilT/Y/Q/A</i>
<i>cyuA</i> ; adenylate cyclase	–	–	+	–	–
Путь Gac/Rsm					
<i>hcpA</i> ; secreted protein Hcp	–	–	–	1–3	–
<i>hcpC</i> ; secreted protein Hcp	1	–	–	–	–
Сигнальный путь c-di-GMP					
<i>wbp</i> ; phosphomannose isomerase/ mannose-1-phosphate guanylyl transferase	<i>wbpABDEI</i>	<i>wbpA</i>	<i>wbpA</i>	–	–
Дополнительные гены, потенциально участвующие в биопленкообразовании, не включенные в карту ko02025					
<i>frzE</i> ; gliding motility regulatory protein	–	–	–	+	–
<i>tcpE</i> ; toxin coregulated pilus biosynthesis protein E	+	–	+	–	+
<i>rcsC</i> ; sensor histidine kinase RcsC	1–15	1–15	1–15	1–13	1–14

Примечание. Цифрами обозначено количество вариантов генов *hcpA*, *hcpC* и *rcsC* согласно аннотации геномов с помощью Prokka 1.14.6 (Seemann, 2014).

Таблица 3. Описание локусов, определенных в геномах исследуемых штаммов *P. aeruginosa*, для генов, используемых для расширенного MLST-типирования (PubMLST) и включенных в карту ko02025

Ген, синтезируемый белок	ИМБ101	ИМБ105	ИМБ103	ИМБ100	ИМБ104
Путь Gac/Rsm					
<i>hcp1</i> , protein secretion apparatus assembly protein	1	1	1	1	1
<i>pppA</i> , serine/threonine phosphatase	9	4	3	4	16
<i>lcmF1</i> , type VI secretion protein LcmF	72	5	19	120	39
<i>clpV1</i> , secretion protein ClpV1	67	176	22	113	120
<i>ppkA</i> , serine/threonine protein kinase PpkA	44	187	113	–	138
<i>fha1</i> , Fha domain-containing protein	127	6	26	–	326
<i>gacA</i> , response regulator GacA	3	3	3	3	3
<i>gacS</i> , sensor/response regulator hybrid protein	59	487	18	–	24
<i>retS</i> , sensor histidine kinase MifS	59	–	–	108	154
QS системы					
<i>trpE</i> , anthranilate synthase component I	58	5	14	5	116
<i>trpG</i> , anthranilate synthase component II	1	48	12	27	72
<i>stp1</i> , serine/threonine phosphoprotein phosphatase Stp1	34	82	4	13	70

штаммов. Эти гены потенциально могут быть использованы для типирования клинических штаммов *P. aeruginosa* с целью характеристики их биопленкообразующих свойств.

Обсуждение

P. aeruginosa – это условно-патогенная бактерия, вызывающая инфекции у людей с нарушенным иммунитетом или страдающих МБ. Инфицирование *P. aeruginosa* у пациентов с МБ проходит в форме острой инфекции, которая впоследствии развивается в хроническое респи-

раторное заболевание. Было высказано предположение, что с двумя стадиями инфекции связаны два разных взаимоисключающих набора факторов вирулентности (Brensic, Lory, 2009). Считают, что система секреции типа III (T3SS) и гены пилей типа IV связаны с острым заболеванием, в то время как система секреции типа VI (T6SS) HSI-I и образование биопленки важны во время хронической инфекции (Deretic et al., 1995; Brensic, Lory, 2009). В настоящее время идет активный поиск генов, экспрессирующихся на разных стадиях жизни бактериальных

патогенов, которые могут быть биомаркерами перехода из острой в хроническую форму инфекции и наоборот (Cao et al., 2023).

В настоящей работе проведен анализ фенотипических и генетических свойств штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов с МВ на фоне постоянного приема антибактериальных препаратов. Все штаммы определены как умеренно-образующие биопленки, но в их геномах найдены отличия в наличии/отсутствии некоторых генов или в локусах сигнальных путей, которые охарактеризованы в геномах клинических штаммов *P. aeruginosa* и имеют отношение как к формированию биопленок, так и к регуляции этого процесса. Несомненный интерес для поиска генетических маркеров определенного фенотипа, ассоциированного с формированием биопленочных структур, могут представлять гены, которые используются для расширенного мультилокусного типирования PubMLST и отвечают за отдельные стадии процесса формирования биопленок или его регуляции. В наших исследованиях мы определили 12 таких генов, при этом 9 из них относятся к сигнальному пути Gac/Rsm, а 3 – к системам QS.

Двухкомпонентная система GacS/GacA стимулирует экспрессию двух малых регуляторных РНК, RsmY и RsmZ, которые в свою очередь регулируют трансляционный репрессор RsmA. Члены семейства RsmA/CsrA были идентифицированы в геномах многих грамотрицательных бактериях, включая *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Escherichia coli*, некоторые виды *Salmonella*, *Legionella*, *Proteus*, *Helicobacter* и *Erwinia*, где они были вовлечены в регуляцию таких фенотипов, как вирулентность, подвижность, системы QS, и реакции на стресс (Brenner, Lory, 2009).

Системы QS – это форма межклеточной коммуникации бактерий, используемая многими видами для определения плотности популяции и координации экспрессии генов (Coggan, Wolfgang, 2012). Система QS достигается путем продукции сигнальных молекул, называемых аутоиндукторами, таким образом, что увеличение плотности бактериальной популяции приводит к их накоплению. После достижения пороговой концентрации аутоиндукторы связывают свои родственные рецепторы, которые напрямую или косвенно активируют экспрессию генов. В геномах *P. aeruginosa* кодируется три системы QS: две сигнальные системы на основе N-ацил-гомосеринлактона (AHL) и сигнальная система на основе 2-алкил-4-хинолона (AQ). Эти системы QS участвуют в регуляции продукции факторов вирулентности, созревании биопленки и фенотипах подвижности (Coggan, Wolfgang, 2012).

Следует отметить, что исследования транскрипционных профилей разных клинических штаммов *P. aeruginosa*, выращенных в планктонных и биопленочных условиях, показали, что транскрипционные профили, выявленные в планктонных условиях роста, были довольно схожи, более расходящиеся транскрипционные профили были зарегистрированы, когда изоляты выращивались в биопленочных условиях (Thöming et al., 2020). В модельных экспериментах показано, что различные группы клинических изолятов следуют параллельным эволюционным путям и производят схожие фенотипы. Эта конвергенция фенотипов организмов наблюдалась для множества признаков, включающих формирование различных структур

биопленки, характеризующихся специфическими транскрипционными сигнатурами, а также фенотипами вирулентности и подвижности (Thöming et al., 2020).

Можно предполагать, что, несмотря на разные сиквенс-типы, идентифицируемые у пациентов с МВ, переход в персистирующую форму при хронизации инфекции *P. aeruginosa* будет не просто стимулировать экспрессию определенных генов для создания определенного фенотипа патогена, но и формировать соответствующий генотип, реализуя потенциал генетической гетерогенности бактериальной популяции. Нужно также отметить, что гены, для которых показано участие в образовании биопленок или регуляции этого процесса (согласно карте ko02025), используются для расширенного мультилокусного типирования PubMLST и могут быть задействованы для типирования клинических штаммов *P. aeruginosa* с целью характеристики их биопленкообразующих свойств.

Заключение

В геномах клинических штаммов *P. aeruginosa*, длительно персистирующих у пациентов с МВ на фоне постоянного получения антибиотикотерапии, выявлены гены, которые потенциально могут участвовать как в процессе биопленкообразования, так и в его регуляции. Характеристика генетического потенциала к образованию биопленок дает возможность поиска надежных генетических маркеров этого процесса для мониторинга эволюции возбудителя в результате длительной персистенции в организме хозяина.

Список литературы / References

- Григорова Е.В., Немченко У.М., Воропаева Н.М., Белькова Н.Л., Носкова О.А., Савилов Е.Д. Биопленкообразование под воздействием дезинфицирующих средств с разным активным компонентом у *Pseudomonas aeruginosa*. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2021;171(6):733-738. doi 10.47056/0365-9615-2021-171-6-733-738
- [Grigorova E.V., Nemchenko U.M., Voropaeva N.M., Belkova N.L., Noskova O.A., Savilov E.D. Effect of disinfectants with different active ingredients on biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bull Exp Biol Med*. 2021;171(6):745-749. doi 10.1007/s10517-021-05308-y]
- Немченко У.М., Кунгурцева Е.А., Григорова Е.В., Белькова Н.Л., Маркова Ю.А., Носкова О.А., Чemezova Н.Н., Савилов Е.Д. Моделирование бактериальных биопленок и оценка чувствительности возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, к дезинфицирующему средству Секусепт актив. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020;65(10):652-658. doi 10.18821/0869-2084-2020-65-10-652-658
- [Nemchenko U.M., Kungurtseva E.A., Grigorova E.V., Belkova N.L., Markova Yu.A., Noskova O.A., Chemezova N.N., Savilov E.D. Simulation of bacterial biofilms and estimation of the sensitivity of healthcare-associated infection pathogens to bactericide Sekusept active. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2020;65(10):652-658. doi 10.18821/0869-2084-2020-65-10-652-658 (in Russian)]
- Немченко У.М., Ситникова К.О., Белькова Н.Л., Григорова Е.В., Воропаева Н.М., Сухорева М.В., Сухарева Е.С., Савилов Е.Д. Влияние антимикробных препаратов на биопленкообразование *Pseudomonas aeruginosa*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(5):495-501. doi 10.18699/VJGB-22-60
- [Nemchenko U.M., Sitnikova K.O., Belkova N.L., Grigorova E.V., Voropaeva N.M., Sukhoreva M.V., Sukhareva E.S., Savilov E.D. Effects of antimicrobials on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm for-

