

ВАВИЛОВСКИЙ

ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

2025 • 29 • 6



Молекулярная и клеточная биология / Генетика растений / Селекция растений на иммунитет и качество /
Генетика животных / Медицинская генетика / Генетика поведения / Филогенетика и таксономия /
Актуальные технологии

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-25-80

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. Афтanas – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)

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

А. Бёрнер – д-р наук (Германия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция)

И.Н. Лебедев – 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)

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-25-80

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. Bepalova*, 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),
Russia*D.V. Pyshnyi*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry),
Russia*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.), Belarus*S.V. Shestakov*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
Russia*V.A. Stepanov*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
Russia*I.A. Tikhonovich*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
Russia*A.V. Vasiliev*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*M.I. Voevoda*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine),
Russia*N.K. Yankovsky*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
Russia*I.K. Zakharov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*I.A. Zakharov-Gezekhus*, Corr. Member of the RAS,
Dr. Sci. (Biology), Russia

Молекулярная и клеточная биология

- 737 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Новая комбинация 5'- и 3'-нетранслируемых областей способствует повышению экспрессии мРНК *in vitro* и *in vivo*. Д.Н. Антропов, О.В. Марков, А.С. Дюма, П.А. Пучков, Е.В. Шмендель, Д.В. Гладких, В.М. Голышев, А.М. Матвеева, М.А. Маслов, Г.А. Степанов (на англ. языке)
- 744 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Интерактом белка НОХВ13 в клетках рака простаты: биохимические и функциональные взаимодействия между транскрипционными факторами НОХВ13 и ТВХ3. М.М. Ерохин, Н.Я. Козельчук, Р.Х. Зиганшин, В.В. Татарский, Д.А. Четверина

Генетика растений

- 753 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Кариологическая дифференциация среди сортов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), контрастных по селекционному статусу и типу развития. А.Ф. Мутерко, Е.Д. Бадаева, Е.В. Зуев, Е.А. Салина
- 769 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Картирование локусов и генов, определяющих время колошения и созревания яровой мягкой пшеницы в условиях длинного дня, и оценка их влияния на урожайность. А.А. Киселёва, А.И. Стасюк, И.Н. Леонова, Е.А. Салина

Селекция растений на иммунитет и качество

- 779 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Пребридинговые исследования почти изогенных линий яровой мягкой пшеницы, отличающихся по наличию/отсутствию хромосомного замещения 3R(3D) от сорта тритикале Satu. С.Н. Сибикеев, И.Г. Адонина, А.Е. Дружин, З.Е. Фитилева, О.А. Баранова
- 789 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Вариабельность минерального состава зерна твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) в различных экологических условиях. И.Н. Леонова, П.Н. Мальчиков, Н.А. Виниченко, В.В. Пискарёв, М.Г. Мясникова, В.А. Апарина, Т.В. Чахеева

Генетика животных

- 798 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
К генетической структуре и происхождению малого суслика *Spermophilus pygmaeus* (Pallas, 1778) на Северном Кавказе. Ф.А. Темботова, А.Х. Амшкова, М.С. Гудова
- 812 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Метаболические эффекты трегалозы у мышей линии C57BL/6 с ожирением, вызванным диетой с высоким содержанием углеводов и жиров. А.Б. Пупышев, Н.М. Бажан, А.Ю. Казанцева, Т.В. Яковлева, В.М. Беличенко, Н.В. Гончарова, Т.А. Короленко, М.А. Тихонова

Медицинская генетика

- 819 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Ассоциация варианта rs823144 гена *RAB29* с активностью лизосомных гидролаз в клетках крови и риском болезни Паркинсона. К.С. Башарова, А.И. Безрукова, К.А. Сенкевич, Г.В. Байдакова, А.В. Рыбаков, И.В. Милюхина, А.А. Тимофеева, Е.Ю. Захарова, С.Н. Пчелина, Т.С. Усенко
- 828 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Вклад генов транскрипционных факторов семейства FOXO (*FOXO1*, *FOXO3*) в развитие хронической обструктивной болезни легких. В.А. Маркелов, Л.З. Ахмадишина, Т.Р. Насибуллин, Ю.Г. Азнабаева, О.В. Кочетова, Н.Н. Хуснутдинова, С.М. Измайлова, Н.Ш. Загидуллин, Г.Ф. Корытина

Генетика поведения

- 838 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Использование полигенных показателей для оценки предрасположенности к манифестации антисоциального поведения. А.В. Казанцева, Д.В. Яковлева, Ю.Д. Давыдова, Э.К. Хуснутдинова (на англ. языке)
- 847 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Эндогенный окситоцин и межсамцовые взаимодействия после введения окситоцина у серых крыс, селекционируемых по поведению. С.Г. Шихевич, Р.В. Кожемякина, Р.Г. Гулевич, Ю.Э. Гербек

Филогенетика и таксономия

- 856 **ОБЗОР**
Последовательности ДНК агробактериального происхождения в филогенетических исследованиях растений. Т.В. Матвеева, П.М. Журбенко, Г.В. Хафизова, А.Д. Шапошников, Р.Р. Жидкин, А.В. Родионов
- 868 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Новый молекулярный маркер для филогенетических исследований стрекоз (Insecta, Odonata), включающий части консервативных генов гистонов H3 и H4 и спейсер между ними, применимый и к другим организмам. [А.В. Мзглинец], В.С. Булгакова, О.Э. Костерин (на англ. языке)
- 883 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Полные последовательности пластовов видов *Lonicera* L.: значение для филогении и сравнительный анализ. Ш.С. Альмерекова, М.М. Ермагамбетова, Д.Е. Ерболатов, М.Ю. Ишимуратова, Е.К. Турусбеков (на англ. языке)

Актуальные технологии

- 896 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Увеличение доли дальнего красного света сокращает вегетационный период тритикале в условиях спидбридинга. А.О. Блинков, В.М. Нагамова, Я.В. Минькова, Н.Ю. Свистунова, С. Радзенице, А.А. Кочешкова, Н.Н. Слепцов, А.В. Фрейманс, В.В. Панченко, А.Г. Черноок, Г.И. Карлов, М.Г. Дивашук

Molecular and cell biology

- 737 ORIGINAL ARTICLE
A new combination of 5'- and 3'-untranslated regions increases the expression of mRNAs *in vitro* and *in vivo*. D.N. Anropov, O.V. Markov, A.S. Dome, P.A. Puchkov, E.V. Shmendel, D.V. Gladkikh, V.M. Golyshev, A.M. Matveeva, M.A. Maslov, G.A. Stepanov
- 744 ORIGINAL ARTICLE
HOXB13 interactome in prostate cancer cells: biochemical and functional interactions between the transcription factors HOXB13 and TBX3. M.M. Erokhin, N.Y. Kozelchuk, R.H. Ziganshin, V.V. Tatarskiy, D.A. Chetverina

Plant genetics

- 753 ORIGINAL ARTICLE
Karyological differentiation among bread wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) with distinct breeding statuses and growth habits. A.F. Muterko, E.D. Badaeva, E.V. Zuev, E.A. Salina
- 769 ORIGINAL ARTICLE
Mapping loci and genes controlling heading and maturity time in common wheat under long-day conditions and assessing their effects on yield-related traits. A.A. Kiseleva, A.I. Stasyuk, I.N. Leonova, E.A. Salina

Plant breeding for immunity and quality

- 779 ORIGINAL ARTICLE
Prebreeding studies of near-isogenic spring bread wheat lines, differing by presence or absence of the 3R(3D) chromosomal substitution from the triticale cultivar Satu. S.N. Sibikeev, I.G. Adonina, A.E. Druzhin, Z.E. Fitileva, O.A. Baranova
- 789 ORIGINAL ARTICLE
Variability of the mineral composition of durum wheat grain (*Triticum durum* Desf.) under different environmental conditions. I.N. Leonova, P.N. Malchikov, N.A. Vinichenko, V.V. Piskarev, M.G. Myasnikova, V.A. Aparina, T.V. Chaheeva

Animal genetics

- 798 ORIGINAL ARTICLE
On the genetic structure and origin of the little ground squirrel *Spermophilus pygmaeus* (Pallas, 1778) in the North Caucasus. F.A. Tembotova, A.Kh. Amshokova, M.S. Gudova
- 812 ORIGINAL ARTICLE
Metabolic effects of trehalose in mice of the C57BL/6 strain with obesity induced by a high carbohydrate-fat diet. A.B. Pupyshev, N.M. Bazhan, A.Yu. Kazantseva, T.V. Yakovleva, V.M. Belichenko, N.V. Goncharova, T.A. Korolenko, M.A. Tikhonova

Medical genetics

- 819 ORIGINAL ARTICLE
Association of the rs823144 variant of the *RAB29* gene with the activity of lysosomal hydrolases in blood cells and risk of Parkinson's disease. K.S. Basharova, A.I. Bezrukova, K.A. Senkevich, G.V. Baydakova, A.V. Rybakov, I.V. Miliukhina, A.A. Timofeeva, E.Yu. Zakharova, S.N. Pchelina, T.S. Usenko
- 828 ORIGINAL ARTICLE
The contribution of FOXO family transcription factor genes (*FOXO1*, *FOXO3*) to chronic obstructive pulmonary disease. V.A. Markelov, L.Z. Akhmadishina, T.R. Nasibullin, Y.G. Aznabaeva, O.V. Kochetova, N.N. Khusnutdinova, S.M. Izmailova, N.Sh. Zagidullin, G.F. Korytina

Behavioral genetics

- 838 ORIGINAL ARTICLE
Using polygenic scores to assess liability to antisocial behavior. A.V. Kazantseva, D.V. Yakovleva, Yu.D. Davydova, E.K. Khusnutdinova
- 847 ORIGINAL ARTICLE
Endogenous oxytocin and intermale interactions after oxytocin administrations in Norway rats selected for behavior. S.G. Shikevich, R.V. Kozhemyakina, R.G. Gulevich, Yu.E. Herbeck

Phylogenetics and taxonomy

- 856 REVIEW
Agrobacterium-derived DNA sequences in phylogenetic studies of plants. T.V. Matveeva, P.M. Zhurbenko, G.V. Khafizova, A.D. Shaposhnikov, R.R. Zhidkin, A.V. Rodionov
- 868 ORIGINAL ARTICLE
A new molecular marker including parts of conservative histone H3 and H4 genes and the spacer between them for phylogenetic studies in dragonflies (Insecta, Odonata), extendable to other organisms. A.V. Mglinets, V.S. Bulgakova, O.E. Kosterin
- 883 ORIGINAL ARTICLE
Complete plastome sequences of *Lonicera* L. species: implications for phylogeny and comparative analysis. S.S. Almerekova, M.M. Yermagambetova, D.Y. Yerbolatov, M.Y. Ishmuratova, Y.K. Turuspekov

Mainstream technologies

- 896 ORIGINAL ARTICLE
A higher far-red intensity promotes the transition to flowering in triticale grown under speed breeding conditions. A.O. Blinkov, V.M. Nagamova, Y.V. Minkova, N.Yu. Svistunova, S. Radzeniec, A.A. Kocheshkova, N.N. Sleptsov, A.V. Freymans, V.V. Panchenko, A.G. Chernook, G.I. Karlov, M.G. Divashuk

doi 10.18699/vjgb-25-81

A new combination of 5'- and 3'-untranslated regions increases the expression of mRNAs *in vitro* and *in vivo*

D.N. Antropov¹, O.V. Markov¹, A.S. Dome¹, P.A. Puchkov², E.V. Shmendel², D.V. Gladkikh¹, V.M. Golyshev¹, A.M. Matveeva¹, M.A. Maslov², G.A. Stepanov  ¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia² Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University, Moscow, Russia stepanovga@niboch.nsc.ru

Abstract. mRNA vaccine technologies have been actively developing since the beginning of the 21st century and have received a major boost from new findings about the functioning of the immune system and the development of efficient vehicles for nucleic acid delivery. The mRNA vaccine demonstrates superior properties compared to the DNA vaccine, primarily due to accelerated mRNA vaccine development, enhanced flexibility, and the absence of integration into the genome. Artificial mRNAs have biotechnological and medical applications, including the development of antiviral and anticancer mRNA therapeutics. The effective expression of therapeutic mRNA depends upon the appropriate selection of structural elements. Along with the addition of the 5'-cap, appropriate polyadenylation, and sequence codon optimization, 5'- and 3'-untranslated regions (UTRs) play an important role in the translation efficiency of therapeutic mRNAs. In this study, new plasmids containing a novel combination of UTR pairs, namely 5'-UTR-4 and 3'-UTR AES-mtRNR1, were constructed to obtain artificial mRNAs encoding green fluorescent protein (GFP) and firefly luciferase (FLuc) with new structural elements and properties. The novel combination of the UTRs, which is described in this article for the first time, in addition to sufficient polyadenylation and pseudouridination of mRNA, was demonstrated to strongly increase the translation of codon-optimized sequences of reporter mRNAs. We generated lipoplexes containing the aforementioned reporter mRNAs and liposomes composed of cationic lipid 2X3 (1,26-bis(cholest-5-en-3beta-yloxy-carbonylamino)-7,11,16,20-tetraazahexacosane tetrahydrochloride) and helper lipid DOPE (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine). For *in vivo* experiments, the liposomes were decorated with 2 % of 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG₂₀₀₀). The translation efficiency of mRNAs was found to be superior for the novel UTR combination compared with HBB gene UTRs, both *in vitro* and *in vivo*. When mRNA is administered intramuscularly, the proposed combination of UTRs provides lasting expression for more than 4 days. The results demonstrated that the novel UTR pair combination could be useful in the development of artificial mRNAs with enhanced translation efficiency, potentially reducing the dose for mRNA-based therapeutics.

Key words: synthetic mRNA; RNA delivery; nucleotide modifications; untranslated region; lipid nanoparticle

For citation: Antropov D.N., Markov O.V., Dome A.S., Puchkov P.A., Shmendel E.V., Gladkikh D.V., Golyshev V.M., Matveeva A.M., Maslov M.A., Stepanov G.A. A new combination of 5'- and 3'-untranslated regions increases the expression of mRNAs *in vitro* and *in vivo*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(6):737-743. doi 10.18699/vjgb-25-81

Funding. This research was funded by the Russian Science Foundation (grant number 22-75-10153 for physicochemical LNP characterization, mRNA construction and synthesis, and *in vitro* transfection and *in vivo* experiments; 23-73-10168 for lipid synthesis and liposome preparation).

Новая комбинация 5'- и 3'-нетранслируемых областей способствует повышению экспрессии мРНК *in vitro* и *in vivo*

Д.Н. Антропов¹, О.В. Марков¹, А.С. ДOME¹, П.А. Пучков², Е.В. Шмендель², Д.В. Гладких¹, В.М. Голышев¹, А.М. Матвеева¹, М.А. Маслов², Г.А. Степанов  ¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия² Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия stepanovga@niboch.nsc.ru

Аннотация. Технология мРНК-вакцин начала активно развиваться в начале XXI в. и получила хороший стимул за счет расширения знаний о функционировании иммунной системы человека и успехов в синтезе вариантов молекул-доставщиков. Иммунизация с помощью мРНК-вакцин является более эффективной, чем иммунизация с помощью ДНК, благодаря более быстрой разработке, гибкости технологии и отсутствию интеграции в геном. В наши дни искусственные мРНК используют в различных биотехнологических и медицин-

ских целях, включая разработку противовирусных и противораковых мРНК-вакцин. Для их эффективной экспрессии необходимо правильно подобрать структурные элементы мРНК. Помимо добавления в структуру мРНК 5'-кэпа, достаточного уровня полиаденилирования и оптимизации последовательности кодонов, 5'- и 3'-нетранслируемые области (НТО) играют важную роль в трансляционной эффективности терапевтических мРНК. В настоящем исследовании для получения искусственных мРНК были сконструированы плазмидные конструкции, содержащие в своем составе новую комбинацию нетранслируемых областей – 5'-UTR-4 и 3'-UTR AES-mtRNR1. Для новой комбинации НТО, впервые описанной в данной работе, было показано значительное увеличение уровня трансляции кодон-оптимизированных последовательностей репортерных мРНК, кодирующих GFP (зеленый флуоресцентный белок) и FLuc (люцифераза светлячка), содержащих в своем составе псевдоуридин и поли(А)-последовательность. В ходе работы были сформированы комплексы вышеупомянутых репортерных мРНК с липосомами, состоящими из катионного липида 2X3 (1,26-бис(холест-5-ен-3 β -илоксикарбониламино)-7,11,16,20-тетраазогексакозан тетрагидрохлорид) и липида-хелпера DOPE (1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин). Для экспериментов *in vivo* в состав липосомальной композиции добавляли 2 % 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[амино(полиэтиленгликоль)-2000] (DSPE-PEG₂₀₀₀). Новая комбинация НТО продемонстрировала более высокую эффективность трансляции мРНК в сравнении с β -глобиновыми НТО как *in vitro*, так и *in vivo*. При внутримышечном введении мРНК предложенная комбинация НТО обеспечивает длительную экспрессию более четырех суток. Результаты исследования показали высокую эффективность новой комбинации НТО для повышения уровня трансляции искусственных мРНК, что может быть использовано для снижения терапевтической дозы мРНК в составе вакцин.

Ключевые слова: синтетическая мРНК; доставка РНК; модификации нуклеотидов; нетранслируемая область мРНК; липидные наночастицы

Introduction

mRNA vaccine technologies are emerging every year to defend humans from viral pathogens and even cancers. The COVID-19 pandemic proved the necessity of the fast development of vaccines targeted against a certain species of viruses. The release of different mRNA vaccines, such as BNT162b2, mRNA-1273, and others, has enabled effective vaccination of the population. It is clear that for effective and prolonged expression of antibodies, specific structure of mRNA is crucial (Fig. 1).

The necessity of UTRs in mRNA for various mRNA models is widely recognized (Chatterjee, Pal, 2009; Morais et al., 2021; Chen et al., 2022; Kirshina et al., 2023), along with such components as the Kozak sequence, which is required for translation (Kozak, 1989). The incorporation of 5'-UTR sequences enhances translation not only by protecting the coding sequences from nucleases but also by recruiting ribosomal machinery to a translation start site (Chatterjee, Pal, 2009). The most common method for enhancing translation is the addition of IRES (internal ribosome entry site) elements with complex secondary structure to the 5' end of mRNA, which promotes the recruitment of translational complexes at various stages of translation (Andreev et al., 2009). Sample et al. (2019) have successfully identified a high-ribosome-load sequence of a 5'-UTR (designated as "5'-UTR-4") using machine learning methods. The application of computationally selected sequences enabled the researchers to enhance translation intensity more than 100-fold, thus proving the efficacy of machine learning techniques.

3'-UTRs provide the mRNA molecule with a defense against nucleases, including the prevention of poly(A) tail degradation, which can influence the half-life of mRNA and the yield of the encoded protein. Derived from the human HBB gene, β -globin UTRs have been commonly used and demonstrated remarkable efficacy in both reporter and viral mRNA applications (Zhuang et al., 2020). The incorporation of a chimeric 3'-UTR called AES-mtRNR1, which comprises a part of 16S ribosomal rRNA of archaea (AES: amino-terminal enhancer of split) and a part of a mitochondrial rRNA (mtRNR1), allowed for 3-fold higher translation intensity *in vitro* in comparison to the standard β -globin 3'-UTR (Orlandini von Niessen et al., 2019). Their result was confirmed by *in vivo* application to a luciferase model (Orlandini von Niessen et al., 2019), indicating the universality of such a tandem UTR sequence. Thus, the previous investigations directed at the selection of the most effective UTR structures allow to design combinations and test their translational effectiveness.

In this study, we introduced a novel combination of 5'-UTR-4 and 3'-UTR AES-mtRNR1 (hereafter, "synthetic UTRs") into a single mRNA for the first time. We constructed reporter mRNAs, encoding GFP or FLuc, containing the novel combination of UTRs for delivery into human cells *in vitro* and live animal tissues *in vivo*. Cationic liposomes composed of the cationic lipid 2X3, the helper lipid DOPE, and DSPE-PEG2000 (for *in vivo* experiments) were used to deliver mRNAs. The expression of the reporter mRNAs with synthetic UTRs was demonstrated to be 5–6-times higher than that of β -globin UTRs *in vitro* and *in vivo*.

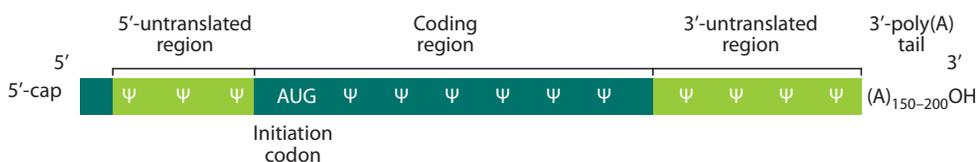


Fig. 1. The mRNA design optimal for effective translation. Inserted pseudouridines are indicated by the "Ψ" sign.

Materials and methods

Plasmid design, construction, and synthesis. Sequence of the hyperactive T7 promoter was taken from (Conrad et al., 2020). Sequences of β -globin 5'- and 3'-UTRs and those of UTRs 5'-UTR-4 and AES-mtRNR1 (3'-UTR) (see Supplementary Table S1)¹ were obtained from NCBI and (Andreev et al., 2009; Leppek et al., 2022), respectively. A multiple cloning site (MCS) between 5'- and 3'-UTRs was designed using several most popular unique restriction sites. Downstream of 3'-UTRs, an XbaI restriction site was inserted to generate a linearized DNA template for *in vitro* transcription.

Fragments containing MCS and UTRs were synthesized by the Laboratory of Synthetic Biology at the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine (ICBFM) SB RAS and cloned into the pCMV6-Entry vector (OriGene, USA; see Supplementary Fig. S1) by means of restriction sites Psp124BI and XmaI (SibEnzyme, Russia). Two parallel cloning reactions resulted in plasmid vectors: pCMV6_T7_bglob_AGG (containing 5'- and 3'-UTRs of the human HBB gene; see Supplementary Fig. S2) and pCMV6_T7_synth_AGG (containing 5'-UTR-4 and AES-mtRNR1; see Supplementary Fig. S3).

ORFs of GFP and FLuc were PCR-amplified from plasmids phMGFP (Promega, USA) and pCDH-EF1a-Luc2-IRES-mKate2 (Yuzhakova et al., 2022), respectively, with primers containing restriction sites, the Kozak sequence, and start and stop codons and were cloned by the restriction–ligation method into plasmids pCMV6_T7_bglobUTR_AGG and pCMV6_T7_synthUTR_AGG.

***In vitro* transcription and mRNA purification.** GFP and FLuc with β -globin UTRs and the synthetic UTRs were obtained by *in vitro* transcription using T7 polymerase (Biolabmix, Russia). The Anti-Reverse Cap Analog (ARCA) (Biolabmix, Russia) and pseudouridine triphosphate (Biolabmix, Russia) were added during the transcription to modify mRNA structure. After the RNA synthesis, the DNA template was removed with DNase I (Thermo Fisher Scientific, USA). Poly(A) polymerase (New England Biolabs, USA) was used to polyadenylate 3' termini of the synthesized mRNA by the standard protocol. The RNA products were purified via precipitation with 2.5 M LiCl followed by storage of the precipitate at -20°C for 30 min and subsequent centrifugation at $16,000 \times g$ for 15 min at 4°C . The pellet was washed with 70 % ethanol and dried for 10 min at room temperature with subsequent dilution in diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated H_2O .

Preparation of cationic liposomes. A solution of 1,26-bis(cholest-5-en-3 β -yloxy-carbonylamino)-7,11,16,20-tetraazahexacosane tetrahydrochloride (2X3; see Supplementary Fig. S4) in a CHCl_3 – CH_3OH mixture (1:1, v/v) was added to a solution of 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) in CHCl_3 at a molar ratio of 1:3 and gently stirred. To obtain PEG-containing cationic liposomes, a solution of DSPE-PEG₂₀₀₀ (Lipoid, Germany) (2 % mol.) in CHCl_3 was added to the 2X3-DOPE solution at a molar ratio of 1:3. Organic solvents were removed *in vacuo*, and the obtained lipid film was dried for 4 h at 0.1 Torr to remove residual organic solvents. Then, it was hydrated using deionized water at 4°C overnight. The liposomal dispersion was sonicated

for 15 min at 70 – 75°C in a bath-type sonicator (Bandelin Sonorex Digitec DT 52H, Berlin, Germany), filtered ($0.45\ \mu\text{m}$ Chromafil® CA-45/25; Macherey–Nagel, Düren, Germany), flushed with argon, and stored at 4°C .