- mation. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii* = *Vavilov J. Genet. Breed.* 2022;26(5):495-501. doi 10.18699/VJGB-22-60]
- Немченко У.М., Белькова Н.Л., Клименко Е.С., Смурова Н.Е., Савилов Е.Д. Фенотипическая и генетическая изменчивость клинических изолятов *Pseudomonas aeruginosa*, персистирующих у пациентов с муковисцидозом. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2024;26(S1):42 [Nemchenko U.M., Belkova N.L., Klimenko E.S., Smurova N.E., Savilov E.D. Phenotypic and genetic variability of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* persisting in patients with cystic fibrosis. *Klinicheskaa Mikrobiologia i Antimikrobnaa Himioterapiya* = *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2024;26(S1):42 (in Russian)]
- Ситникова К.О., Немченко У.М., Воропаева Н.М., Григорова Е.В., Савилов Е.Д., Маркова Ю.А., Белькова Н.Л. Динамика образования биопленок клинически значимыми штаммами условно-патогенных бактерий. *Acta Biomedica Scientifica*. 2022;7(5-1):119-128. doi 10.29413/ABS.2022-7-5-1.13 [Sitnikova K.O., Nemchenko U.M., Voropaeva N.M., Grigорова E.V., Savilov E.D., Markova Yu.A., Belkova N.L. The effectiveness of biofilm formation of daily cultures of clinically significant strains of opportunistic bacteria. *Acta Biomedica Scientifica*. 2022;7(5-1):119-128. doi 10.29413/ABS.2022-7-5-1.13 (in Russian)]
- Шагинян И.А., Аветисян Л.Р., Чернуха М.Ю., Сиянова Е.А., Бурмистров Е.М., Воронкова А.Ю., Кондратьева Е.И., Чучалин А.Г., Гинцбург А.Л. Эпидемиологическая значимость молекулярной изменчивости генома изолятов *Pseudomonas aeruginosa*, вызывающих хроническую инфекцию легких у больных муковисцидозом. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019;21(4):340-351. doi 10.36488/cm.2019.4.340-351 [Shaginyan I.A., Avetisyan L.R., Chernukha M.Yu., Siyanova E.A., Burmistrov E.M., Voronkova A.Yu., Kondratieva E.I., Chuchalin A.G., Gintzburg A.L. Epidemiological significance of genome variations in *Pseudomonas aeruginosa* causing chronic lung infection in patients with cystic fibrosis. *Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Himioterapiya* = *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2019;21(4):340-351. doi 10.36488/cm.2019.4.340-351 (in Russian)]
- Банкевич А., Нурк С., Антипов Д., Гуревич А.А., Дворкин М., Куликов А.С., Лесин В.М., ... Сироткин А.В., Вяйхки Н., Теслер Г., Алексеев М.А., Певзнер П.А. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012;19(5):455-477. doi 10.1089/cmb.2012.0021
- Bjarnsholt T., Jensen P.Ø., Flandaca M.J., Pedersen J., Hansen C.R., Andersen C.B., Pressler T., Givskov M., Høiby N. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol*. 2009;44(6):547-558. doi 10.1002/ppul.21011
- Brenci A., Lory S. Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Mol Microbiol*. 2009;72(3):612-632. doi 10.1111/j.1365-2958.2009.06670.x
- Cao P., Fleming D., Moustafa D.A., Dolan S.K., Szymanik K.H., Redman W.K., Ramos A., Diggle F.L., Sullivan C.S., Goldberg J.B., Rumbaugh K.P., Whiteley M. A *Pseudomonas aeruginosa* small RNA regulates chronic and acute infection. *Nature*. 2023;618(7964):358-364. doi 10.1038/s41586-023-06111-7
- Coggan K.A., Wolfgang M.C. Global regulatory pathways and cross-talk control *Pseudomonas aeruginosa* environmental lifestyle and virulence phenotype. *Curr Issues Mol Biol*. 2012;14(2):47-70. doi 10.21775/cimb.014.047
- Deretic V., Schurr M.J., Yu H. *Pseudomonas aeruginosa*, mucoidy and the chronic infection phenotype in cystic fibrosis. *Trends Microbiol*. 1995;3(9):351-356. doi 10.1016/s0966-842x(00)88974-x
- Elfadadny A., Ragab R.F., AlHarbi M., Badshah F., Ibáñez-Arancibia E., Farag A., Hendawy A.O., De Los Ríos-Escalante P.R., Aboubakr M., Zakai S.A., Nageeb W.M. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: navigating clinical impacts, current resistance trends, and innovations in breaking therapies. *Front Microbiol*. 2024;15:1374466. doi 10.3389/fmicb.2024.1374466
- Fernández-Billón M., Llambías-Cabot A.E., Jordana-Lluch E., Oliver A., Macià M.D. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Biofilm*. 2023;5:100129. doi 10.1016/j.biofilm.2023.100129
- Jolley K.A., Bray J.E., Maiden M.C.J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res*. 2018;3:124. doi 10.12688/wellcomeopenres.14826.1
- Jurado-Martin I., Sainz-Mejias M., McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: an audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6):3128. doi 10.3390/ijms22063128
- Kanehisa M., Sato Y., Kawashima M. KEGG mapping tools for uncovering hidden features in biological data. *Protein Sci*. 2022;31(1):47-53. doi 10.1002/pro.4172
- Kearns D.B., Shimkets L.J. Chemotaxis in a gliding bacterium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(20):11957-11962. doi 10.1073/pnas.95.20.11957
- O'Toole G.A. Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp*. 2011;30(47):2437. doi 10.3791/2437
- Parkins M.D., Somayaji R., Waters V.J. Epidemiology, biology, and impact of clonal *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(4):e00019-18. doi 10.1128/cmr.00019-18
- Penesyan A., Paulsen I.T., Kjelleberg S. Three faces of biofilms: a microbial lifestyle, a nascent multicellular organism, and an incubator for diversity. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2021;7(1):80. doi 10.1038/s41522-021-00251-2
- Rissman A.I., Mau B., Biehl B.S., Darling A.E., Glasner J.D., Perna N.T. Reordering contigs of draft genomes using the Mauve Aligner. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2071-2073. doi 10.1093/bioinformatics/btp356
- Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014;30(14):2068-2069. doi 10.1093/bioinformatics/btu153
- Thelin K.H., Taylor R.K. Toxin-coregulated pilus, but not mannose-sensitive hemagglutinin, is required for colonization by *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype and O139 strains. *Infect Immun*. 1996;64(7):2853-2856. doi 10.1128/iai.64.7.2853-2856.1996
- Thöming J.G., Tomasch J., Preusse M., Koska M., Grahl N., Pohl S., Willger S.D., Kaefer V., Müschen M., Häussler S. Parallel evolutionary paths to produce more than one *Pseudomonas aeruginosa* biofilm phenotype. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2020;6:2. doi 10.1038/s41522-019-0113-6
- Wall E., Majdalani N., Gottesman S. The complex Rcs regulatory cascade. *Annu Rev Microbiol*. 2018;72:111-139. doi 10.1146/annurev-micro-090817-062640
- Winstanley C., O'Brien S., Brockhurst M.A. *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections. *Trends Microbiol*. 2016;24:327-337. doi 10.1016/j.tim.2016.01.008

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 08.11.2024. После доработки 17.01.2025. Принята к публикации 14.02.2025.

doi 10.18699/vjgb-25-63

Env-псевдовirusы на основе генетического варианта, циркулирующего на территории Сибири

Н.Б. Рудометова , А.А. Фандо , Д.Н. Щербаков , Б.Н. Зайцев , А.П. Рудометов , Л.И. Карпенко 

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия
 nadenkaand100@mail.ru

Аннотация. Несмотря на многочисленные усилия мирового сообщества, остановить пандемию ВИЧ/СПИД пока не удастся. Чтобы остановить распространение вируса, требуются эффективная профилактическая вакцина, а также поиск новых противовирусных агентов. Для того чтобы иметь возможность быстро и адекватно оценивать разрабатываемые вакцинные конструкции, характеризовать ВИЧ-специфические антитела и потенциальные лекарственные препараты, необходим надежный метод тестирования. В этом аспекте хорошо зарекомендовал себя анализ нейтрализации вирусного псевдотипа с использованием панели Env-псевдовirusов разных субтипов ВИЧ-1. В настоящее время созданы отдельные панели псевдовirusов основных генетических подтипов ВИЧ-1: А, В, С и ряда CRF. Эти панели необходимы для получения стандартизированных наборов данных, которые могут быть использованы для ранжирования эффективности вакцины и выявления перспективных кандидатов для дальнейшего исследования. На сегодняшний день в европейской части России доминирует субтип А6 ВИЧ-1, а в Сибири – рекомбинантная форма CRF63_02A6, которая обнаруживается более чем в 80 % новых случаев ВИЧ-1 в Сибири. Цель работы состояла в расширении и характеристике коллекции Env-псевдовirusов, полученных на основе рекомбинантной формы CRF63_02A6 ВИЧ-1, циркулирующей в регионах Сибири. В настоящем исследовании получены и охарактеризованы два новых варианта Env-псевдовirusов на основе CRF63_02A6 ВИЧ-1, которые вошли в нашу коллекцию. Коллекция включает 13 Env-псевдовirusов, являющихся CCR5-тропными. Филогенетический анализ полноразмерных нуклеотидных последовательностей гена *env* подтвердил, что все 13 псевдовirusов кластеризуются с референсными последовательностями рекомбинантной формы CRF63_02A6. Env-псевдовirusы были охарактеризованы с помощью широко нейтрализующих антител (bnAb), нацеленных на разные регионы уязвимости ВИЧ-1, расположенных на поверхности гликопротеиновых комплексов Env. Показано, что Env-псевдовirusы чувствительны к нейтрализации bnAb VRC01 и 10E8; умеренно чувствительны к нейтрализации bnAb PG9 и PGT126; и устойчивы к нейтрализации антителами 2G12 и 2F5. Полученная коллекция – важное дополнение к существующим в мире панелям псевдовirusов против других подтипов ВИЧ-1.

Ключевые слова: ВИЧ-1; CRF63_02A6; Env-псевдовirusы; bnAb; анализ вирусной нейтрализации

Для цитирования: Рудометова Н.Б., Фандо А.А., Щербаков Д.Н., Зайцев Б.Н., Рудометов А.П., Карпенко Л.И. Env-псевдовirusы на основе генетического варианта, циркулирующего на территории Сибири. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(4):600-607. doi 10.18699/vjgb-25-63

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Env-pseudoviruses based on the HIV-1 genetic variant circulating in Siberia

N.B. Rudometova , A.A. Fando , D.N. Shcherbakov , B.N. Zaitsev , A.P. Rudometov , L.I. Karpenko 

State Research Center Center of Virology and Biotechnology "Vector" Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia
 nadenkaand100@mail.ru

Abstract. Despite numerous efforts of the global community, it is still not possible to stop the HIV/AIDS pandemic. To stop the spread of the virus, an effective preventive vaccine is needed, as well as the search for new antiviral agents. In order to be able to quickly and adequately evaluate the developed vaccine constructs, characterize HIV-specific antibodies and potential drugs, a reliable testing method is needed. In this regard, pseudotype neutralization assays using a panel of Env-pseudoviruses of different HIV-1 subtypes has proven itself well. Currently, separate panels of Env-pseudoviruses of the main genetic subtypes of HIV-1 (A, B, C and a number CRFs) have been created. These panels are necessary to obtain standardized data sets that can be used to rank the effectiveness of the vaccine and identify promising candidates for further study. Currently, the HIV-1 subtype A6 dominates in the European part of Russia, and the recombinant form CRF63_02A6, which has currently been detected in more than 80 % of new

HIV-1 cases in Siberia, dominates in Siberia. The aim of this work was to expand and characterize the collection of Env-pseudoviruses obtained on the basis of the recombinant form CRF63_02A6 of HIV-1 circulating in Siberia. In this study, two new variants of Env-pseudoviruses based on CRF63_02A6 of HIV-1 were obtained, characterized, and included in our collection. At present, the collection includes 13 Env-pseudoviruses that are CCR5-tropic. Phylogenetic analysis of the full-length nucleotide sequences of the *env* gene confirmed that all 13 pseudoviruses cluster with the reference sequences of the recombinant form CRF63_02A6. The Env-pseudoviruses were characterized using broadly neutralizing antibodies (bnAbs) targeting different regions of vulnerability of HIV-1 located on the surface of Env glycoprotein complexes. It was shown that the Env-pseudoviruses are sensitive to neutralization by bnAbs VRC01 and 10E8; moderately sensitive to neutralization by bnAbs PG9 and PGT126; and resistant to neutralization by antibodies 2G12 and 2F5. The resulting collection is an important addition to the existing panels of pseudoviruses against other HIV-1 subtypes in the world.

Key words: HIV-1; CRF63_02A6; Env-pseudoviruses; bnAbs; virus neutralization assay

For citation: Rudometova N.B., Fando A.A., Shcherbakov D.N., Zaitsev B.N., Rudometov A.P., Karpenko L.I. Env-pseudoviruses based on the HIV-1 genetic variant circulating in Siberia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(4):600-607. doi 10.18699/vjgb-25-63

Введение

Инфекция, вызванная вирусом иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1), представляет собой серьезную проблему мирового здравоохранения. Несмотря на достигнутые успехи антиретровирусной терапии (АРТ), до сих пор не удается остановить распространение ВИЧ. По данным ВОЗ, около 1.2 млн человек ежегодно заражаются ВИЧ-1¹. В значительной степени это связано с тем, что применение препаратов для лечения ВИЧ-инфекции сопровождается возникновением мутаций устойчивости у вируса². В результате требуется разработка более эффективных препаратов. Вакцинация населения смогла бы обеспечить надежную защиту против ВИЧ/СПИДа, но, к сожалению, эффективная вакцина пока не создана (Levy, 2024). Разработка вакцины против ВИЧ-1 является очень сложной задачей из-за высокой изменчивости вируса и его способности интегрироваться в геном человека. Исследования в этой области в настоящее время идут в направлении разработки иммуногенов, способных индуцировать антитела, нейтрализующие широкий спектр изолятов ВИЧ-1 (bnAb) (Trkola, Moore, 2024).