Size and zeta-potential measurement. Lipoplexes were pre-formed via mixing of equal (25 μL) volumes of the RNA and liposome solutions at appropriate concentrations in saline (154 mM sodium chloride). Lipoplex formation was carried out for 20 min at 25°C . Next, 10- μL aliquots of lipoplexes were diluted in 1 mL of DEPC-treated water. To measure physicochemical parameters, 1 mL of a lipoplex or liposome suspension was placed into a DTS1070 folded capillary cuvette (Malvern Instruments, Malvern, UK). The size and polydispersity index (PDI) of lipoplexes were measured in three biological replicates by dynamic light scattering (DLS) on a Malvern Zetasizer Nano instrument (Malvern Instruments, Malvern, UK) at a 173° scattering angle and 25°C . The measurements were performed in Malvern's Zetasizer v7.11 software (Malvern Instruments). A viscosity of 0.8872 centipoises (cP), a refractive index (RI) of 1.330 for the dispersant, and an RI of 1.020 and absorption of 1.335 for the material in suspension were chosen as settings in the software. An equilibration duration of 30 s was selected before the total measurement. ζ -Potential was measured at 25°C in three biological replicates. Before the measurement, the equilibration duration was set to 120 s. Each measurement was paused for 30 s before the next one.

Atomic force microscopy (AFM) imaging. AFM images were captured in ambient air. Sample preparation for AFM was as follows: (1) dilution of samples to desired concentration, (2) deposition of 6 μL of a sample onto a freshly prepared mica slide ($1 \times 1\ \text{cm}$) for adsorption for 60 s, (3) rinsing with 100–1,000 μL of MilliQ water, and (4) drying the specimen with a gentle argon stream. Images were acquired on a Multimode 8 (Bruker) atomic force microscope in “ScanAsyst in Air” mode using ScanAsyst-Air probes (Bruker) or in tapping mode with a diamondlike carbon NSG-10 series AFM cantilever (NT-MDT, Zelenograd, Russia) having a tip curvature radius of 1–3 nm. Images were processed, prepared, and analyzed in the Gwyddion software.

Cell lines. The HEK293T/17 cell line was purchased from ATCC (cat. # CRL-11268). Cells were cultured at 37°C in the DMEM/F12 (1:1) medium supplemented with 10 % of fetal bovine serum (FBS), $1 \times$ sodium pyruvate, $1 \times$ GlutaMax, $1 \times$ antibiotic/antimycotic, and $1 \times$ non-essential amino acids (all solutions from Gibco, USA) in a humidified atmosphere with 5 % of CO_2 .

Cell transfection *in vitro*. The transfection was performed on HEK293T/17 cells. For the assay, cells were seeded in 24-well plates at 1.4×10^5 cells/well and cultured to 60–70 % confluence in the medium described above. To avoid the degradation of RNA in the lipoplexes, the FBS-containing culture medium was replaced with the 450 μL /well of FBS-free culture medium (the cells were washed with PBS in-between). For the formation of lipoplexes, both RNA (500 ng per well) and liposomes 2X3-DOPE (1:3) were diluted with PBS to a volume of 25 μL per sample with their subsequent mixing. The mixture was incubated for 20 min for lipoplex formation. The lipoplexes were added to the FBS-free cell medium, and the

¹ Supplementary Table S1 and Figs S1–S7 are available at: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx24.pdf>

transfection lasted for 5 h. To stop the transfection, the FBS-free medium was replaced with the FBS-containing medium (with intermediate washing with PBS).

Flow cytometry. The transfection of GFP mRNA was carried out as described above in 24-well plates. At 24 h post-transfection, the cells were detached with TrypLE (Gibco, USA), centrifuged for 5 min at $500 \times g$, washed with PBS once, and resuspended in 1 mL of PBS containing 0.5 % of FBS. To assess the level of GFP expression, 10,000 events per sample were acquired on a BD FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, USA). Transfection efficiency was measured by flow cytometry with the help of two parameters: transfection percentage and mean fluorescence intensity (MFI). The transfection percentage was calculated as the percentage of GFP-positive singlets. The MFI was computed as the mean for a gated cell population. The results were analyzed in the FlowJo software and are presented as the mean and standard deviation (SD) from three replicates.

The time course of luminescence detection *in vitro*. The transfection of Fluc2 mRNA was carried out as described above in 24-well plates. 24h post-transfection medium was removed and 200 μ L of cold Luciferase Assay Buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.8, 1 % Triton-X100, 5 mM EDTA, 15 mM $MgCl_2$, 75 mM NaCl, 2 mM DTT, 2 mM ATP) was added. The plates were incubated at +4 °C for 20 min. After lysis, the suspension from each well was centrifuged in a separate 1.5 mL tubes at +4 °C, 12,000 g, 5 min, then 190 μ L of each supernatant was transferred into a new 24-well plate. The luminescence level (represented in relative luminescence units, RLU) was measured with ClarioStar Plus (BMG Labtech, Germany) after injecting 10 μ L of 3 mg/mL D-luciferin substrate solution (D-luciferin Potassium Salt, GoldBio, USA) per well. The data were analyzed in BMG Labtech CLARIOstar MARS Software.

The time course of luminescence detection *in vivo*. For *in vivo* experiments, female 4–6-week-old BALB/c mice were obtained from the vivarium of the ICBFM SB RAS (Novosibirsk, Russia). The animal experiments were conducted in accordance with the recommendations for the proper use and care of laboratory mice (ECC Directive 2010/63/EU). All experimental protocols were approved by the Animal Research Ethics Committee at the Institute of Cytology and Genetics SB RAS (Novosibirsk, Russia) (protocol No. 173 of 7 May 2024).

The experiments with mice were conducted in three biological repeats. BALB/c mice were intramuscularly (i.m.) injected with lipoplexes of FLuc mRNA with liposomes in PBS (N/P = 6/1, 10 μ g of mRNA, 150 μ L per animal). Luciferase expression *in vivo* was assessed 4, 8, 24, 48, 72, and 96 h after administration of lipoplexes to mice. The animals were injected intraperitoneally (i.p.) with 150 μ L (3.6 mg per mouse) of freshly prepared D-luciferin potassium salt (Gold Biotechnology, CA, USA) in PBS. After 15 min, the animals were anesthetized with isoflurane, and bioluminescence was visualized using IVIS Lumina X5 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) with an exposure time of 3 min. The intensity of the luminescent signals was estimated by densitometry using Living Image software v.4.7.4 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

Statistical analysis. All data plotted with error bars are expressed as the mean with standard deviation, unless other-

wise indicated. GFP signal data were analyzed using one way ANOVA, FLuc signal – using a two-tailed unpaired *t*-test. Significance was evaluated at $p < 0.05$.

Results and discussion

Construction and synthesis of the reporter mRNAs (GFP and FLuc mRNAs) with different types of UTRs

To correctly evaluate the effectiveness of the mRNA delivery in different conditions, the mRNA structure containing 5'-cap, UTRs and poly(A)-tail was suggested. The artificial pseudouridinated and capped mRNAs were synthesized from linearized plasmids coding for a respective RNA with subsequent T7-mediated transcription and purification (Fedorovskiy et al., 2024).

The abundance of the nucleotide modifications and the combination of modifications in mRNAs with different UTRs were typical (100 % substitution of uridine by pseudouridine); therefore, they did not affect the expression level when comparing mRNAs with different UTRs. For all mRNAs, polyadenylation was carried out under identical conditions, which also could not alter the expression level. Thus, the mRNA synthesis was varied only in terms of the UTR combination.

The purity and integrity of the synthesized *in vitro* polyadenylated mRNAs for the subsequent assays were tested by electrophoresis in a 1.5 % agarose gel (Supplementary Fig. S5).

The physicochemical characterization of the liposomes and their complexes with reporter mRNAs

Upon mRNA characterization, we tested the characteristics of their complexes with the lipid carriers (lipoplexes). The 2X3-DOPE composition at a 1:3 ratio (Fedorovskiy et al., 2024) was used as the carrier in this work as one of the most efficient liposomes tested in previous studies (Markov et al., 2015; Gladkikh et al., 2021), particularly due to the positive impact of the high content of helper lipid DOPE on efficient lipoplex formation and delivery (Vysochinskaya et al., 2022). For the subsequent *in vivo* assays, the polyethyleneglycol (PEG)-decorated lipoconjugate was added to the liposome composition for more prolonged circulation in the blood stream and better clearance. The N/P ratios of 4/1 for the *in vitro* and 6/1 for the *in vivo* delivery were used. Physicochemical properties of the lipoplexes containing FLuc mRNA were examined, including hydrodynamic diameters and ζ -potentials of the liposomes and lipoplexes as described in (Fedorovskiy et al., 2024) (see the Table).

It was shown that the formed lipoplexes were characterized by a small diameter of <200 nm and a positive surface charge of +25...+45 mV, which facilitates their permeabilization through the cell membrane. Additionally, the diameters of the lipoplexes were evaluated by AFM (see Supplementary Fig. S6). The lipoplexes were shown to form homogenous nanoparticles sized 100–200 nm, which confirms the dynamic light scattering measurements. The results demonstrated that the characteristics of the formed lipoplexes were appropriate for *in vitro* and *in vivo* delivery (Vysochinskaya et al., 2022; Fedorovskiy et al., 2024).

Diameters and ζ -potentials of 2X3-DOPE 1:3 and 2X3-DOPE 1:3 + 2 % DSPE-PEG₂₀₀₀ liposomes and their lipoplexes with FLuc mRNA (synthetic UTRs)

Lipid nanoparticles	Diameter, nm	ζ -potential, mV
2X3-DOPE 1:3	84.2 ± 1.1	28.5 ± 1.9
2X3-DOPE 1:3 + FLuc mRNA	82.6 ± 4.3	43.8 ± 3.8
2X3-DOPE 1:3 + 2 % DSPE-PEG ₂₀₀₀	104.7 ± 0.9	58.7 ± 0.6
2X3-DOPE 1:3 + 2 % DSPE-PEG ₂₀₀₀ + FLuc mRNA	193.4 ± 3.0	25.6 ± 0.5

Note. The data are presented as the mean ± SD of three replicates.

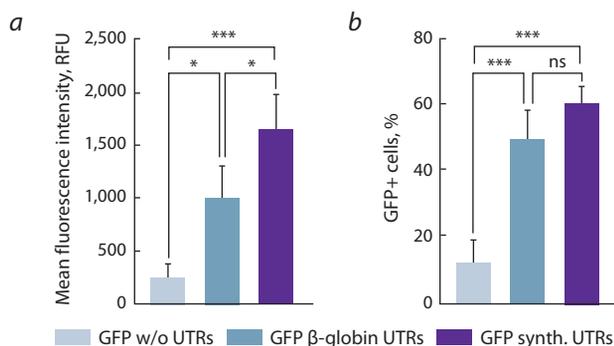


Fig. 2. The comparative analysis of fluorescent signal intensity in GFP mRNA transfected HEK293T/17 cells.

a, The mean fluorescence intensity (RFU) in transfected cells; *b*, the proportion of GFP-positive cells in transfected cells. The data are shown as the mean ± SD of three biological replicates. Data were statistically analyzed using ordinary one-way ANOVA. * $p = 0.0191$; 0.0474 for comparison of cells transfected with GFP with β -globin UTRs or GFP mRNA without UTRs; cells transfected with GFP with β -globin UTRs or GFP with synthetic UTRs respectively (mean GFP+ RFU); *** $p = 0.0009$; 0.0005 ; 0.0001 for comparison of cells transfected with GFP with synthetic UTRs or GFP mRNA without UTRs (mean GFP+ RFU); GFP with β -globin UTRs and GFP without UTRs; GFP with synthetic UTRs and GFP without UTRs respectively (GFP-positive cells, %), respectively; ns – for comparison of cells transfected with GFP with β -globin UTRs or GFP with synthetic UTRs (GFP-positive cells, %).