Для того чтобы иметь возможность быстро и адекватно оценивать разрабатываемые вакцинные конструкции, характеризовать ВИЧ-специфические антитела и потенциальные лекарственные препараты (ингибиторы проникновения), необходим надежный метод тестирования. В этом аспекте наилучшим образом зарекомендовала себя технология Env-псевдовirusов. Анализ нейтрализующей активности с использованием псевдовirusов имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционными реплицирующимися вирусными системами в культурах мононуклеарных клеток периферической крови. Во-первых, псевдовirusы не способны к репликации и с ними можно безопасно обращаться за пределами дорогостоящей лаборатории с уровнем биобезопасности 3. Во-вторых, анализы нейтрализации или ингибирования можно проводить на перевиваемой клеточной линии, тем самым снижая потребность в первичных донорских клетках. В совокупности эти элементы обеспечивают точность, воспроизводимость и простоту стандартизации анализов на основе псевдовirusов (Рудометова и др., 2022).

В настоящее время созданы отдельные панели псевдовirusов основных генетических подтипов ВИЧ-1: А, В, С и ряда CRF (Li et al., 2005; Hrabec et al., 2017; Wang et al., 2018; Stefic et al., 2019). Эти панели необходимы для получения стандартизированных наборов данных, которые могут быть использованы для ранжирования эффективности вакцины и выявления перспективных кандидатов для дальнейшего исследования (deCamp et al., 2014).

Следует отметить, что в Российской Федерации генетическое разнообразие ВИЧ-1 имеет региональную специфику (Антонова и др., 2023). В европейской части России доминирует субтип А6 ВИЧ-1 (Антонова и др., 2023; Кузнецова и др., 2023), а в Сибири – рекомбинантная форма CRF63_02A6 (Maksimenko et al., 2020; Rudometova et al., 2021), которая в настоящее время обнаруживается более чем в 80 % новых случаев ВИЧ-1 в Сибири (Sivay et al., 2022). Ряд данных свидетельствует о том, что CRF63_02A6 более заразна и может иметь более высокую репликативную активность, чем другие подтипы, что может привести к росту количества инфицированных этим вариантом вируса (Богачева и др., 2017). С учетом вышесказанного существует необходимость в разработке отдельной коллекции псевдовirusов для CRF63_02A6 ВИЧ-1.

Ранее нами было описано получение ряда Env-псевдовirusов, относящихся к рекомбинантной форме CRF63_02A6 (Rudometova et al., 2022). Однако для обеспечения актуальности коллекции необходимо проведение постоянной работы, направленной на получение новых псевдовirusов на основе циркулирующих штаммов ВИЧ-1.

Цель данной работы – расширение и характеристика коллекции Env-псевдовirusов, полученных на основе рекомбинантной формы CRF63_02A6 ВИЧ-1, циркулирующей в регионах Сибири.

Материалы и методы

Для исследования было отобрано 63 образца сывороток ВИЧ-инфицированных доноров Кемеровской области и Республики Алтай, которые были предоставлены региональными центрами СПИД в соответствии с решениями, принятыми этическими комитетами вышеуказанных организаций. Каждому образцу был присвоен анонимный

¹ HIV statistics, globally and by WHO region, 2024.

² HIV drug resistance: brief report, 2024.

номер в соответствии с требованиями этических норм Российской Федерации. Далее из индивидуальной сыворотки выделяли РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-Сорб» («Амплисенс», Россия) согласно рекомендациям производителя. Выделенные образцы РНК хранили при -80°C .

Для получения амплифицированных вариантов гена *env* ВИЧ-1 проводили реакцию обратной транскрипции, совмещенную с ПЦР (ОТ-ПЦР), с использованием праймеров Env_S-1 и Env_02A_AS_1 (5'-TTGGGTGTCAAC ATAGCAGAATAGG-3' и 5'-CCTGTGGCCTGACTGGA AAGC-3') и набора реагентов SuperScript™ IV One-Step RT-PCR System (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя. После проведения ОТ-ПЦР продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле.

Клонирование амплифицированных вариантов гена *env* ВИЧ-1 осуществляли в составе коммерческого экспрессионного вектора pcDNA3.1/V5-His TOPO TA (Invitrogen). Трансформацию химически компетентных клеток *Escherichia coli* штамм Stbl3 (Thermo Fisher Scientific, США) проводили по методу теплового шока (Chang et al., 2017) и отбирали клоны, несущие плазмиду со встроенным геном *env*.

Для наработки Env-псевдовирuсов проводили трансфекцию культуры клеток HEK293 сконструированными рекомбинантными плазмидами pEnv совместно с коровой плазмидой pSG3Δenv (NIH Reagent Program) с использованием липофектамина 3000 (Invitrogen) в формате 6-луночного планшета. Через 48 ч после трансфекции собирали псевдовирuсные частицы путем фильтрации культуральной среды через 0.45-микронный фильтр; концентрировали в 20 % растворе сахарозы в течение 3 ч при 25000 об.; делали аликвоты по 1 мл и хранили при -80°C .

Электронно-микроскопические изображения получали методом негативного контрастирования с помощью электронного микроскопа JEM-1400 с ускоряющим напряжением 80 кВ, при увеличении от 10000 до 80000х.

Функциональную активность псевдовирuсов определяли с использованием клеточной линии TZM-bl (NIH Reagent Program, США) по методике, описанной ранее (Revilla et al., 2011). Клоны псевдовирuсов считали функциональными и пригодными для дальнейшей работы, если уровень люминесценции клеток TZM-bl, несущих эти клоны, как минимум в 50 раз превышал уровень люминесценции клеток без добавления псевдовирuсных частиц.

Нуклеотидные последовательности амплифицированных вариантов гена *env* ВИЧ-1 были определены путем секвенирования по методу Сэнгера (ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН, Новосибирск). Полученные секвеннограммы анализировали с помощью программы BioEdit.

Субтипическую принадлежность вариантов гена *env* ВИЧ-1 определяли с использованием онлайн-ресурса HIV BLAST (https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/BASIC_BLAST/basic_blast.html). Построение филогенетического дерева осуществляли с помощью IQ-TREE на портале <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/IQTREE/iqtree.html> с добавлением эталонных референсных последовательностей субтипов ВИЧ1 из Лос-Аламосской базы дан-

ных последовательностей ВИЧ-1 (<http://www.hiv.lanl.gov/>). Тропность полученных Env-псевдовирuсов ВИЧ-1 к корецептору (CCR5 или CXCR4) определяли по нуклеотидной последовательности V3-петли с использованием онлайн-программы geno2pheno (<http://coreceptor.geno2pheno.org/>).

Анализ нейтрализации псевдовирuсов моноклональными широко нейтрализующими антителами (bnAb) проводили по методике, описанной ранее (Revilla et al., 2011). В работе использовали моноклональные bnAb к ВИЧ-1, нацеленные на разные регионы уязвимости на поверхности тримерных комплексов gp120/gp41 – 2G12, VRC01, PG9, PGT126, 2F5, 10E8 (NIH HIV Reagent Program). Образцы тестировали в двух повторах, эксперимент повторяли дважды. Статистическую обработку данных и вычисление IC_{50} осуществляли с применением программы GraphPad Prism 9.

Результаты

Получение новых вариантов

Env-псевдовирuсов ВИЧ-1

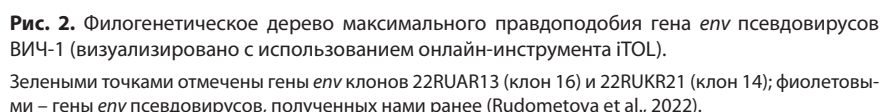
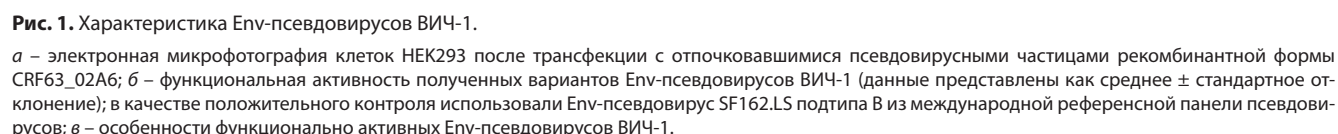
В результате проведенного исследования с помощью ОТ-ПЦР амплифицировано пять полноразмерных вариантов гена *env*, которые были клонированы в составе экспрессионного плазмидного вектора. Для каждого варианта гена *env* получено от одной до шести генетических конструкций со вставкой, которые использовали для котрансфекции.

Далее проводили наработку Env-псевдовирuсов и определяли их функциональную активность. Формирование псевдовирuсных частиц регистрировали с помощью электронной микроскопии (рис. 1, а). Функциональный анализ полученных вариантов псевдовирuсов показал, что сборка функционально активных псевдовирuсных частиц происходит для двух вариантов псевдовирuсов, 22RUAR13 (клон 16) и 22RUKR21 (клон 14) (см. рис. 1, б). Уровень люминесценции клеток, несущих эти клоны, более чем в 150 раз превышал уровень люминесценции чистых клеток. Данные секвенирования и филогенетический анализ подтвердили, что функциональные Env-псевдовирuсы принадлежат к рекомбинантной форме CRF63_02A6 и являются CCR5-тропными (см. рис. 1, в).

Характеристика коллекции

Env-псевдовирuсов CRF63_02A6 ВИЧ-1

Ранее нами было получено 11 Env-псевдовирuсов, относящихся к рекомбинантной форме CRF63_02A6 (Rudometova et al., 2022). В данной работе мы дополнили коллекцию двумя новыми псевдовирuсами и решили провести более детальную ее характеристику. Выполнен филогенетический анализ полноразмерных нуклеотидных последовательностей гена *env*, который подтвердил, что все 13 псевдовирuсов кластеризуются с референсными последовательностями рекомбинантной формы CRF63_02A6 (рис. 2). Из представленных данных (см. рис. 2), видно, что наблюдается определенная генетическая гетерогенность из-за наличия различий в нуклеотидных последовательностях генов *env* псевдовирuсов, вошедших в коллекцию.



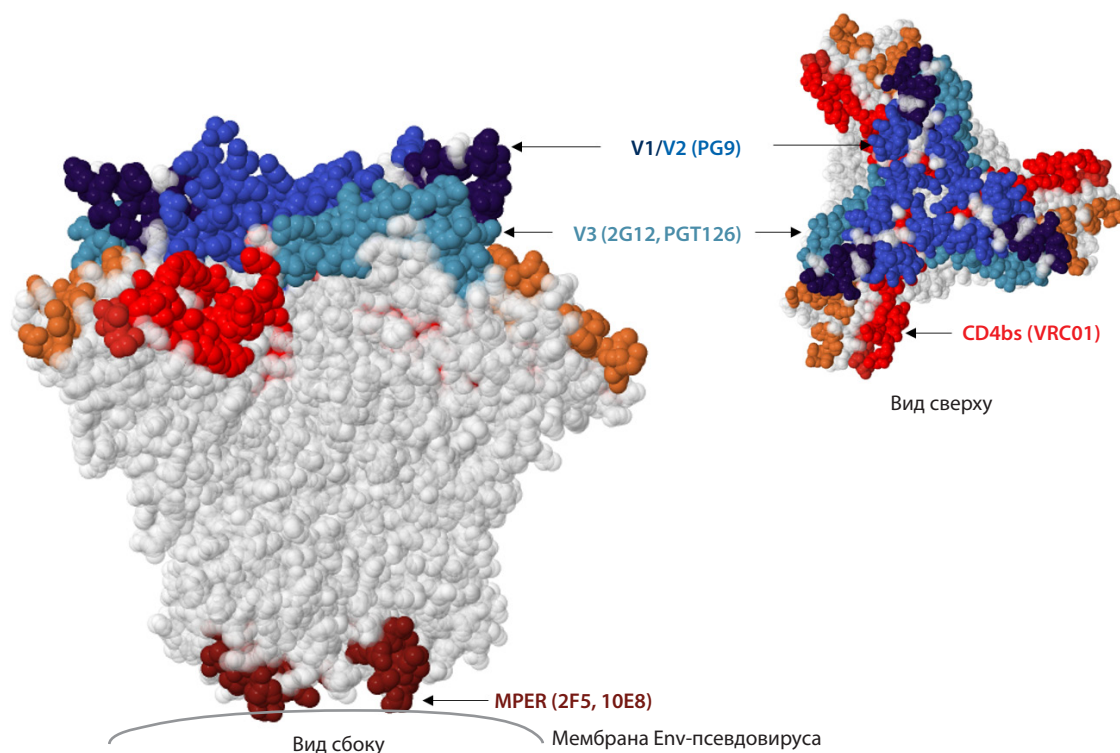


Рис. 3. Сайты уязвимости широко нейтрализующих антител на модели Env тримера (PDB: 4ZMJ).