The *in vitro* comparison of reporter mRNA expression levels

To identify the most effective mRNA structure upon lipoplex delivery, two mRNA models, namely, GFP and FLuc, were used to test the reporter protein expression *in vitro* on HEK293T/17 cells. Initially, we examined expression efficiency of GFP mRNAs constructed with either β -globin or synthetic UTRs. To confirm the necessity of 5'- and 3'-UTRs in mRNA structure, we estimated the expression level for mRNAs without UTRs in the same experiment (Fig. 2).

The crucial role of UTRs for the prominent expression of synthetic mRNA was confirmed by the increase by 3.9–4.7 times in the number of GFP-positive cells and a 1.5–2.0-fold increase in the mean fluorescence intensity after the addition of UTRs to the mRNA structures. The fluorescence assay revealed a 1.5-fold increase in the fluorescence level of the cells transfected with mRNAs containing the novel UTR combination as compared to mRNAs carrying the commonly used β -globin UTRs. Moreover, this finding supports the idea of more effective expression due to the higher ribosome load at the 5' end of mRNA (Orlandini von Niessen et al., 2019) and shows effective interaction of nucleotide motifs from these UTRs.

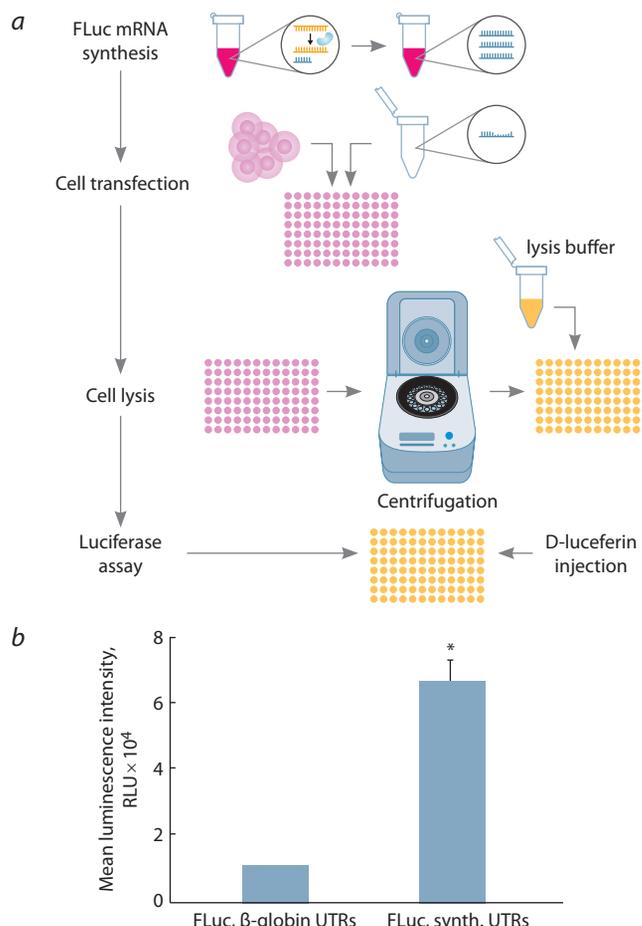


Fig. 3. The luciferase assay and luminescence analysis of FLuc mRNA containing β -globin or synthetic UTRs.

a, The schematic illustration of the luciferase assay *in vitro*. *b*, The average luminescent signals of the transfected cells. The data are presented as the mean ± SD of three biological replicates. Data were statistically analyzed using two-tailed Student's *t*-test. * $p = 0.00009$ as compared with FLuc mRNA containing β -globin UTRs.

To further confirm the efficacy of the novel UTR combination in the translation of reporter mRNAs within cells, an alternative mRNA encoding FLuc was used. The results demonstrated that mRNA flanked by the synthetic UTRs exhibited a luminescent signal intensity that was 6–7 times greater than that observed in mRNA containing β -globin UTRs (Fig. 3*b*). The more sufficient growth of the specific signal in the luminescent assay could be explained by the more significant sensitivity of the luminescence detection

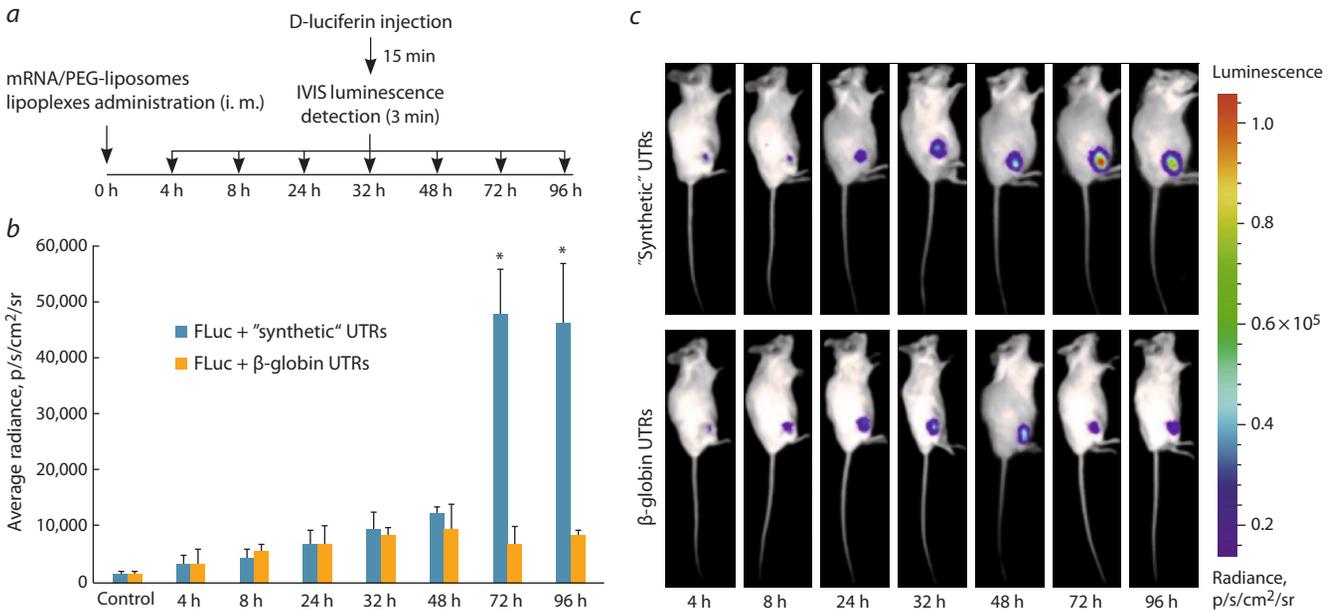


Fig. 4. *In vivo* luminescence analysis of BALB/c mice injected with FLuc mRNA.

a, The scheme of the experiment with key time intervals; *b*, the mean luminescence intensities of regions of interest (ROIs) in mice. The blue and orange bars represent the mice immunized with the FLuc mRNA containing synthetic or β-globin UTRs, respectively. The results are presented as the mean ± SD of three replicates. *c*, Representative IVIS images of FLuc luminescence in mice after the injection of lipoplexes. Data were statistically analyzed using two-tailed Student's *t*-test. * $p = 0.0001$ compared with FLuc mRNA containing β-globin UTRs.

(Troy et al., 2004). Indeed, the luminescence detection tends to be 100-fold more sensitive than the commonly investigated fluorescent detection; thus, the result allows a more precise evaluation of the comparative effectiveness of the investigated combination of UTRs. On the other hand, the higher signal for the luminescence assay upon the substitution of the β-globin UTRs with synthetic UTRs could be caused by the higher expression level of the *FLuc* gene rather than GFP. Mrksich et al. showed that the longer hydrophobic tail of the cationic lipid facilitates the higher translation level of the more prolonged mRNA. As 2X3 used in our assays is quite compact and less branched even compared with C12-200 (Mrksich et al., 2024), it promotes the higher expression of FLuc mRNA with more prolonged UTRs.

The *in vivo* comparison of reporter mRNA expression levels

To evaluate the influence of different UTRs on the efficiency of mRNA translation *in vivo*, lipoplexes of PEGylated liposomes with FLuc mRNAs containing either β-globin or synthetic UTRs were intramuscularly injected into BALB/c mice (Fig. 4).

The *in vivo* results demonstrated that mRNA containing a novel combination of 5'-UTR-4 and 3'-UTR AES-mtRNR1 exhibited dramatically elevated luminescence signal at late time points (≥ 72 h post injection) that was six times higher compared to β-globin-UTR-containing mRNA. *In vivo* findings revealed a dramatic increase in the luminescent signal observed at 72 h post injection, whereas for the β-globin UTRs, the specific signal tended to decay at 48 h post injection. It is worth noting that in our study, the signal peak shifted from several hours post injection (as shown e. g. (Panova et al., 2023))

to 48 h post injection and later. This shift could be caused not only by the carrier molecules used in this work and their properties but also by the specific translation pattern resulting from the novel UTR combination. According to (Ruis de los Mozos et al., 2013), 5' and 3' components of mRNA tend to interact with each other, providing stabilization of the mRNA. Moreover, the extension of 3'-UTR length could have a positive effect on the half-life of the mRNAs through interactions with RNA-binding proteins. The specific luciferase signal was detected even 174 h post injection of artificial mRNA with the novel UTR combination (Supplementary Fig. S7), which may indicate a longer half-life of the mRNA. These results really merge with the *in vitro* assays, indicating the advantages of the novel UTR combination. Long-term presence of mRNA in mammalian tissues and long-term expression of the target gene have been previously described, but for other delivery systems, which explains the difference between our data and other studies (Hassett et al., 2024). The expression enhancement accomplished in our research may facilitate the development of antiviral or anticancer mRNA vaccines possessing higher immunogenicity than the existing analogues.

Conclusion

Overall, the results of this study indicate that the novel combination of synthetic 5'-UTR-4 and 3'-UTR AES-mtRNR1 UTRs introduced into reporter mRNAs demonstrated enhanced mRNA translation in comparison with mRNA containing β-globin UTRs in both *in vitro* and *in vivo* experiments. The optimization of the mRNA structure should improve the development of effective antiviral and anticancer mRNA modalities, which can compete with other types of vaccines and therapeutics.