Модель Env тримера ВИЧ-1 визуализирована с использованием программы HIV 3D Structure Viewer. В скобках указаны обозначения широко нейтрализующих антител (bnAb), связывающихся с сайтами уязвимости вируса и используемых в данной работе.

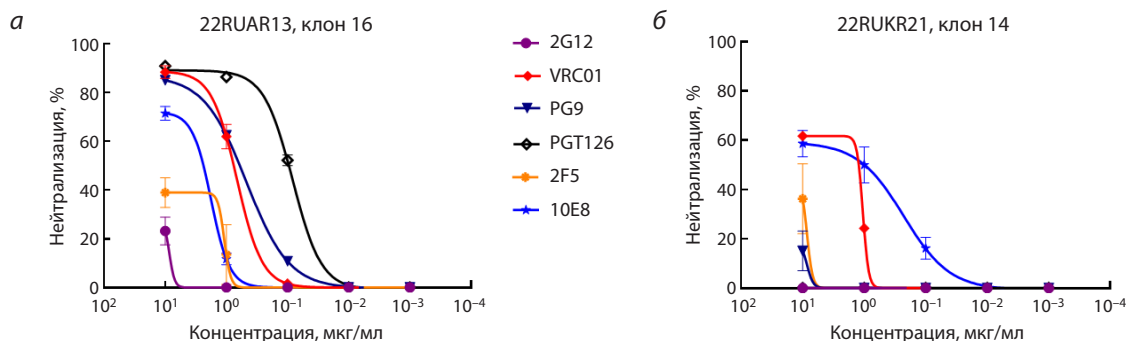


Рис. 4. Нейтрализующая активность моноклональных широко нейтрализующих антител в отношении Env-псевдовирусов ВИЧ-1 22RUAR13, клон 16 (а) и 22RUKR21, клон 14 (б).

Определение фенотипа нейтрализации

Псевдовirusy, обладающие функциональной активностью, были исследованы в реакции нейтрализации псевдовируса с антителами, обладающими способностью нейтрализовать широкий спектр изолятов ВИЧ-1 (bnAb). Для анализа были выбраны bnAb, узнающие основные участки уязвимости ВИЧ-1 на тримерном комплексе gp120/gp41 (рис. 3): bnAb VRC01 – связывания вируса с клеточным рецептором CD4; bnAb PG9 – структуру переменных петель V1/V2 на вершине тримера; bnAb 2G12 и PGT126 – область петли V3 в комплексе в гликанами; bnAb 2F5 и 10E8 – мембрано-проксимальную наружную область gp41 (MPER) (Walsh, Seaman, 2021; Thavarajah et al., 2024).

В качестве примера на рис. 4 приведены типичные кривые нейтрализации Env-псевдовирусов моноклональными

широко нейтрализующими антителами для новых вариантов 22RUAR13 (клон 16) и 22RUKR21 (клон 14).

Согласно полученным данным (рис. 4), Env-псевдовирус 22RUAR13 (клон 16) оказался высокочувствительным к нейтрализации моноклональными антителами VRC01, PG9 и PGT126; проявил умеренную чувствительность к нейтрализации антителом 10E8; он оказался устойчивым к нейтрализации антителами 2G12 и 2F5. В то же время псевдовирус 22RUKR21 (клон 14) продемонстрировал умеренную чувствительность к нейтрализации антителами VRC01 и 10E8 и оказался устойчивым к нейтрализации антителами 2G12, PG9, 2F5 и PGT126.

В таблице приведены значения IC_{50} , определенные для bnAb в отношении всей нашей коллекции Env-псевдовирусов рекомбинантной формы CRF63_02A6, включая

Значения IC_{50} , определенные для bnAb в отношении Env-псевдовirusов рекомбинантной формы CRF63_02A6

Env-псевдовirus	IC_{50} , мкг/мл					
	VRC01	PG9	2G12	PGT126	2F5	10E8
22RUAR13	0.75	0.62	>10	0.097	>10	2.41
22RUKR21	1.22	>10	>10	>10	>10	1.02
16RU12	0.11	>10	>10	>10	>10	0.02
16RU13	1.71	4.83	>10	0.11	>10	0.05
16RU19	2.63	1.61	>10	0.03	8.43	0.12
16RU20	0.11	0.22	>10	0.16	>10	0.12
16RU21	0.11	4.23	2.31	>10	>10	0.01
16RU22	2.93	6.72	>10	0.01	8.0	0.15
16RU23	3.81	>10	>10	>10	>10	0.11
16RU27	0.31	>10	1.71	0.19	>10	0.61
16RU28	0.31	1.0	1.42	0.01	4.51	0.32
16RU35	0.43	>10	>10	0.11	3.52	0.19
16RU36	0.32	0.22	>10	0.41	>10	0.26

22RUAR13 и 22RUKR21. Сравнительный анализ IC_{50} показал, что Env-псевдовirusы данной коллекции имеют достаточно гетерогенную чувствительность к нейтрализации bnAb (см. таблицу), которая, вероятно, обусловлена их антигенными различиями (Приложение)³. Как видно из таблицы, Env-псевдовirusы рекомбинантной формы CRF63_02A6 демонстрируют высокую чувствительность к нейтрализации bnAb VRC01 и 10E8.

Известно, что данные антитела обладают высокой нейтрализующей активностью и в отношении других субтипов ВИЧ-1, включая А, В, С, рекомбинантные формы CRF02_AG и CRF01_AE (Wu et al., 2010; Huang et al., 2012; Hrabec et al., 2017; Wang et al., 2018; Stefic et al., 2019; Wicczorek et al., 2024). К антителам 2F5, PG9, 2G12 и PGT126, напротив, Env-псевдовirusы продемонстрировали умеренную или даже низкую чувствительность к нейтрализации. Вероятно, это связано с тем, что bnAb PG9, 2G12 и PGT126 распознают сложные конформационные эпитопы в комплексе с гликанами, которые могут препятствовать эффективному связыванию и, как следствие, нейтрализации вируса (Sanders et al., 2002; Doores, Burton, 2010; Krumm et al., 2016).

Обсуждение

Рекомбинационная и мутационная изменчивости ВИЧ-1 оказывают существенное влияние на изменение циркулирующих virusов ВИЧ-1 на территории России. В результате наблюдается не только возникновение новых рекомбинантных форм ВИЧ, но и их распространение с формированием новых, отличающихся филогенетических кластеров ВИЧ-1. Такие изменения генетических характеристик современного ВИЧ-1 необходимо учитывать разработчикам антиретровирусных препаратов и вакцин (Rashid et al., 2022; Nair et al., 2024). Для этого нужны ин-

струменты проверки, к которым и относятся коллекции Env-псевдовirusов разных субтипов ВИЧ-1 (deCamp et al., 2014).

В данном исследовании получены и охарактеризованы два новых варианта Env-псевдовirusов ВИЧ-1 на основе генетических вариантов, циркулирующих на территории Сибирского федерального округа. Филогенетический анализ показал, что оба варианта принадлежат к рекомбинантной форме CRF63_02A6 и являются CCR5-тропными (см. рис. 1, в, рис. 2). Полученные варианты Env-псевдовirusов ВИЧ-1 дополнили существующую коллекцию. Таким образом, в настоящее время наша коллекция включает 13 Env-псевдовirusов, относящихся к рекомбинантной форме CRF63_02A6. Env-псевдовirusы были охарактеризованы с помощью bnAb, нацеленных на разные регионы уязвимости ВИЧ-1, расположенных на поверхности гликопротеиновых комплексов Env. Результаты анализа показали, что входящие в коллекцию Env-псевдовirusы проявляют высокую чувствительность к bnAb VRC01 и 10E8; умеренную чувствительность к bnAb PG9 и PGT126 и устойчивость к антителам 2G12 и 2F5 (см. таблицу).

Достоинство данной коллекции заключается в том, что она является относительно репрезентативной, поскольку включает псевдовirusы, отличающиеся как генетическим разнообразием, так и чувствительностью к bnAb. По данным Р. Hrabec с коллегами (2017), коллекция из 12 псевдовirusов определенного субтипа ВИЧ-1 может быть достаточной для первичной оценки эффективности вакцинных кандидатов.

Вследствие того, что рекомбинантная форма CRF63_02A6 ВИЧ-1 в настоящее время составляет около 80 % в Сибири и продолжает активно распространяться (Sivay et al., 2022), разработанная коллекция – важное дополнение к существующим в мире коллекциям против других подтипов ВИЧ-1.

³ Приложение см. по адресу:

<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx22.pdf>

Заклучение

В настоящей работе дополнена и охарактеризована коллекция Env-псевдовирuсов ВИЧ-1 рекомбинантной формы CRF63_02A6, которая позволит осуществлять комплекс научных и прикладных работ: исследовать противовирусную активность создаваемых химиопрепаратов и оценивать эффективность вакцин против ВИЧ-1; изучать широту и спектр нейтрализующих свойств моноклональных широко нейтрализующих антител и проводить поиск новых широко нейтрализующих антител путем скрининга нейтрализующих свойств сывороток крови инфицированных ВИЧ-1, а также изучать субтип-специфические особенности циркулирующих генетических вариантов ВИЧ-1.