References

- Andreev D.E., Dmitriev S.E., Terenin I.M., Prassolov V.S., Merri-
ck W.C., Shatsky I.N. Differential contribution of the m⁷G-cap to
the 5' end-dependent translation initiation of mammalian mRNAs.
Nucleic Acids Res. 2009;37(18):6135-6147. doi 10.1093/nar/gkp665
- Chatterjee S., Pal J.K. Role of 5'- and 3'-untranslated regions of
mRNAs in human diseases. *Biol Cell.* 2009;101(5):251-262. doi
10.1042/BC20080104
- Chen F., Coccain-Bousquet M., Girbal L., Nouaille S. 5'UTR sequences
influence protein levels in *Escherichia coli* by regulating translation
initiation and mRNA stability. *Front Microbiol.* 2022;13:1088941.
doi 10.3389/fmicb.2022.1088941
- Conrad T., Plumbom I., Alcobendas M., Vidal R., Sauer S. Maximizing
transcription of nucleic acids with efficient T7 promoters. *Commun
Biol.* 2020;3(1):439. doi 10.1038/s42003-020-01167-x
- Fedorovskiy A.G., Antropov D.N., Dome A.S., Puchkov P.A., Makarova
D.M., Konopleva M.V., Matveeva A.M., Panova E.V., Shmendel
E.V., Maslov M.A., Dmitriev S.E., Stepanov G.A., Markov O.V.
Novel efficient lipid-based delivery systems enable a delayed uptake
and sustained expression of mRNA in human cells and mouse tissues.
Pharmaceutics. 2024;16(5):684. doi 10.3390/pharmaceutics
16050684
- Gladkikh D.V., Sen'kova A.V., Chernikov I.V., Kabilova T.O., Popova
N.A., Nikolin V.P., Shmendel E.V., Maslov M.A., Vlassov V.V.,
Zenkova M.A., Chernolovskaya E.L. Folate-equipped cationic liposomes
deliver anti-MDR1-siRNA to the tumor and increase the efficiency of
chemotherapy. *Pharmaceutics.* 2021;13(8):1252. doi
10.3390/pharmaceutics13081252
- Hassett K.J., Rajlic I.L., Bahl K., White R., Cowens K., Jacquinet E.,
Burke K.E. mRNA vaccine trafficking and resulting protein expression
after intramuscular administration. *Mol Ther Nucleic Acids.*
2024;35(1):102083. doi 10.1016/j.omtn.2023.102083
- Kirshina A.S., Vasileva O.O., Kunyk D.A., Seregina K.K., Musli-
mov A.R., Ivanov R.A., Reshetnikov V.V. Effects of combinations
of untranslated-region sequences on translation of mRNA. *Bio-
molecules.* 2023;13(11):1677. doi 10.3390/biom13111677
- Kozak M. The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol.*
1989;108(2):229-241. doi 10.1083/jcb.108.2.229
- Leppek K., Byeon G.W., Kladwang W., Wayment-Steele H.K.,
Kerr C.H., Xu A.F., Kim D.S., ... Participants E., Dormitzer P.R.,
Solorzano A., Barna M., Das R. Combinatorial optimization of
mRNA structure, stability, and translation for RNA-based thera-
peutics. *Nat Commun.* 2022;13(1):1536. doi 10.1038/s41467-022-
28776-w
- Markov O.V., Mironova N.L., Shmendel E.V., Serikov R.N., Moro-
zova N.G., Maslov M.A., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Multicom-
ponent mannose-containing liposomes efficiently deliver RNA in
murine immature dendritic cells and provide productive anti-tumour
response in murine melanoma model. *J Control Release.* 2015;213:
45-56. doi 10.1016/j.jconrel.2015.06.028
- Morais P., Adachi H., Yu Y.T. The critical contribution of pseudouri-
dine to mRNA COVID-19 vaccines. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:
789427. doi 10.3389/fcell.2021.789427
- Mrksich K., Padilla M.S., Joseph R.A., Han E.L., Kim D., Palanki R.,
Xu J., Mitchell M.J. Influence of ionizable lipid tail length on lipid
nanoparticle delivery of mRNA of varying length. *J Biomed Mater
Res A.* 2024;112(9):1494-1505. doi 10.1002/jbm.a.37705
- Orlandini von Niessen A.G., Poleganov M.A., Rechner C., Plaschke A.,
Kranz M.L., Fesser M., Diken M., Lower M., Vallazza B., Beis-
sert T., Bukur V., Kuhn A.N., Tureci O., Sahin U. Improving mRNA-
based therapeutic gene delivery by expression-augmenting 3' UTRs
identified by cellular library screening. *Mol Ther.* 2019;27(4):824-
836. doi 10.1016/j.ymthe.2018.12.011
- Panova E.A., Kleymenov D.A., Shcheblyakov D.V., Bykonja E.N.,
Mazunina E.P., Dzharrullaeva A.S., Zolotar A.N., ... Dmitriev S.E.,
Gushchin V.A., Naroditsky B.S., Logunov D.Y., Gintsburg A.L.
Single-domain antibody delivery using an mRNA platform protects
against lethal doses of botulinum neurotoxin A. *Front Immunol.*
2023;14:1098302. doi 10.3389/fimmu.2023.1098302
- Ruiz de los Mozos I., Vergara-Irigaray M., Segura V., Villanueva M.,
Bitarte N., Saramago M., Domingues S., Arraiano C.M., Fechter P.,
Romby P., Valle J., Solano C., Lasa I., Toledo-Arana A. Base pairing
interaction between 5'- and 3'-UTRs controls *icaR* mRNA transla-
tion in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Genet.* 2013;9(12):e1004001.
doi 10.1371/journal.pgen.1004001
- Sample P.J., Wang B., Reid D.W., Presnyak V., McFadyen I.J., Mor-
ris D.R., Seelig J. Human 5' UTR design and variant effect predic-
tion from a massively parallel translation assay. *Nat Biotechnol.*
2019;37(7):803-809. doi 10.1038/s41587-019-0164-5
- Troy T., Jekic-McMullen D., Sambucetti L., Rice B. Quantitative com-
parison of the sensitivity of detection of fluorescent and biolumines-
cent reporters in animal models. *Mol Imaging.* 2004;3(1):9-23. doi
10.1162/15353500200403196
- Vysochinskaya V., Shishlyannikov S., Zabrodskaya Y., Shmendel E.,
Klotchenko S., Dobrovolskaya O., Gavrilova N., Makarova D.,
Plotnikova M., Elpaeva E., Gorshkov A., Moshkoff D., Maslov M.,
Vasin A. Influence of lipid composition of cationic liposomes 2X3-
DOPE on mRNA delivery into eukaryotic cells. *Pharmaceutics.*
2022;15(1):8. doi 10.3390/pharmaceutics15010008
- Yuzhakova D., Kiseleva E., Shirmanova M., Shcheslavskiy V., Sachko-
va D., Snopova L., Bederina E., Lukina M., Dudenkova V., Yusu-
balieva G., Belovezhets T., Matvienko D., Baklaushev V. Highly in-
vasive fluorescent/bioluminescent patient-derived orthotopic model
of glioblastoma in mice. *Front Oncol.* 2022;12:897839. doi 10.3389/
fonc.2022.897839
- Zhuang X., Qi Y., Wang M., Yu N., Nan F., Zhang H., Tian M., Li C.,
Lu H., Jin N. mRNA vaccines encoding the HA protein of influenza A
H1N1 virus delivered by cationic lipid nanoparticles induce protec-
tive immune responses in mice. *Vaccines (Basel).* 2020;8(1):123. doi
10.3390/vaccines8010123

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

Received February 11, 2025. Revised April 20, 2025. Accepted May 12, 2025.

doi 10.18699/vjgb-25-82

Интерактом белка HOXB13 в клетках рака простаты: биохимические и функциональные взаимодействия между транскрипционными факторами HOXB13 и TBX3

М.М. Ерохин , Н.Я. Козельчук¹, Р.Х. Зиганшин², В.В. Татарский , Д.А. Четверина ¹ Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия yermaxbio@yandex.ru; daria.chetverina@gmail.com

Аннотация. Транскрипционные факторы относятся к одной из главных групп белков, подавление активности которых приводит к остановке роста опухолей. В различных типах рака экспрессируется определенный набор транскрипционных факторов, которые создают и поддерживают специфические паттерны экспрессии генов. В клетках рака простаты ключевым транскрипционным регулятором является белок HOXB13 (Homeobox B13). Известно, что HOXB13 – важный регулятор эмбрионального развития и терминальной клеточной дифференцировки. Он регулирует транскрипцию многих генов в нормальных и трансформированных клетках простаты, а также способен действовать как пионерный фактор, который открывает хроматин в регуляторных областях генов. Однако данных о белковых партнерах и функциях HOXB13 в клетках рака простаты очень мало. В настоящей работе мы провели поиск белковых партнеров HOXB13 методом иммуноаффинной очистки с последующим высокопроизводительным масс-спектрометрическим анализом (IP/LC-MS), используя в качестве модели клеточную линию рака простаты PC-3. Было обнаружено, что основными партнерами HOXB13 являются транскрипционные факторы с разными типами ДНК-связывающих доменов, в том числе белки TBX3, TBX2, ZFHX4, ZFHX3, RUNX1, NFAT5. С помощью ресурса DepMap мы показали, что один из установленных партнеров, белок TBX3, как и HOXB13, критически важен для роста и пролиферации клеточных линий рака простаты *in vitro*. Анализ отдельных клеточных линий рака простаты выявил, что нокаут обоих генов, *HOXB13* и *TBX3*, приводит к гибели одних и тех же линий: VCaP, LNCaP (clone FGC), PC-3 и 22Rv1. Таким образом, HOXB13 и TBX3 могут совместно рассматриваться как потенциальные мишени для создания специфических ингибиторов, подавляющих рост клеток рака простаты.

Ключевые слова: рак простаты; транскрипционные факторы; регуляция транскрипции; HOXB13; TBX3; TBX2; ZFHX4; ZFHX3; RUNX1; NFAT5

Для цитирования: Ерохин М.М., Козельчук Н.Я., Зиганшин Р.Х., Татарский В.В., Четверина Д.А. Интерактом белка HOXB13 в клетках рака простаты: биохимические и функциональные взаимодействия между транскрипционными факторами HOXB13 и TBX3. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(6):744-752. doi 10.18699/vjgb-25-82

Финансирование. Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 20-74-10099.

HOXB13 interactome in prostate cancer cells: biochemical and functional interactions between the transcription factors HOXB13 and TBX3

М.М. Erokhin , N.Y. Kozelchuk¹, R.H. Ziganshin², V.V. Tatarskiy , D.A. Chetverina ¹ Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia² Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia yermaxbio@yandex.ru; daria.chetverina@gmail.com

Abstract. Transcription factors represent one of the major groups of proteins, whose suppression leads to tumor growth arrest. Different types of cancer express a specific set of transcription factors that create and maintain unique patterns of gene expression. In prostate cancer cells, one of the key transcriptional regulators is the HOXB13 (Homeobox B13) protein. HOXB13 is known to be an important regulator of embryonic development and terminal cell differentiation. HOXB13 regulates the transcription of many genes in normal and transformed prostate cells and is also capable of acting as a pioneer factor that opens chromatin in the regulatory regions of genes. However, little is known about the protein partners and functions of HOXB13 in prostate cells. In the present study, we searched for protein partners of HOXB13 by immunoprecipitation followed by high-throughput mass spectrometric analysis (IP/LC-MS) using the PC-3 prostate cancer cell line as a model. The main partners of HOXB13 were found to be transcription factors with different types of DNA-binding domains, including the TBX3, TBX2, ZFHX4, ZFHX3, RUNX1, NFAT5 proteins. Using the DepMap resource,

we have shown that one of the identified partners, the TBX3 protein is as critical for the growth and proliferation of prostate cancer cell lines *in vitro* as HOXB13. Analysis of individual prostate cancer cell lines revealed that knockout of both genes, *HOXB13* and *TBX3*, leads to the death of the same lines: VCaP, LNCaP (clone FGC), PC-3 and 22Rv1. Thus, HOXB13 and TBX3 can be considered together as potential targets for the development of specific inhibitors that suppress prostate cancer cell growth.

Key words: prostate cancer; transcription factors; regulation of transcription; HOXB13; TBX3; TBX2; ZFNH4; ZFNH3; RUNX1; NFAT5

For citation: Erokhin M.M., Kozelchuk N.Y., Ziganshin R.H., Tatarskiy V.V., Chetverina D.A. HOXB13 interactome in prostate cancer cells: biochemical and functional interactions between the transcription factors HOXB13 and TBX3. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(6):744-752. doi 10.18699/vjgb-25-82

Введение

Рак простаты занимает важное место в причинах мужской смертности от онкологических заболеваний. Это один из наиболее часто встречающихся типов онкопатологий у мужчин (Siegel et al., 2023). В настоящее время самым распространенным способом химического воздействия на клетки рака простаты является блокирование андрогенного рецептора, AR. Однако в большинстве случаев опухолевые клетки через некоторое время приобретают устойчивость к данному типу терапии, что характеризуется образованием «кастрационно-резистентного рака предстательной железы» (КРПРЖ – castration-resistant prostate cancer, CRPC) (Crona, Whang, 2017). В связи с этим актуален поиск мишеней для создания новых ингибиторов опухолевой прогрессии при раке простаты.

Транскрипционный фактор HOXB13 охарактеризован как потенциальная мишень при терапии рака простаты. Данный белок кодируется одним из 39 генов семейства гомеозисных факторов (содержат ДНК-связывающий НОХ-домен, называемый также гомеобоксом), которые контролируют транскрипционные каскады в различных тканях в норме и при патологиях (Feng et al., 2021; Hubert, Wellik, 2023). HOXB13 – это пионерный фактор; его сайты связывания часто перекрываются с сайтами FOXA1, GATA2 и других ДНК-связывающих белков в клеточных линиях, происходящими из тканей простаты (Hankey et al., 2020; Pomerantz et al., 2020). Повышение уровня экспрессии *HOXB13* наблюдается примерно в 85 % случаев аденокарциномы простаты и коррелирует с резистентностью к AR-таргетной терапии, метастазированием и рецидивами в лечении опухоли (Zabalza et al., 2015; Yao et al., 2019; Weiner et al., 2021). Также было показано, что мутации *HOXB13* в геноме опухолевых клеток связаны с негативным прогнозом выживаемости пациентов при раке простаты (Ewing et al., 2012; Cai et al., 2015; Adashek et al., 2020).

Несмотря на важную роль HOXB13 в пролиферации раковых клеток простаты, его биохимические и функциональные свойства изучены недостаточно. В настоящем исследовании проведен анализ интерактома белка HOXB13 в клеточной линии рака простаты PC-3. Установлено, что одним из партнеров HOXB13 является белок TBX3. Оба белка, HOXB13 и TBX3, необходимы для роста и пролиферации одних и тех же клеточных линий рака простаты. Таким образом, HOXB13 и его партнер TBX3 могут рассматриваться как потенциальные мишени при создании ингибиторов для онкотерапии рака простаты.

Материалы и методы

Иммунопреципитация. Эксперименты по иммуноаффинной очистке были проведены как описано ранее (Chetverina et al., 2022). Ядерный экстракт получен из клеток линии PC-3. 10^9 клеток были дважды промыты в охлажденном во льду буфере PBS и суспендированы в 10 мл ледяного сахарозного буфера (10 mM Tris, pH 7.5, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ЭДТА, 1 mM ЭГТА, 1 mM ДТТ, 250 mM сахарозы, коктейль ингибиторов протеаз без ЭДТА). Клетки гомогенизировали с помощью пестика Dounce и инкубировали на льду 10 мин. Затем ядра осаждали центрифугированием при 3000g, +4 °C в течение 10 мин. Осадок суспендировали в 1 мл буфера IP-500 (10 mM Tris, pH 7.5, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ЭДТА, 1 mM ЭГТА, 1 mM ДТТ, 0.1 % NP-40, 10 % глицерин, коктейль ингибиторов протеаз без ЭДТА), гомогенизировали с помощью пестика Dounce и инкубировали 1 ч при +4 °C на ротаторе. Лизаты осветляли центрифугированием при 18000g, +4 °C в течение 10 мин. Далее ядерный экстракт был разбавлен до концентрации NaCl 150 mM с использованием буфера IP-0 (10 mM Tris, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM ЭДТА, 1 mM ЭГТА, 1 mM ДТТ, 0.1 % NP-40, 10 % глицерин, коктейль ингибиторов протеаз без ЭДТА).

Моноклональные антитела против HOXB13 (EPR17371, ab201682, Abcam) либо иммуноглобулины неиммунизированных кроликов (Jackson ImmunoResearch #011-000-002), используемые в качестве отрицательного контроля, были ковалентно пришиты к сефарозе А (Pierce) с помощью DMP (Sigma). Ядерный экстракт, содержащий 150 mM NaCl, инкубировали с антителами и сефарозой 14 ч при +4 °C. После процедур отмывок полученные иммунопреципитаты были элюированы с помощью буфера, содержащего 2 % SDS, 100 mM Tris, pH 8.0, 0.5 mM ЭДТА. Элюированные иммунопреципитаты осаждали с помощью ТХУ и далее анализировали методом жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии (liquid chromatography/tandem mass spectrometry, LC-MS).

Масс-спектрометрический анализ проб. Анализ полученных образцов проводили, как описано ранее в (Chetverina et al., 2022). Буфер для восстановления и алкилирования с дезоксихолатом натрия (SDC), pH 8.5, содержал 100 mM Tris, 1 % (w/v) SDC, 10 mM ТСЕР и 20 mM 2-хлор-ацетамида. По 20 мкл такого буфера добавляли к 20 мкг каждого образца белка. Каждый образец обрабатывали в ультразвуковой водяной бане в течение 1 мин, нагревали 10 мин при 95 °C, охлаждали до комнатной температуры и добавляли равный объем раствора трипсина в 100 mM Tris,

pH 8.5, в соотношении 1:50 (w/w). Реакцию оставляли на ночь при 37 °C, затем к пептидам добавляли 40 мкл 2 % трифторуксусной кислоты (TFA), смешивали с 80 мкл этилацетата и очищали на SDB-RPS StageTip. После двукратной промывки смесью 1 % TFA/этилацетат (1:1) и однократной промывки 0.2 % TFA пептиды элюировали в чистую пробирку с помощью буфера, содержащего 50 % ацетонитрила/5 % аммиака. Собранный материал высушивали в вакууме и хранили при температуре –80 °C. Перед дальнейшим анализом пептиды растворяли в буфере, содержащем 2 % ацетонитрил и 0.1 % TFA.

Необработанные данные и подробный протокол экспериментов по жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии находятся в открытом доступе в депозитории PRIDE (<http://www.ebi.ac.uk/pride>), номер проекта PXD059115. Топ-20 ядерных белков были отобраны по следующему параметру: HOXB13 Spectral count/IgG Spectral count >=2. Для проведения GO-анализа использовался ресурс TNMplot (Bartha, Györfy, 2021).

Анализ чувствительности раковых клеточных линий и уровня экспрессии генов в клинических образцах проводился на основе базы данных DepMap (<https://depmap.org/portal/>). Для анализа данных, полученных методом CRISPR, использовали версию CRISPR (DepMap Public 24Q4+Score, Chronos), для полученных методом RNAi – версию RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2).

Экспрессию генов в образцах опухоли и соответствующих нормальных тканях оценивали с помощью теста Манна–Уитни, база данных TNMplot (<https://tnmplot.com>), сведения из Cancer Genome Atlas (TCGA) и репозитория Genotype-Tissue Expression (GTEx) (Bartha, Györfy, 2021).

Выживаемость пациентов анализировали с использованием базы данных UCSC Xena (<https://xena.ucsc.edu/>) (Goldman et al., 2020), когорты TCGA Prostate Cancer (PRAD), Illumina HiSeq 2000 RNA (dataset ID – TCGA.PRAD.sampleMap/HiSeqV2) и фильтр “Primary tumor”.

Результаты

Интерактом фактора HOXB13 в клетках рака простаты линии PC-3

Поиск белковых партнеров фактора HOXB13 был осуществлен с помощью иммуноаффинной очистки (IP) с последующим анализом образцов методом высокопроизводительной масс-спектрометрии (IP/LC-MS). В качестве модели мы использовали линию рака простаты PC-3, в которой детектируется высокий уровень экспрессии гена HOXB13. Из клеток данной линии выделили ядерный экстракт, который был проинкубирован с антителами против HOXB13 или с IgG неиммунизированного животного (отрицательный контроль), ковалентно связанными с сефарозой А. После иммунопреципитации и серии отмывок белки были элюированы с сефарозных бусин с помощью SDS-содержащего буфера и проанализированы методом масс-спектрометрического анализа LC-MS. На рис. 1, А, Б представлены 20 белков с наибольшим обогащением согласно результатам IP/LC-MS-анализа.

GO-анализ 20 ядерных белков с наибольшими обогащениями сигналов в масс-спектрометрическом анализе

показал, что многие из них (11 из 20) представлены ДНК-связывающими факторами транскрипции (см. рис. 1, В).

Два белка-гомолога, ZFNХ4 и ZFNХ3 (zinc finger homeobox 3 и 4), имеют в своей структуре по 17 некластеризованных мотивов «цинковые пальцы» С2Н2-типа, а также по 4 ДНК-связывающих домена типа гомеобокс (НОХ-домены) (см. рис. 1, А). Несколько некластеризованных мотивов «цинковые пальцы» С2Н2-типа содержит также белок TRPS1. Белок HMG20A содержит ДНК-связывающий домен типа “High mobility group”. Три фактора, MGA (MAX gene-associated protein) и два белка-гомолога TBX3 и TBX2 (T-box transcription factors), включают ДНК-связывающий домен типа T-box. Белок TCF20 имеет А.Т.hook домен, RUNX1 – Runt домен, NFAT5 – RHD домен, а MRE11 – Mre11 домен (см. рис. 1, А).

Таким образом, многие топовые белковые партнеры HOXB13 являются транскрипционными факторами с разными типами ДНК-связывающих доменов.

Анализ базы данных DepMap: продукты генов HOXB13 и TBX3 наиболее значимы для пролиферации клеточных линий рака простаты

Для определения функциональной значимости выявленных партнеров HOXB13 на следующем этапе мы провели поиск типов рака, наиболее чувствительных к нокауту (CRISPR) или нокауну генов (RNAi), кодирующих HOXB13 и его белковые партнеры, используя базу данных DepMap (см. таблицу). В проекте DepMap суммированы данные скрининга зависимости уровня пролиферации опухолевых клеток различной этиологии от подавления активности индивидуальных генов методами CRISPR или RNAi (Tsherniak et al., 2017; Vazquez, Sellers, 2021). Вероятность зависимости (Dependency) каждой клеточной линии от определенного гена выражена в виде количественного показателя «эффект гена» (Gene effect): чем ниже этот параметр, тем выше уровень гибели клеток рассматриваемой клеточной линии при инактивации соответствующего гена.

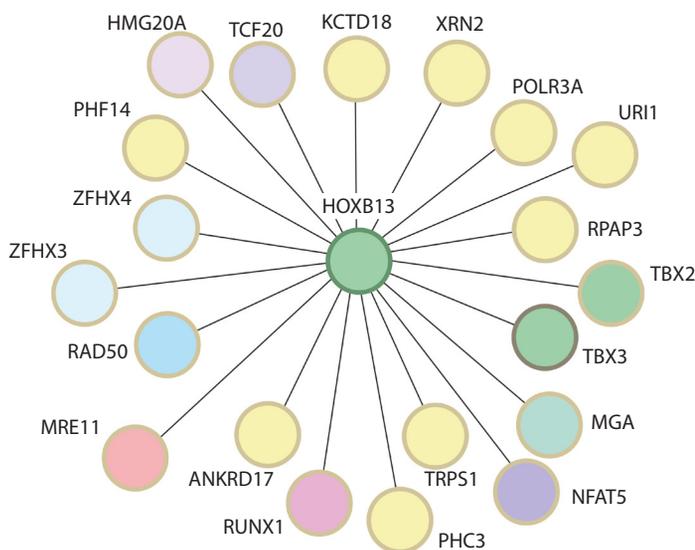
Анализ данных DepMap выявил, что клеточные линии разных типов опухолей по-разному реагируют на деpleцию тестируемых генов. Наиболее важно, что нарушение активности одного из факторов, гена TBX3, как и гена HOXB13, приводит к преимущественной гибели клеточных линий рака простаты. При этом нарушение роста и пролиферации опухолевых клеток простаты наблюдается как при нокауте (CRISPR), так и при нокауне (RNAi) генов HOXB13 и TBX3 (рис. 2, А, Б, см. таблицу).