Список литературы / References

- Антонова А.А., Кузнецова А.И., Ожмегова Е.Н., Лебедев А.В., Казеннова Е.В., Ким К.В., Туманов А.С., Глинкина Л.Н., Бобкова М.Р. Генетическое разнообразие ВИЧ-1 на современном этапе эпидемии в Российской Федерации: увеличение распространенности рекомбинантных форм. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2023;15(3):61-72. doi 10.22328/2077-9828-2023-15-3-61-72
- [Antonova A.A., Kuznetsova A.I., Ozhmegova E.N., Lebedev A.V., Kazennova E.V., Kim K.V., Tumanov A.S., Glinkina L.N., Bobkova M.R. Genetic diversity of HIV-1 at the current stage of the epidemic in the Russian Federation: an increase in the prevalence of recombinant forms. *VICH-infektsiya i Immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*. 2023;15(3):61-72. doi 10.22328/2077-9828-2023-15-3-61-72 (in Russian)]
- Богачева Н.В., Бледных Н.А., Тотменин А.В., Мирджамалова Ф.О., Соколов Ю.В., Гашникова Н.М. Создание коллекции современных изолятов ВИЧ-1, включающей основные российские генетические варианты вируса. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2017;9(1):65-76. doi 10.22328/2077-9828-2017-9-1-65-76
- [Bogacheva N.V., Blednyh N.A., Totmenin A.V., Mirdzhamalova F.O., Sokolov J.V., Gashnikova N.M. Creation a collection of up-to-date HIV-1 isolates including major Russian genetic variants of virus. *VICH-infektsiya i Immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*. 2017;9(1):65-76. doi 10.22328/2077-9828-2017-9-1-65-76 (in Russian)]
- Кузнецова А.И., Мунчак Я.М., Лебедев А.В., Туманов А.С., Ким К.В., Антонова А.А., Ожмегова Е.Н., Пронин А.Ю., Дробышевская Е.В., Казеннова Е.В., Бобкова М.Р. Генетическое разнообразие капсидного белка (p24) у вариантов вируса иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1), циркулирующих в Российской Федерации. *Вопросы вирусологии*. 2023;68(1):66-78. doi 10.36233/0507-4088-161
- [Kuznetsova A.I., Munchak Ya.M., Lebedev A.V., Tumanov A.S., Kim K.V., Antonova A.A., Ozhmegova E.N., Pronin A.Yu., Drobyshevskaya E.V., Kazennova E.V., Bobkova M.R. Genetic diversity of capsid protein (p24) in human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) variants circulating in the Russian Federation. *Voprosy Virusologii = Problems of Virology*. 2023;68(1):66-78. doi 10.36233/0507-4088-161 (in Russian)]
- Рудометова Н.Б., Щербakov Д.Н., Рудометов А.П., Ильичев А.А., Карпенко Л.И. Модельные системы вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1), используемые для оценки эффективности кандидатных вакцин и лекарственных препаратов против ВИЧ-1 *in vitro*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022; 26(2): 214-221. doi 10.18699/VJGB-22-26
- [Rudometova N.B., Shcherbakov D.N., Rudometov A.P., Ilyichev A.A., Karpenko L.I. Model systems of human immunodeficiency virus (HIV-1) for *in vitro* efficacy assessment of candidate vaccines and drugs against HIV-1. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii*. 2022;26(2):214-221. doi 10.18699/VJGB-22-26]
- Chang A.Y., Chau V., Landas J.A., Pang Y. Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. *JEMI Methods*. 2017;1:22-25
- deCamp A., Hraber P., Bailer R.T., Seaman M.S., Ochsenbauer C., Kappes J., Gottardo R., Edlefsen P., Self S., Tang H., Greene K., Gao H., Daniell X., Sarzotti-Kelsoe M., Gorny M.K., Zolla-Pazner S., LaBranche C.C., Mascola J.R., Korber B.T., Montefiori D.C. Global panel of HIV-1 Env reference strains for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J Virol*. 2014; 88(5):2489-2507. doi 10.1128/JVI.02853-13
- Doores K.J., Burton D.R. Variable loop glycan dependency of the broad and potent HIV-1-neutralizing antibodies PG9 and PG16. *J Virol*. 2010;84(20):10510-10521. doi 10.1128/JVI.00552-10
- Hraber P., Rademeyer C., Williamson C., Seaman M.S., Gottardo R., Tang H., Greene K., Gao H., LaBranche C., Mascola J.R., Morris L., Montefiori D.C., Korber B. Panels of HIV-1 subtype C Env reference strains for standardized neutralization assessments. *J Virol*. 2017;91(1):e00991-17. doi 10.1128/JVI.00991-17
- Huang J., Ofek G., Laub L., Louder M.K., Doria-Rose N.A., Longo N.S., Imamichi H., ... Wyatt R., Haynes B.F., Kwong P.D., Mascola J.R., Connors M. Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature*. 2012;491(7424):406-412. doi 10.1038/nature11544
- Krumm S.A., Mohammed H., Le K.M., Crispin M., Wrinn T., Poignard P., Doores K.J. Mechanisms of escape from the PGT128 family of anti-HIV broadly neutralizing antibodies. *Retrovirology*. 2016; 13:8. doi 10.1186/s12977-016-0241-5
- Levy Y. DNA and protein HIV vaccines: how should we mix it? *Lancet HIV*. 2024;11(5):e274-e275. doi 10.1016/S2352-3018(24)00092-4
- Li M., Gao F., Mascola J.R., Stamatos L., Polonis V.R., Koutsoukos M., Voss G., Goepfert P., Gilbert P., Greene K.M., Bilska M., Kothe D.L., Salazar-Gonzalez J.F., Wei X., Decker J.M., Hahn B.H., Montefiori D.C. Human immunodeficiency virus type 1 env clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J Virol*. 2005; 79(16):10108-10125. doi 10.1128/JVI.79.16.10108-10125.2005
- Maksimenko L.V., Totmenin A.V., Gashnikova M.P., Astakhova E.M., Skudarnov S.E., Ostapova T.S., Yashchenko S.V., Meshkov I.O., Bocharov E.F., Maksyutov R.A., Gashnikova N.M. Genetic diversity of HIV-1 in Krasnoyarsk Krai: area with high levels of HIV-1 recombination in Russia. *BioMed Res Int*. 2020;2020:9057541. doi 10.1155/2020/9057541
- Nair M., Gettins L., Fuller M., Kirtley S., Hemelaar J. Global and regional genetic diversity of HIV-1 in 2010-21: systematic review and analysis of prevalence. *Lancet Microbe*. 2024;5(11):100912. doi 10.1016/S2666-5247(24)00151-4
- Rashid A., Li K., Feng Y., Ahmad T., Getaneh Y., Yu Y., Hu X., Abidi S.H., Shao Y. HIV-1 genetic diversity a challenge for AIDS vaccine development: a retrospective bibliometric analysis. *Hum Vaccin Immunother*. 2022;18(1):2014733. doi 10.1080/21645515.2021.2014733
- Revilla A., Delgado E., Christian E.C., Dalrymple J., Vega Y., Carreira C., González-Galeano M., ... Pérez-Álvarez L., Nájera R., Montefiori D.C., Seaman M.S., Thomson M.M. Construction and phenotypic characterization of HIV type 1 functional envelope clones of subtypes G and F. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011;27(8):889-901. doi 10.1089/AID.2010.0177
- Rudometova N.B., Shcherbakova N.S., Shcherbakov D.N., Mishenova E.V., Delgado E., Ilyichev A.A., Karpenko L.I., Thomson M.M. Genetic diversity and drug resistance mutations in reverse transcriptase and protease genes of HIV-1 isolates from Southwestern Siberia. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2021;37(9):716-723. doi 10.1089/AID.2020.0225
- Rudometova N.B., Shcherbakova N.S., Shcherbakov D.N., Taranov O.S., Zaitsev B.N., Karpenko L.I. Construction and characterization of HIV-1 env-pseudoviruses of the recombinant form CRF63_02A

- and subtype A6. *Bull Exp Biol Med.* 2022;172(6):729-733. doi 10.1007/s10517-022-05466-7
- Sanders R.W., Venturi M., Schiffler L., Kalyanaraman R., Katinger H., Lloyd K.O., Kwong P.D., Moore J.P. The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *J Virol.* 2002;76(14):7293-7305. doi 10.1128/jvi.76.14.7293-7305.2002
- Sivay M.V., Maksimenko L.V., Osipova I.P., Nefedova A.A., Gashnikova M.P., Zyryanova D.P., Ekushov V.E., Totmenin A.V., Nalimova T.M., Ivlev V.V., Kapustin D.V., Pozdnyakova L.L., Skudarnov S.E., Ostapova T.S., Yaschenko S.V., Nazarova O.I., Chernov A.S., Ismailova T.N., Maksutov R.A., Gashnikova N.M. Spatiotemporal dynamics of HIV-1 CRF63_02A6 sub-epidemic. *Front Microbiol.* 2022;13:946787. doi 10.3389/fmicb.2022.946787
- Stefic K., Bouvin-Pley M., Essat A., Visdeloup C., Moreau A., Goujard C., Chaix M.L., Braibant M., Meyer L., Barin F. Sensitivity to broadly neutralizing antibodies of recently transmitted HIV-1 clade CRF02_AG viruses with a focus on evolution over time. *J Virol.* 2019;93(2):e01492-18. doi 10.1128/JVI.01492-18
- Thavarajah J.J., Hønge B.L., Wejse C.M. The use of broadly neutralizing antibodies (bNAbs) in HIV-1 treatment and prevention. *Viruses.* 2024;16(6):911. doi 10.3390/v16060911
- Trkola A., Moore P.L. Vaccinating people living with HIV: a fast track to preventive and therapeutic HIV vaccines. *Lancet Infect Dis.* 2024;24(4):e252-e255. doi 10.1016/S1473-3099(23)00481-4
- Walsh S.R., Seaman M.S. Broadly neutralizing antibodies for HIV-1 prevention. *Front Immunol.* 2021;12:712122. doi 10.3389/fimmu.2021.712122
- Wang H., Yuan T., Li T., Li Y., Qian F., Zhu C., Liang S., Hoffmann D., Dittmer U., Sun B., Yang R. Evaluation of susceptibility of HIV-1 CRF01_AE variants to neutralization by a panel of broadly neutralizing antibodies. *Arch Virol.* 2018;163(12):3303-3315. doi 10.1007/s00705-018-4011-7
- Wieczorek L., Sanders-Buell E., Zemil M., Lewitus E., Kavusak E., Heller J., Molnar S., ... Ake J., Krebs S.J., Peel S., Tovanabutra S., Polonis V.R. Evolution of HIV-1 envelope towards reduced neutralization sensitivity, as demonstrated by contemporary HIV-1 subtype B from the United States. *PLoS Pathog.* 2023;19(12):e1011780. doi 10.1371/journal.ppat.1011780
- Wieczorek L., Chang D., Sanders-Buell E., Zemil M., Martinez E., Schoen J., Chenine A.L., ... Michael N.L., Crowell T.A., Ake J.A., Tovanabutra S., Polonis V.R. Differences in neutralizing antibody sensitivities and envelope characteristics indicate distinct antigenic properties of Nigerian HIV-1 subtype G and CRF02_AG. *Virol J.* 2024;21(1):148. doi 10.1186/s12985-024-02394-y
- Wu X., Yang Z.Y., Li Y., Hogerkerp C.M., Schief W.R., Seaman M.S., Zhou T., ... Kwong P.D., Roederer M., Wyatt R.T., Nabel G.J., Mascola J.R. Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science.* 2010;329(5993):856-861. doi 10.1126/science.1187659

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 03.11.2024. После доработки 09.03.2025. Принята к публикации 10.03.2025.

doi 10.18699/vjgb-25-64

Определение числа соприкасающихся зерен пшеницы на изображениях на основе эллиптической аппроксимации

Д.Р. Авзалов^{1, 2}, Е.Г. Комышев^{1, 3}, Д.А. Афонников ^{1, 2, 3} 

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

 ada@bionet.nsc.ru

Аннотация. Количество зерен растения напрямую характеризует его урожайность, а размер и форма тесно связаны с массой семян. Для оценки количества зерен, их формы и размеров в настоящее время, как правило, используют анализ цифровых изображений. Зерна на таких изображениях могут быть полностью разделены, соприкасаться или быть плотно упакованными. В случае разделенных зерен высокую точность выделения и подсчета зерен на изображении позволяют получить самые простые алгоритмы бинаризации/сегментации, например алгоритм водораздела. Но в случае соприкасающихся зерен простые алгоритмы машинного зрения могут приводить к неточностям в определении контуров отдельных зерен. В этой связи актуальными являются методы точного определения контуров индивидуальных зерен в случае их соприкосновения. Один из подходов основан на поиске пикселей области соприкосновения зерен, в частности с помощью поиска угловых точек на границе контура зерен. Однако зерна могут иметь сколы, впадины и выпуклости, что приводит к идентификации угловых точек, которые не соответствуют области контакта зерен. Это влечет за собой ошибки и для их устранения требует дополнительной обработки данных, фильтрации ложных угловых точек. В настоящей работе мы предлагаем алгоритм идентификации зерен пшеницы на изображении, который позволяет идентифицировать касающиеся зерна и определять их границы на изображении. Он базируется на модификации алгоритма поиска угловых точек и использует метод отнесения пикселей границы контура к одному зерну на основе аппроксимации контуров зерен эллипсами. Мы показали на тестовых изображениях, что предложенный алгоритм позволяет более точно идентифицировать зерна на изображении по сравнению с алгоритмом без такой аппроксимации и алгоритмом водораздела. Однако временные затраты для такого алгоритма существенны и быстро растут с увеличением количества зерен и контуров, включающих несколько зерен.