Для того чтобы понять, какие именно клеточные линии наиболее чувствительны к делециям генов HOXB13 и TBX3, они были проанализированы по отдельности (см. рис. 2, В). В ресурсе DepMap имеются данные о влиянии CRISPR-опосредованного нокаута в 10 линиях, происходящих из тканей простаты. Пять из них, VCaP, LNCaP (clone FGC), PC-3, 22Rv1 и DU145, получены из агрессивных аденокарцином. Линии P4E6, Shmac 4, Shmac 5 выделены из клеток высококодифференцированных нематастатических карцином простаты, дополнительно иммортализованных с помощью экспрессии гена E6 HPV (Lang et al., 2006). WPE1-NA22 была получена из нормальных клеток простаты линии RWPE-1 путем трансформации

A

Protein	IP/LC-MS spectral count			Structural domain/function	
	HOXB13	IgG	HOXB13-IgG		
HOXB13	14	2	12	HOX-domain	
Top 20 proteins purified by HOXB13 antibody					
1	KCTD18	108	3	105	BTB/POZ domain
2	XRN2	100	33	67	5'→3' exoribonuclease activity
3	TCF20	87	36	51	DNA binding, A.T.hook domain, PHD domain
4	ZFHX4	40	1	39	DNA binding, Zinc Fingers C2H2-type, HOX-domains
5	PHF14	36	11	25	PHD domain, Histone-binding protein
6	RAD50	24	3	21	Double-strand break (DSB) repair
7	ZFHX3	21	1	20	DNA binding, Zinc Fingers C2H2-type, HOX-domains
8	POLR3A	18	1	17	DNA-directed RNA polymerase III subunit
9	MGA	26	10	16	DNA binding, T-box domain
10	RPAP3	15	0	15	RNA polymerase II-associated protein
11	TRPS1	23	8	15	DNA binding, Zinc Fingers C2H2-type
12	TBX3	14	1	13	DNA binding, T-box domain
13	HMG20A	18	5	13	DNA binding, HMG domain
14	ANKRD17	17	5	12	Cell cycle and DNA regulation
15	TBX2	10	0	10	DNA binding, T-box domain
16	URI1	11	1	10	Chromatin binding
17	RUNX1	9	0	9	DNA binding, Runt-domain
18	NFAT5	8	0	8	DNA binding, Rel homology domain (RHD)
19	MRE11	10	2	8	Mre11-DNA-binding, Double-strand break (DSB) repair
20	PHC3	12	5	7	Polycomb Group protein

B



B

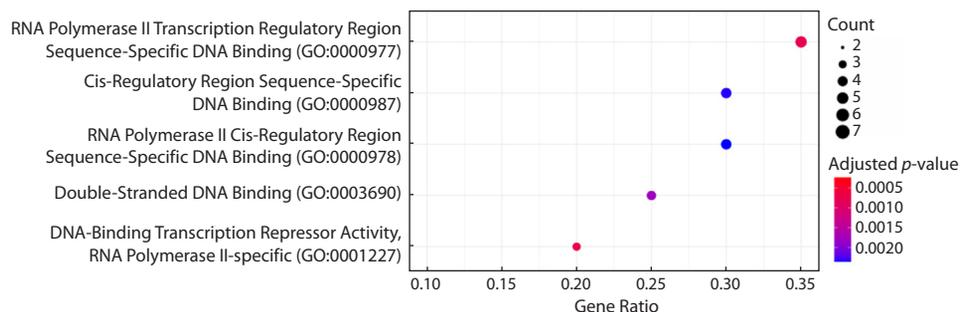


Рис. 1. Транскрипционные факторы в интерактоме HOXB13 в клетках рака простаты PC-3.

A – спектральные сигналы (spectral count) 20 ядерных белков с наибольшим обогащением в результатах IP/LC-МС-анализа (Top 20). Столбцы HOXB13 и IgG – результаты анализа ядерного экстракта, проинкубированного с антителами против HOXB13 или с неспецифическими IgG неиммунизированного животного соответственно. В отдельном столбце указана разница между сигналами в пробах HOXB13 и IgG (HOXB13-IgG). Справа приведен тип ДНК-связывающего домена. Б – схема интерактома HOXB13; В – GO-анализ 20 ядерных белков с наибольшими обогащениями сигналов в масс-спектрометрических экспериментах.

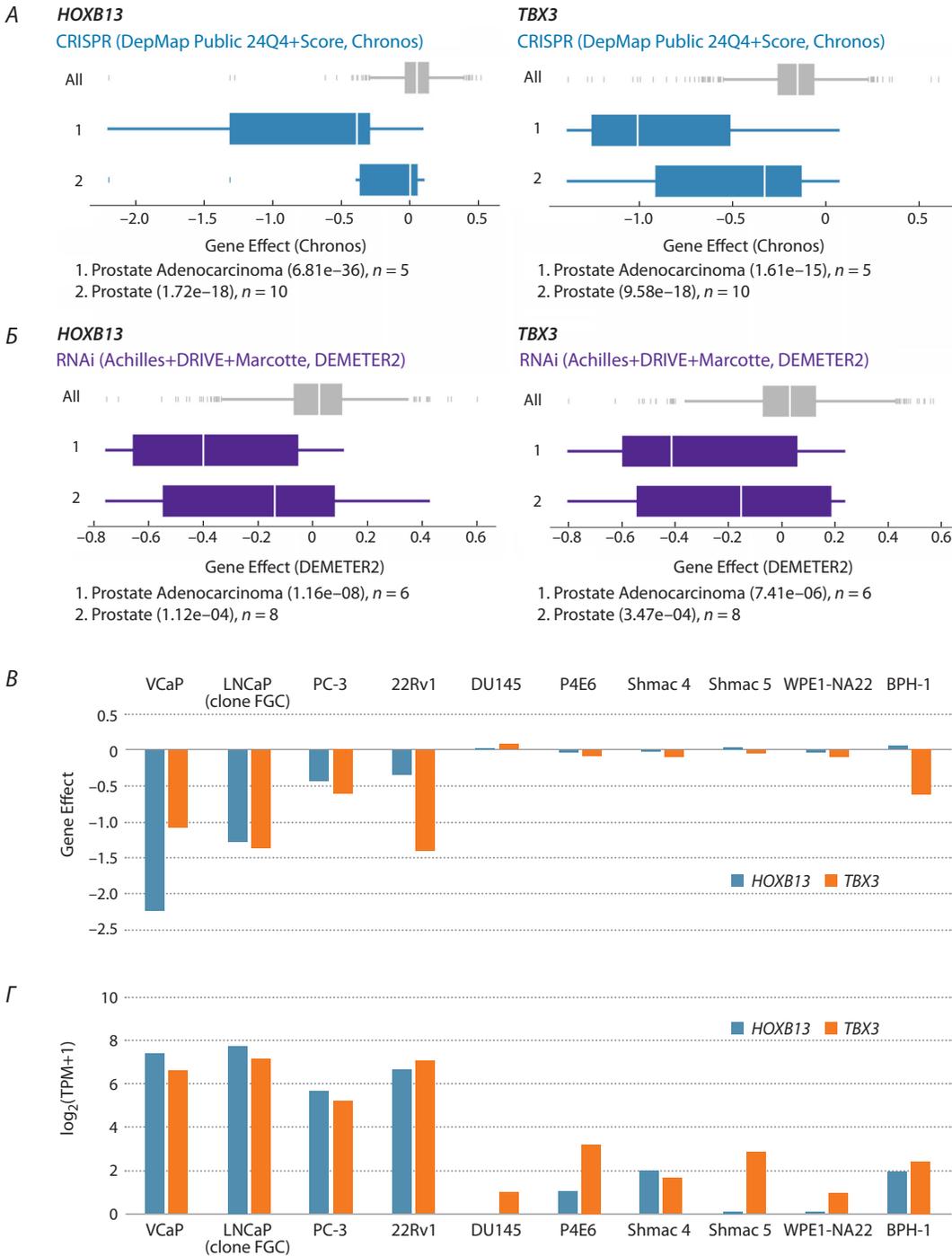


Рис. 2. Клеточные линии рака простаты наиболее чувствительны к нокауту и нокадауну генов *HOXB13* и *TBX3*. Анализ выполнен с использованием базы данных DepMap.

A – нокаут (CRISPR) генов *HOXB13* и *TBX3* специфично влияет на рост и жизнеспособность клеток, происходящих из простаты. Эффекты удаления тестируемого гена для всех линий клеток окрашены в серый цвет (всего 1178 линий клеток), эффекты удаления тестируемого гена для клеточных линий, происходящих из простаты, – в синий. По оси абсцисс представлены значения генетических эффектов (Gene Effect), отражающие уровень пролиферации раковых клеток при делеции тестируемого гена: чем меньше значение данного показателя, тем большее негативное влияние на рост клеток оказывает ингибирование активности гена. Белый пробел означает медианное значение показателя Gene Effect. Анализ DepMap выявляет две наиболее специфично чувствительные к нокауту группы линий: 1 – средний эффект 5 линий, соответствующих аденокарциноме простаты; 2 – средний эффект 10 клеточных линий, происходящих из простаты, включая линии аденокарциномы. **B** – нокадаун (RNAi, фиолетовый цвет) влияет на рост и жизнеспособность клеток, происходящих из простаты. Две наиболее специфично чувствительные к нокауту группы линий: 1 – средний эффект 6 линий аденокарциномы простаты; 2 – средний эффект 8 клеточных линий, происходящих из простаты, включая линии аденокарциномы. **B** – влияние нокаута (CRISPR) генов *HOXB13* и *TBX3* на ингибирование пролиферации 10 клеточных линий, происходящих из простаты, проанализированных по отдельности. По оси ординат указаны значения параметра Gene Effect при делеции генов методом CRISPR. **Г** – уровень транскрипции (выражен в значениях $\log_2(\text{TPM}+1)$) в 10 клеточных линиях, происходящих из тканей простаты. Анализ выполнен без нокаута генов.

Наиболее чувствительные к нокауту (CRISPR) или нокадауну (RNAi) типы опухолей при делеции *HOXB13* и его партнеров согласно базе данных DepMap

№ п/п	Ген	CRISPR knockout	RNAi knockdown	№ п/п	Ген	CRISPR knockout	RNAi knockdown
Контроль	<i>HOXB13</i>	Prostate	Prostate	11	<i>TRPS1</i>	Breast	Breast
1	<i>KCTD18</i>	Ovary	Kidney	12	<i>TBX3</i>	Prostate	Prostate
2	<i>XRN2</i>	No	No	13	<i>HMG20A</i>	No	No
3	<i>TCF20</i>	No	No	14	<i>ANKRD17</i>	Rhabdomyosarcoma	Breast
4	<i>ZFHX4</i>	No	No	15	<i>TBX2</i>	Neuroblastoma	Rhabdoid Cancer
5	<i>PHF14</i>	No	Mesothelioma	16	<i>URI1</i>	No	Head and Neck
6	<i>RAD50</i>	Lymphoma	No	17	<i>RUNX1</i>	Lymphoma	Lymphoma
7	<i>ZFHX3</i>	Rhabdoid Cancer	No	18	<i>NFAT5</i>	Stomach	Melanoma
8	<i>POLR3A</i>	No	No	19	<i>MRE11</i>	No	No
9	<i>MGA</i>	Head and Neck	Solid	20	<i>PHC3</i>	Ovary	No
10	<i>RPAP3</i>	Head and Neck	No				

Примечание. Обозначение "No" указывает, что тип опухоли, клетки которого были бы наиболее чувствительны к инактивации данного гена, не выявлен.

химическим канцерогеном (MNU) (Webber et al., 2001), ВРН-1 – из нетрансформированных эпителиальных клеток простаты путем иммортализации большим антигеном вируса SV40 (Hayward et al., 1995).

Высокой чувствительностью к делеции генов как *HOXB13*, так и *TBX3* обладали четыре из пяти клеточных линий аденокарциномы простаты: VCaP, LNCaP (clone FGC), PC-3 и 22Rv1. В то же время делеция *HOXB13* и *TBX3* не являлась значимой для роста и пролиферации клеточных линий DU145, WPE1-NA22, P4E6, Shmac 4, Shmac 5. Клетки линии ВРН-1 обладали чувствительностью к делеции *TBX3*, но не *HOXB13*. Анализ экспрессии генов *HOXB13* и *TBX3* в исследуемых линиях (данные ресурса DepMap) показал, что наиболее высокий уровень транскрипции этих факторов детектируется в линиях VCaP, LNCaP (clone FGC), PC-3 и 22Rv1 (см. рис. 2, Г), чувствительных к нокауту обоих генов. Таким образом, продукты генов *HOXB13* и *TBX3* преимущественно необходимы для пролиферации клеточных линий, происходящих из образцов аденокарцином простаты.

На следующем этапе мы проанализировали уровень транскрипции генов *HOXB13* и *TBX3* в клинических образцах с помощью ресурса TNMplot. Транскрипция гена *HOXB13* в норме ограничена тканями простаты (рис. 3, А). При патологии высокий уровень транскриптов гена *HOXB13* наблюдается в опухолевых тканях простаты и прямой кишки. Ген *TBX3* транскрибируется в большем числе тканей, при этом наиболее высокий уровень экспрессии данного фактора характерен для надпочечников, простаты и щитовидной железы (см. рис. 3, Б). В опухолевых тканях часто происходит снижение уровня транскрипции *TBX3* по сравнению с нетрансформированными образцами, что наблюдается и в случае рака простаты. Подробные данные изменений уровней экспрессии генов *HOXB13* и *TBX3* в здоровых и трансформированных тканях простаты представлены на рис. 3, В. Экспрессия гена *HOXB13* значительно и достоверно повышена ($FC = 3.8$, $p\text{-value} = 2.28e-69$), тогда как уровень транскрипции *TBX3* достоверно снижается ($FC = 0.84$, $p\text{-value} = 2.47e-04$).