Ключевые слова: пшеница; зерна; подсчет; цифровые изображения; сегментация; алгоритм; угловые точки

Для цитирования: Авзалов Д.Р., Комышев Е.Г., Афонников Д.А. Определение числа соприкасающихся зерен пшеницы на изображениях на основе эллиптической аппроксимации. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(4): 608-614. doi 10.18699/vjgb-25-64

Финансирование. Работа выполнена за счет финансирования Курчатовского геномного центра Федерального исследовательского центра ИЦиГ СО РАН, соглашение с Министерством образования и науки РФ № 075-15-2019-1662.

Counting touching wheat grains in images based on elliptical approximation

D.R. Avzalov^{1, 2}, E.G. Komyshev^{1, 3}, D.A. Afonnikov ^{1, 2, 3} 

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

 ada@bionet.nsc.ru

Abstract. The number of grains of a cereal plant characterizes its yield, while grain size and shape are closely related to its weight. To estimate the number of grains, their shape and size, digital image analysis is now generally used. The grains in such images may be completely separated, touching or densely packed. In the first case, the simplest binarization/segmentation algorithms, such as the watershed algorithm, can achieve high accuracy in segmentation and counting grains in an image. However, in the case of touching grains, simple machine vision algorithms may lead to inaccuracies in determining the contours of individual grains. Therefore, methods for accurately determining the contours of individual grains when they are in contact are relevant. One approach is based on the search for pixels of the grain contact area, in particular, by identification of concave points on the grain contour boundary. However, some grains may have chips, depressions and bulges, which leads to the identification of the corner points that do not correspond to the grain contact region. Additional data processing is required to avoid these errors. In this paper, we propose an algorithm for the identification of wheat grains in an image and determine their boundaries in the case when they are touching. The algorithm is based on using a

modification of the concave point search algorithm and utilizes a method of assigning contour boundary pixels to a single grain based on approximation of grain contours by ellipses. We have shown that the proposed algorithm can identify grains in the image more accurately compared to the algorithm without such approximation and the watershed algorithm. However, the time cost for such an algorithm is significant and grows rapidly with increasing number of grains and contours including multiple grains.

Key words: wheat; grains; counting; digital images; segmentation; algorithm; concave points

For citation: Avzalov D.R., Komyshev E.G., Afonnikov D.A. Counting touching wheat grains in images based on elliptical approximation. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(4):608-614. doi 10.18699/vjgb-25-64

Введение

Одно из важнейших направлений селекционно-генетических исследований злаков – поиск и изучение генов, контролирующих показатели урожайности. Количество зерен растения напрямую характеризует его урожайность, а размер и форма тесно связаны с массой семян (Zhang X. et al., 2014; Brinton, Uauy, 2019). Оценка числа зерен, их формы и размеров в настоящее время, как правило, выполняется при помощи высокопроизводительного фенотипирования (Афонников и др., 2016; Li et al., 2020; Kolhar, Jagtap, 2023), которое основано на анализе цифровых изображений (Tanabata et al., 2012; Whan et al., 2014; Komyshev et al., 2017). Эти методы отличаются высокой производительностью, низкой стоимостью оборудования и простотой протоколов получения изображений и их обработки. Дополнительное преимущество методов заключается в том, что можно точно определить не только число зерен, но и их характеристики (размер, форму, цвет) (Tanabata et al., 2012; Cervantes et al., 2016; Комышев и др., 2020), что при ручном подсчете сделать затруднительно или невозможно. Кроме того, полученные изображения могут храниться в электронном виде без изменений, тогда как характеристики зерен в зависимости от длительности хранения могут изменяться (Afonnikov et al., 2022).

Типичные изображения для анализа – зерна на светлом фоне, полученные с помощью цифровой камеры, настольного сканера или смартфона (Herridge et al., 2011; Tanabata et al., 2012; Whan et al., 2014; Komyshev et al., 2017). Зерна на таких изображениях могут быть полностью разделены, соприкасаться или быть плотно упакованными. В случае разделенных зерен для выявления зерен на изображении можно использовать самые простые алгоритмы бинаризации/сегментации, например алгоритм водораздела (Roerdink, Meijster, 2000). При этом можно оценить размер и форму каждого зерна (Mebatsion et al., 2013). Однако такой протокол требует от пользователя заметных временных затрат на аккуратное размещение зерен, что затрудняет анализ большого количества образцов. В случае плотной упаковки определить контуры индивидуальных зерен сложно из-за их возможного наложения, и объективную оценку можно ожидать только для количества зерен на изображении, но не для размера и формы. Во втором варианте простые алгоритмы машинного зрения могут приводить к неточностям в определении контуров отдельных зерен, но характеристики их формы и размера могут быть оценены; при этом не требуется аккуратного разделения зерен, что снижает временные затраты при анализе. В этой связи разработка методов определения контуров индивидуальных зерен в случае их соприкосновения на изображениях является актуальной.

Для решения этой задачи применяют подходы на основе машинного зрения (Wang, Paliwal, 2006; Qin et al., 2013) и глубокого машинного обучения (Yang et al., 2021). Методы глубокого обучения в настоящее время активно развиваются, но требуют для обучения больших выборок изображений, размеченных вручную, что является трудозатратным. Алгоритмы машинного зрения менее требовательны к размеру обучающих выборок и их аннотации и тоже активно разрабатываются (Liang et al., 2022; Lin et al., 2023). Для выделения зерен они используют алгоритмы бинаризации, а после выделения контуров зерен применяют анализ формы сложных контуров, которые включают два и более зерен. Один из подходов для анализа сложных контуров основан на поиске пикселей области соприкосновения зерен. Для этого используется алгоритм идентификации угловых точек на границе контура зерен (Gao et al., 2017; Liu et al., 2017; Tan et al., 2019; Liang et al., 2022; Zhang J. et al., 2022). Данный алгоритм позволяет быстро идентифицировать точки резкого изгиба границы контура. Пиксели, в которых изгиб наибольший, считаются возможными местами касания зерен. Зерна на изображениях могут иметь сколы, впадины и выпуклости, что приводит к идентификации угловых точек, которые не соответствуют области контакта зерен. Для устранения ошибок требуется дополнительная обработка данных, фильтрация ложных угловых точек.

В настоящей работе мы предлагаем алгоритм идентификации зерен пшеницы на изображении, который позволяет идентифицировать касающиеся зерна и определять их границы на изображении. Он является модификацией алгоритма поиска угловых точек и относит пиксели границы контура к одному зерну на основе аппроксимации контуров зерен эллипсами.

Материалы и методы

Идентификация контуров зерен на изображении. Общая схема метода анализа изображений представлена на рис. 1. Она включает следующие этапы:

- предварительная обработка изображений (уменьшение размера и Гауссов фильтр);
- бинаризация (выделение областей контуров зерен и фона);
- поиск угловых точек на контуре;
- постобработка пикселей границы контура на основе аппроксимации эллипсами.

Каждый из этапов включает в себя использование различных алгоритмов компьютерного зрения, которые будут описаны далее.

Исходные изображения имеют высокое разрешение, 3968×2976 пикселей, что отрицательно сказывается на



Рис. 1. Основные этапы обработки изображений для подсчета зерен пшеницы.

времени работы алгоритмов классического компьютерного зрения. Эмпирически было установлено, что уменьшение разрешения изображения в два раза (до размеров 1984×1488 пикселей) в несколько раз сокращает время работы алгоритмов без существенной потери точности подсчета количества зерен. Для этого использовался метод, основанный на билинейной интерполяции (Гонсалес, Вудс, 2005). В исходном изображении выбирались сканирующие неперекрывающиеся окна размером 2×2 пикселя, которые в преобразованном изображении заменялись на один пиксель. Значения интенсивности красной, зеленой и синей компонент этого пикселя вычислялись на основе соответствующих компонент пикселей сканирующего окна.

Пусть (x_i, y_j) , $i, j = 1, 2$, – четыре соседние точки, расположенные «квадратом», в каждой из которых значение пикселя равно $f(x_i, y_j)$. Эти четыре значения заменяются одним по следующему алгоритму:

1. Линейная интерполяция в направлении X :

$$f(x, y_i) = f(x_1, y_i) + f(x_2, y_i). \quad (1)$$
2. Линейная интерполяция полученных значений в направлении Y :

$$f(x, y) = f(x, y_1) + f(x, y_2). \quad (2)$$

В итоге разрешение изображения уменьшается в два раза.

К полученному изображению с пониженной размерностью применяется Гауссов фильтр для устранения шумов (Gedraite, Hadad, 2011). Отфильтрованное изображение переводится в цветовое пространство HSV, в которой различия между зернами и фоном более явно выражены (Фисенко В.Т., Фисенко Т.Ю., 2008; Домасев, Гнатюк, 2009).

Следующий этап предварительной обработки заключается в дополнительном сглаживании изображений с помощью алгоритма сдвига среднего (Comaniciu, Meer, 1999). Результирующее изображение преобразуется в мо-

нохромное и бинаризуется с помощью метода Оцу (Otsu, 1979).

Примеры выполнения этих шагов для масштабированного изображения после Гауссовой фильтрации показаны на рис. 2.

Анализ контуров и идентификация угловых пикселей. После получения бинарной маски на изображении идентифицируются все контуры, соответствующие областям зерен. Контур – это кривая, соединяющая все пиксели границы маски области зерен. Далее каждый контур анализируется независимо от других.

Производится обход контура и для каждого пикселя p границы вычисляется значение функции углового отклика (CRF – corner response function) (Tan et al., 2019):

$$CRF(p) = \frac{n_p}{A}, \quad A = \pi R^2, \quad (3)$$

где n_p – число пикселей, которые принадлежат контуру внутри окружности с радиусом R и центром в точке p ; A – полное число пикселей в этой окружности (рис. 3, а).

Методом перебора из множества $[3, 4, \dots, 10]$ было подобрано значение $R = 7$, при котором обеспечивается наиболее высокая точность (при $R > 10$ точность падала). Величина CRF близка к ~ 0.5 на «ровной» части границы контура зерна. Если внутри окружности большая доля пикселей зерен, что характерно для угловых пикселей, то CRF достигает пика (см. рис. 3, б). Это позволяет идентифицировать угловые точки на изображении (см. рис. 3, в).

Мы использовали критерий $CRF > 0.6$ для отнесения пикселя границы к угловым, как это сделано в работе (Zhang J. et al., 2022). Зная количество угловых точек N_{corners} и число сегментов границы контура между угловыми точками R_{closed} , можно оценить количество зерен как $N_{\text{grains}} = N_{\text{corners}}/2 - R_{\text{closed}} + 1$ (Liu et al., 2017). Недостаток алгоритма заключается в предположении об идеальном

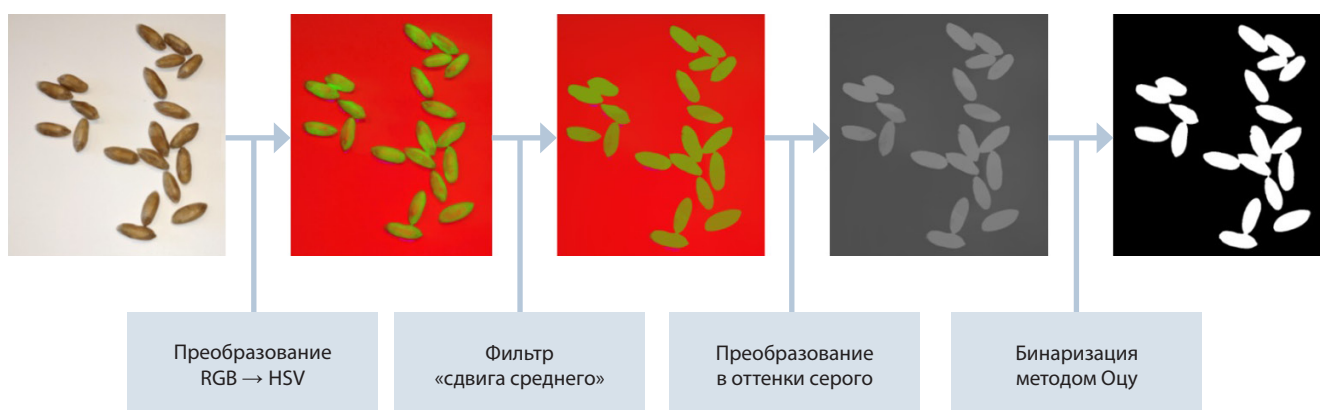


Рис. 2. Результаты предварительной обработки и бинаризации изображений зерен.

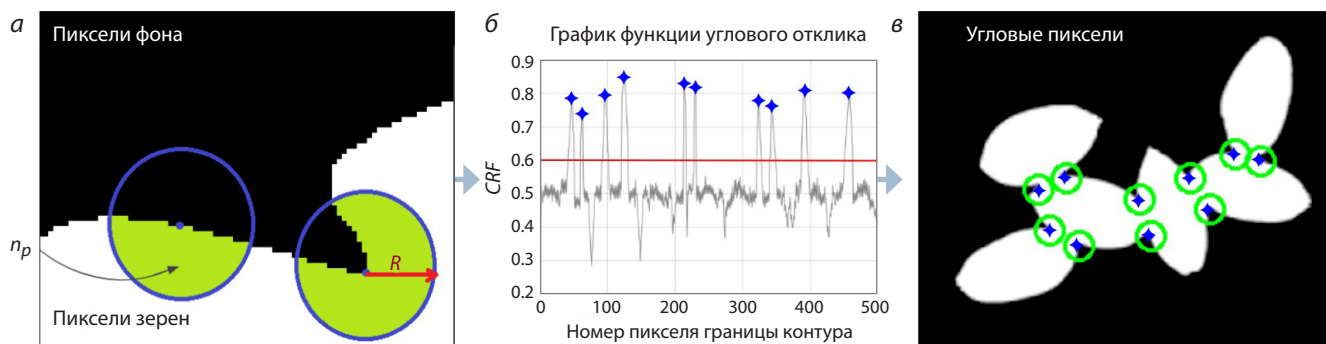


Рис. 3. Использование функции углового отклика для идентификации угловых пикселей контура.

a – визуализация расчета CRF ; пиксели фона отображены черным цветом, пиксели зерен – белым цветом за пределами окружности расчета CRF , зеленым – в пределах окружности; *b* – график функции CRF (ось Y) в зависимости от номера пикселя контура (ось X); пики, соответствующие угловым точкам, показаны синими крестиками; *в* – демонстрация определения угловых пикселей (синие крестики, обведенные зелеными окружностями) на изображении маски зерен.

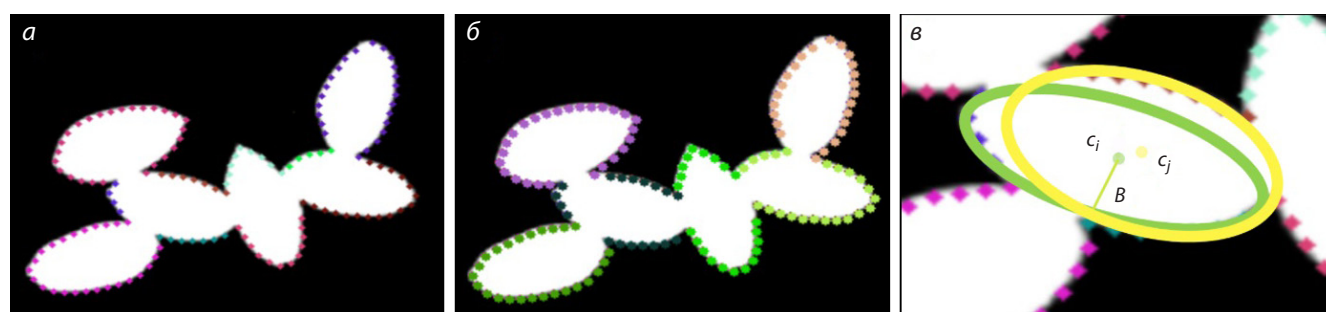


Рис. 4. Алгоритм аппроксимации эллипсами для идентификации сегментов границы контура, принадлежащих одному зерну.

a – точки, принадлежащие одному сегменту границы между угловыми пикселями, окрашены одним цветом; *b* – точки границы контура, принадлежащие одному зерну, окрашены одинаковым цветом; *в* – альтернативное положение двух эллипсов для сегментов одного зерна, их центры c_i и c_j показаны желтой и зеленой точками, показана ось эллипса B .

эллиптическом контуре зерна. На реальных же примерах из-за сколов и неровностей на зернах детектируются ложные угловые точки.

Аппроксимация контуров зерен эллипсами. Поскольку зерна имеют форму, близкую к эллиптической, их можно аппроксимировать эллипсами, за счет чего разбить общий контур группы зерен на отдельные зерна. Знание местоположения угловых точек (даже если среди них есть ложные) позволяет разбить весь контур на множество сегментов, каждый из которых принадлежит только одному зерну. Задачей является разбиение множества сегментов на подмножества таким образом, чтобы каждое подмножество представляло сегменты границы одного зерна (рис. 4, *a*, *b*).

Алгоритм основывается на поиске оптимального разбиения сегментов контура по принадлежности к эллипсам, в котором ошибка разбиения будет минимальной. Ошибка разбиения – суммарная ошибка аппроксимации пикселями каждого из эллипсов. Дополнительно к значению ошибки добавляли штраф, учитывающий тот факт, что для нескольких сегментов контура можно выбрать несколько эллипсов, которые будут давать близкие значения аппроксимации эллипсов; он позволял выбрать из них тот, который имеет положение центра, наиболее близкое к среднему.

Рассмотрим набор пикселей границы контура p_{ik} , $i = 1, \dots, m_k$. Уравнения эллипса – квадратичная форма $a_{11}x^2 + 2a_{12}xy + a_{22}y^2 + 2b_1x + 2b_2y + 1 = 0$. Подставим каждую из точек в уравнение и получим переопределенную систему:

$$A = \begin{bmatrix} x_1^2 & 2x_1y_1 & y_1^2 & 2x_1 & 2y_1 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ x_{m_k}^2 & 2x_{m_k}y_{m_k} & y_{m_k}^2 & 2x_{m_k} & 2y_{m_k} \end{bmatrix}, b = (-1, \dots, -1)^T, \quad (4)$$

$$\|A \cdot \alpha - b\|^2 \rightarrow \min_{\alpha}, \quad \alpha = (a_{11}, a_{12}, a_{22}, b_1, b_2). \quad (5)$$

Оптимальное решение такой системы ищется методом наименьших квадратов и разложения SVD (Brinton, Uauy, 2019). Решение α^* можно найти как

$$\alpha^* = A^+b = UD^{-1}V^Tb. \quad (6)$$

В этом случае суммарную ошибку разбиения находим по следующей формуле:

$$E_{\text{partition}} = \sum_k E_k + P, \quad E_k = \|A \cdot \alpha_k^* - b\|, \quad (7)$$

где

$$P = \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \frac{2}{B \cdot \|\text{center}_i - \text{center}_j\|} \quad (8)$$

– это штраф за «неправильное» разбиение, а B – минимальная ось построенных эллипсов (рис. 4, *в*).



Рис. 5. Результат разбиения контуров нескольких групп зерен на основе алгоритма аппроксимации эллипсами.

Идентифицированные угловые пиксели показаны зелеными окружностями, пиксели контура, принадлежащие одному зерну, – одним цветом.

В результате нахождения разбиения с наименьшей ошибкой количество зерен равняется количеству подмножеств в разбиении. Такой подход решает проблему с лишними угловыми точками, что сказалось на точности работы метода. Пример работы алгоритма при идентификации зерен приведен на рис. 5. Как можно видеть, для двух нижних зерен справа (бирюзовый и зеленый контуры) разбиение было построено правильно (цветами обозначены сегменты, отнесенные к отдельным подмножествам), хотя присутствует лишний угловой пиксель. То же самое относится и к другим контурам.

Описанные алгоритмы были реализованы на языке Python v.3.9 с использованием библиотек OpenCV v. 4.6.0 (Howse, 2013) и Numpy v. 1.21 (<https://numpy.org/>).

Оценка точности идентификации зерен на изображении. Для каждого изображения было найдено количество зерен с помощью описанного алгоритма и произведена оценка точности алгоритма с использованием метрики

$$CR = 100 \cdot \left[1 - \frac{|N - N^*|}{N} \right], \quad (9)$$

где N^* – число зерен, определенное с помощью предложенного алгоритма; N – истинное количество зерен. Оценивали точность для алгоритма угловых точек без дополнительного анализа контуров на основе использования эллипсов (CR_{cp}) и с анализом контуров на основе использования эллипсов (CR_{cpe}).

Дополнительно мы оценили среднюю точность для всех изображений идентификации зерен при использовании методов эрозии (CR_e) и водораздела (CR_w) (Zhang J. et al., 2022). Также для каждого изображения было посчитано полное время работы T с фильтрацией контуров на основе эллипсов. Вычисления производились на ноутбуке с процессором Intel i5 4 * 2.9 GHz и 6 GB RAM под управлением операционной системы Windows 10.



Рис. 6. Пример изображения соприкасающихся зерен пшеницы.

Результаты и обсуждение

Для анализа был взят набор из девяти изображений зерен пшеницы на белом листе бумаги. Съемку производили на смартфон HUAWEI P20, камера Sony IMX380, размер изображения 11.8 Мп (3968×2976 пикс.). Исходные изображения были сделаны с использованием вспышки. При съемке был установлен режим «авто» (по умолчанию), режим широкого динамического диапазона (high dynamic range, HDR) был отключен. Зерна на изображении были размещены неплотно, некоторые из них соприкасались (рис. 6).

На шести изображениях было по 20 зерен; выборка также включала изображения 31, 46 и 51 зерна.

Результаты подсчета количества зерен с помощью двух алгоритмов: используя только угловые точки (cp) и используя алгоритм угловых точек с построением эллипсов (cpe), представлены в таблице. Даны оценки числа зерен, идентифицированных алгоритмом, а также меры точности и времени вычислений.

Среднее значение точности (CR) для алгоритма cp составило 0.90, для алгоритма cpe – 0.96, для алгоритма водораздела – 0.77, для алгоритма эрозии – 0.93. Видно, что алгоритм коррекции числа зерен на основе эллипсов дает наиболее точные результаты. Можно также сделать вывод, что точность алгоритма зависит от числа зерен, которые формируют сложные контуры: чем больше зерен в контуре, тем ниже точность. Точность зависит и от числа зерен, что объясняется, прежде всего, наличием большей вероятности контактирующих зерен.

Точность метода с учетом эллипсов сравнима с точностью некоторых ранее опубликованных методов, тоже учитывающих угловые точки. Так, в работе (Tan et al., 2019) для подсчета зерен риса использовали алгоритм детекции угловых точек в сочетании с нейронной сетью с обратным распространением ошибки для последующей коррекции результатов сегментации. В среднем точность сегментации зерен для различных сортов риса составила 94 %. W. Wang, J. Paliwal (2006) предложили алгоритм

Оценка точности подсчета зерен алгоритмами поиска угловых точек без и с фильтрацией контуров на основе метода эллипсов для девяти тестовых изображений

Номер изображения	N , шт.	M , шт.	$N_{\text{ср}}$, шт.	$CR_{\text{ср}}$, %	$N_{\text{сре}}$, шт.	$CR_{\text{сре}}$, %	T , с
1	20	2	21	95.0	20	100.0	13.57
2	20	3	22	90.0	20	100.0	20.01
3	20	3	20	100.0	20	100.0	19.54
4	20	4	21	95.0	20	100.0	31.33
5	20	5	21	95.0	18	90.0	80.09
6	20	5	24	80.0	21	95.0	82.87
7	31	7	33	93.5	32	96.8	270.11
8	46	4	53	84.8	45	97.8	43.50
9	53	9	66	75.5	45	85.0	1121.30

Примечание. N – число зерен; M – максимальное число зерен в контуре; $N_{\text{ср}}$ – число зерен, определенное алгоритмом ср; $CR_{\text{ср}}$ – точность алгоритма ср; $N_{\text{сре}}$ – число зерен, определенное алгоритмом сре; $CR_{\text{сре}}$ – точность алгоритма сре; T – время работы алгоритма сре.

водораздела для изображений, полученных из исходных методом сегментации, затем преобразованным в зависимости от расстояний между пикселями фона и зерен. С его помощью проведен подсчет зерен на изображениях для шести типов растений: озимой, твердой белозерной и твердой янтарной пшениц, ячменя, овса и ржи. Доля правильно идентифицированных зерен варьировала от 88.6 до 94.4 % для пшениц и от 55.4 до 79.0 % для остальных трех видов. T. Liu с коллегами (2017) применили алгоритм, основанный на детекции характерных точек на изображении (feature points) и определении корреляционной зависимости между их количеством и количеством зерен на изображении. Авторы провели тестирование алгоритма на зернах пшеницы и риса и показали, что ошибка их метода составляет от 0 до 4.7 % (в среднем 0.1 % для пшеницы и 1.5 % для риса), тогда как использование обычного алгоритма водораздела приводило к ошибке от 14 до 40 % у пшеницы и от 20 до 50 % у риса. N. Liang с коллегами (2022) предложили комплексный подход, который идентифицирует число не касающихся зерен методом К-средних, послойный алгоритм водораздела использован для идентификации и подсчета редко касающихся зерен, для плотно лежащих зерен применялся алгоритм разделяющих линий. Точность метода составила 99.65 %.

Таким образом, наш алгоритм в целом дает точность, сравнимую с существующими алгоритмами (особенно в случае, когда контуров с большим числом зерен мало). Недостатком является быстрый рост времени обработки изображения с увеличением как числа сложных контуров, так и числа анализируемых зерен. Для числа зерен более 20 и контуров со множеством зерен это время становится малопримлемым для анализа. При увеличении количества соприкасающихся зерен в одном контуре растет число возможных комбинаций разбиений на подмножества. Более того, возрастает число пикселей контура, координаты которых используются для составления систем линейных уравнений (4). Уменьшения времени счета (в случае описанной реализации метода) можно достичь распараллеливанием алгоритма по данным (контурам на изображении). Дальнейшая оптимизация возможна за

счет предварительной грубой оценки количества зерен, например, по площади контура. Это позволит уменьшить количество разбиений.

Отметим также, что алгоритм основан на аппроксимации формы зерен эллипсами, что может быть неприменимо к зернам более сложной формы, например, бобов. Однако в общем случае данный алгоритм можно модифицировать для контуров зерен, отличных от овальной формы, что в перспективе может быть реализовано для зерен других видов растений.

Выводы

Предложен алгоритм для идентификации и подсчета зерен на цифровых изображениях в случае, если они соприкасаются. Алгоритм основан на бинаризации изображения для выделения контуров, содержащих зерна, и последующей обработке этих контуров. Обработка заключается в поиске угловых точек на контуре и дальнейшем их отборе за счет отнесения пикселей границы контура к одному зерну на основе аппроксимации контуров зерен эллипсами. В результате такой обработки удастся исключить из анализа ложные точки соприкосновения зерен в контуре. Анализ тестовых изображений показал, что в случае, когда число касающихся зерен невелико, алгоритм позволяет получить высокую точность подсчета зерен (до 100 %, и систематически лучше, чем без аппроксимации эллипсами). Однако при наличии контуров, включающих большое число контактирующих зерен, время расчета алгоритма увеличивается во много раз (до нескольких минут), что делает его практическое применение затруднительным.

Список литературы / References

- Афонников Д.А., Генаев М.А., Дорошков А.В., Комышев Е.Г., Пшеничникова Т.А. Методы высокопроизводительного фенотипирования растений для массовых селекционно-генетических экспериментов. *Генетика*. 2016;52(7):788-803. doi 10.7868/S001667581607002X
- [Afonnikov D.A., Genaev M.A., Doroshkov A.V., Komyshev E.G., Pshenichnikova T.A. Methods of high-throughput plant phenotyping for large-scale breeding and genetic experiments. *Russ J Genet*. 2016;52(7):688-701. doi 10.1134/S1022795416070024]

- Гонсалес Р., Вудс Р. Цифровая обработка изображений. М.: Техносфера, 2005
[Gonzalez R.C., Woods R.E. Digital Image Processing. CRC Press, Boca Raton, FL, 2004]
- Домасев М.В., Гнатюк С.П. Цвет, управление цветом, цветовые расчеты и измерения. СПб.: Питер, 2009
[Domasev M.V., Gnatyuk S.P. Color, Color Management, Color Calculations and Measurements. St. Petersburg: Piter Publ., 2009 (in Russian)]
- Комышев Е.Г., Генаев М.А., Афонников Д.А. Анализ цветовых и текстурных характеристик зерен злаков на цифровых изображениях. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(4): 340-347. doi 10.18699/VJ20.626
[Komyshev E.G., Genaev M.A., Afonnikov D.A. Analysis of color and texture characteristics of cereals on digital images. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2020;24(4): 340-347. DOI 10.18699/VJ20.626]
- Фисенко В.Т., Фисенко Т.Ю. Компьютерная обработка и распознавание изображений. СПб.: СПбГУ ИТМО, 2008
[Fisenko V.T., Fisenko T.Yu. Computer Processing and Image Recognition. St. Petersburg, 2008 (in Russian)]
- Afonnikov D.A., Komyshev E.G., Efimov V.M., Genaev M.A., Koval V.S., Gierke P.U., Börner A. Relationship between the characteristics of bread wheat grains, storage time and germination. *Plants*. 2022;11(1):35. doi 10.3390/plants11010035
- Brinton J., Uauy C. A reductionist approach to dissecting grain weight and yield in wheat. *J Integr Plant Biol*. 2019;61(3):337-358. doi 10.1111/jipb.12741
- Cervantes E., Martín J.J., Saadaoui E. Updated methods for seed shape analysis. *Scientifica*. 2016;2016(1):5691825. doi 10.1155/2016/5691825
- Comaniciu D., Meer P. Mean shift analysis and applications. In: Proceedings of the Seventh IEEE International Conference on Computer Vision. Vol. 2. Kerkyra, Greece, 1999;1197-1203. doi 10.1109/ICCV.1999.790416
- Gao L., Zhao C., Liu M. Segmentation of touching seeds based on shape feature and multiple concave point detection. In: 2017 IEEE International Conference on Imaging Systems and Techniques (IST), Beijing, 2017;1-5. doi 10.1109/IST.2017.8261448
- Gedraite E.S., Hadad M. Investigation on the effect of a Gaussian Blur in image filtering and segmentation. In: *Proceedings ELMAR-2011, Zadar, Croatia*, 2011;393-396
- Herridge R.P., Day R.C., Baldwin S., Macknight R.C. Rapid analysis of seed size in *Arabidopsis* for mutant and QTL discovery. *Plant Methods*. 2011;7(1):3. doi 10.1186/1746-4811-7-3
- Howse J. OpenCV Computer Vision with Python. Birmingham: Packt Publishing, 2013
- Kolhar S., Jagtap J. Plant trait estimation and classification studies in plant phenotyping using machine vision. A review. *Inf Process Agric*. 2023;10(1):114-135. doi 10.1016/j.inpa.2021.02.006
- Komyshev E.G., Genaev M.A., Afonnikov D.A. Evaluation of the SeedCounter, a mobile application for grain phenotyping. *Front Plant Sci*. 2017;7:1990. doi 10.3389/fpls.2016.01990
- Li Z., Guo R., Li M., Chen Y., Li G. A review of computer vision technologies for plant phenotyping. *Comput Electron Agric*. 2020;176: 105672. doi 10.1016/j.compag.2020.105672
- Liang N., Sun S., Yu J., Taha M.F., He Y., Qiu Z. Novel segmentation method and measurement system for various grains with complex touching. *Comput Electron Agric*. 2022;202:107351. doi 10.1016/j.compag.2022.107351
- Lin W., Ma D., Su Q., Liu S., Liao H., Yao H., Xu P. Image segmentation method for physically touching soybean seeds. *Software Impacts*. 2023;18:100591. doi 10.1016/j.simpa.2023.100591
- Liu T., Chen W., Wang Y., Wu W., Sun C., Ding J., Guo W. Rice and wheat grain counting method and software development based on Android system. *Comput Electron Agric*. 2017;141:302-309. doi 10.1016/j.compag.2017.08.011
- Mebatsion H.K., Paliwal J., Jayas D.S. Automatic classification of non-touching cereal grains in digital images using limited morphological and color features. *Comput Electron Agric*. 2013;90:99-105. doi 10.1016/j.compag.2012.09.007
- Otsu N. A threshold selection method from gray-level histograms. In: IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics. 1979;9(1): 62-66. doi 10.1109/TSMC.1979.4310076
- Qin Y., Wang W., Liu W., Yuan N. Extended-maxima transform watershed segmentation algorithm for touching corn kernels. *Adv Mech Eng*. 2013;5:268046. doi 10.1155/2013/268046
- Roerdink J.B.T.M., Meijster A. The watershed transform: definitions, algorithms and parallelization strategies. *Fundam Inform*. 2000; 41(2):187-228
- Tan S., Ma X., Mai Z., Qi L., Wang Y. Segmentation and counting algorithm for touching hybrid rice grains. *Comput Electron Agric*. 2019;162:493-504. doi 10.1016/j.compag.2019.04.030
- Tanabata T., Shibaya T., Hori K., Ebana K., Yano M. SmartGrain: high-throughput phenotyping software for measuring seed shape through image analysis. *Plant Physiol*. 2012;160(4):1871-1880. doi 10.1104/pp.112.205120
- Wang W., Paliwal J. Separation and identification of touching kernels and dockage components in digital images. *Can Biosyst Eng*. 2006;48:7
- Whan A.P., Smith A.B., Cavanagh C.R., Ral J.P.F., Shaw L.M., Howitt C.A., Bischof L. GrainScan: a low cost, fast method for grain size and colour measurements. *Plant Methods*. 2014;10:23. doi 10.1186/1746-4811-10-23
- Yang S., Zheng L., He P., Wu T., Sun S., Wang M. High-throughput soybean seeds phenotyping with convolutional neural networks and transfer learning. *Plant Methods*. 2021;17(1):50. doi 10.1186/s13007-021-00749-y
- Zhang J., Liu S., Wu W., Zhong X., Liu T. Research on a rapid identification method for counting universal grain crops. *PLoS One*. 2022;17(9):e0273785. doi 10.1371/journal.pone.0273785
- Zhang X., Deng Z., Wang Y., Li J., Tian J. Unconditional and conditional QTL analysis of kernel weight related traits in wheat (*Triticum aestivum* L.) in multiple genetic backgrounds. *Genetica*. 2014; 142(4):371-379. doi 10.1007/s10709-014-9781-6

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 28.12.2024. После доработки 22.01.2025. Принята к публикации 06.02.2025.

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 (Vavilov Journal of Genetics and Breeding)» – реестровая запись СМЭ 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, Российский индекс научного цитирования, ВИНТИ, Web of Science CC, Scopus, PubMed Central, DOAJ, ROAD, Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar.

Открытый доступ к полным текстам:
русскоязычная версия – на сайте <https://vavilovj-icg.ru/>
и платформе Научной электронной библиотеки, elibrary.ru/title_about.asp?id=32440
англоязычная версия – на сайте vavilov.elpub.ru/index.php/jour
и платформе PubMed Central, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/3805/>

При перепечатке материалов ссылка обязательна.

✉ email: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Издатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»,
проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Адрес редакции: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Секретарь по организационным вопросам С.В. Зубова. Тел.: (383)3634977.

Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Тел.: (383)3634963*5218.

Начальник отдела: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: В.Д. Ахметова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич.

Компьютерная графика и верстка: Т.Б. Коняхина, О.Н. Савватеева.

.....
Дата публикации 30.06.2025. Формат 60 × 84 1/8. Уч.-изд. л. 19.2.
.....