В то же время достоверных корреляций уровней транскрипции генов *HOXB13* и *TBX3* с продолжительностью жизни пациентов с аденокарциномой простаты выявлено не было (см. рис. 3, Г).

Обсуждение

В проведенном исследовании с помощью метода IP/LC-MS были определены белковые партнеры фактора *HOXB13* в клеточной линии рака простаты PC-3, многие из которых относятся к ДНК-связывающим белкам.

Одним из установленных партнеров *HOXB13* является белок *TBX3*, имеющий в своей структуре ДНК-связывающий домен T-box типа. Анализ данных портала DepMap показал, что нокаут (CRISPR) и нокадаун (RNAi) как гена *HOXB13*, так и гена *TBX3* наиболее значимо блокирует рост и пролиферацию клеточных линий, происходящих из аденокарцином простаты. Уровень транскрипции гена *HOXB13*, но не *TBX3*, достоверно выше в клинических образцах, полученных от пациентов с аденокарциномой простаты, по сравнению с образцами здоровых тканей простаты. Вместе с тем корреляции между повышенным уровнем транскрипции гена *HOXB13* или *TBX3* и негативным прогнозом общей выживаемости пациентов с аденокарциномой простаты не выявлено.

Можно предположить, что белки *HOXB13* и *TBX3* тесно связаны функционально и участвуют в одинаковых каскадах регуляции транскрипции. Потенциально, совместное ингибирование активностей *HOXB13* и *TBX3* может оказывать более сильное ингибирующее влияние на пролиферацию клеток рака простаты, чем инактивация белков по отдельности. Для фактора *TBX3* ранее было показано, что он может подавлять транскрипцию генов-супрессоров опухолей, таких как $p14^{ARF}$ (Lingbeek et al., 2002; Yarosh et al., 2008). Возможно, кооперация между *HOXB13* и *TBX3* способна усиливать репрессию транскрипции отдельных онкосупрессоров. Роль *TBX3* достаточно подробно исследована в опухолях печени и молочной железы (Khan et al., 2020), однако данные о функциях этого фактора в клетках рака простаты на сегодня ограничены одним ис-

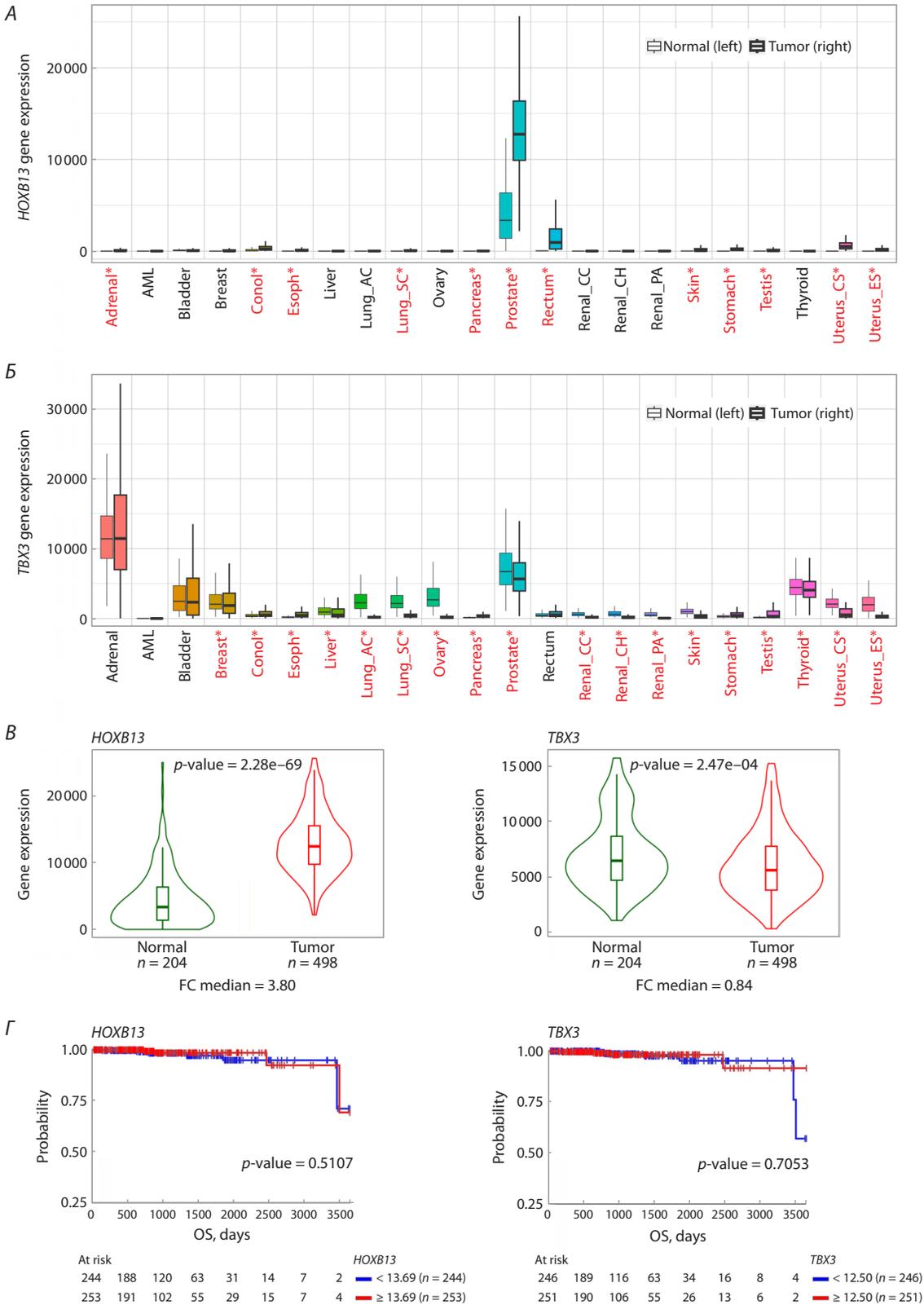


Рис. 3. Уровень транскрипции генов *HOXB13* и *TBX3* в клинических образцах.

A, Б – дифференциальная экспрессия генов в нормальных (слева) и опухолевых (справа) образцах разных тканей, анализ проведен с помощью ресурса TNMplot. Красным цветом отмечены случаи с p -value < 0.05 (тест Манна–Уитни) и экспрессией >10 в опухолевых или нормальных образцах. **В** – изменения уровня транскрипции генов *HOXB13* и *TBX3* представлены в виде скрипичных диаграмм. p -value, тест Манна–Уитни; FC (fold change median) – медиана изменения экспрессии, анализ проведен с помощью ресурса TNMplot. **Г** – корреляции между уровнем транскрипции генов *HOXB13* и *TBX3* и прогнозом общей продолжительности (OS) жизни пациентов в клинических образцах; анализ проведен с помощью ресурса UCSC Xena. Красным цветом выделены когорты с высокой экспрессией генов, синим – с низкой.

следованием (Hwang et al., 2022). Используя клеточную линию LNCaP, J.H. Hwang с коллегами показали, что в интерактоме транскрипционного кофактора CREB5 детектируются различные ДНК-связывающие белки, в том числе TBX3, HOXB13, FOXA1 и AR. Нокаут TBX3, как и FOXA1, приводил к гибели клеток линии LNCaP.

Два белковых партнера фактора HOXB13, белки-гомологи ZFNH4 и ZFNH3, содержат в своей структуре четыре гомеобоксных домена. Известно, что гомеобоксные домены могут образовывать друг с другом белковые контакты (Ortiz-Lombardia et al., 2017). Возможно, гомеодомен HOXB13 и гомеодомены ZFNH4/ZFNH3 способны взаимодействовать напрямую, что необходимо проверить в будущем.

Ранее с использованием клеточной линии VCaP, происходящей из рака простаты, было установлено, что HOXB13 преципитируется с белком EED, компонентом репрессорного комплекса PRC2 (Cao et al., 2014). Авторы также показали, что EED эффективно взаимодействует и с другим Polycomb-комплексом, PRC1. В нашей работе мы не обнаружили компоненты комплекса PRC2 в иммунопреципитате HOXB13, однако детектировались два других Polycomb-фактора: белки PRC3 и RUNX1. PRC3, как и его гомологи PRC 1 и 2, является коровым компонентом подкомплекса PRC1, называемым сPRC1 (Schuettengruber et al., 2017), тогда как для транскрипционного фактора RUNX1 была ранее показана возможность взаимодействия с Polycomb-фактором BMI1 (Yu et al., 2012). Возможно, HOXB13 участвует в регуляции транскрипции вместе с репрессорами группы Polycomb, но для изучения данного вопроса необходимо провести дополнительные исследования.

На сегодняшний день большое внимание уделяется поиску новых мишеней для направленной (таргетной) терапии онкологических заболеваний, при этом одними из перспективных типов мишеней являются транскрипционные факторы (Bouhleh et al., 2015; Hagenbuchner, Ausserlechner, 2016; Lambert et al., 2018). В последнее время появляется все больше данных, свидетельствующих о ключевой роли ДНК-связывающих транскрипционных факторов в процессах развития злокачественных опухолей (Vishnoi et al., 2020; Zhang et al., 2020). К примеру, анализ базы DepMap выявляет транскрипционные факторы как класс генов, инактивация которых критически важна для пролиферации опухолевых клеток (Chetverina et al., 2023). Описан ряд агентов, позволяющих ингибировать ДНК-связывающую активность транскрипционных факторов, что делает актуальным их изучение в качестве потенциальных мишеней для лечения онкопатологий (Bushweller, 2019; Li et al., 2022; Zhuang et al., 2022; Xie et al., 2023).

Полученные в настоящем исследовании результаты показывают, что большая часть топовых белков интерактома HOXB13 представлена ДНК-связывающими факторами. Свойство транскрипционных факторов взаимодействовать с другими ДНК-связывающими белками, вероятно, является одним из общих механизмов регуляции транскрипции генов как у млекопитающих (Jolma et al., 2013, 2015), так и у других многоклеточных (Erokhin et al., 2018). По всей видимости, множественные взаимодействия между транскрипционными факторами позволяют им образо-

вывать упорядоченные макрокомплексы, которые узнают не только единичные, часто вырожденные сайты связывания для отдельного фактора, но и более протяженные области ДНК, состоящие из набора мотивов нескольких белков. Способность ДНК-связывающих белков к взаимодействию может быть ключевой для специфичного выбора мест посадки регуляторных комплексов на хроматин. Модулирование возможности отдельных ДНК-связывающих белков рекрутироваться на хроматин является способом более локального воздействия на систему регуляции экспрессии генов, что делает транскрипционные факторы перспективной мишенью для подбора различных противоопухолевых компонентов.

Заключение

Полученные данные позволяют сделать следующие основные выводы. 1. Главные партнеры фактора HOXB13 представлены транскрипционными факторами с разными типами ДНК-связывающих доменов. 2. Клеточные линии, происходящие из образцов аденокарциномы простаты, наиболее чувствительны к делеции генов *HOXB13* и *TBX3*. 3. Подавление активностей генов *HOXB13* и *TBX3* приводит к остановке роста и пролиферации одних и тех же клеточных линий аденокарциномы простаты. Дальнейшие исследования необходимы для понимания эффектов совместного ингибирования HOXB13 и TBX3 *in vitro* и *in vivo*.

Список литературы / References

- Adashek J.J., Leonard A., Roszik J., Menta A.K., Genovese G., Subbiah V., Msaouel P. Cancer genetics and therapeutic opportunities in urologic practice. *Cancers (Basel)*. 2020;12(3):710. doi 10.3390/cancers12030710
- Bartha Á., Györfy B. TNMplot.com: a web tool for the comparison of gene expression in normal, tumor and metastatic tissues. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5):2622. doi 10.3390/ijms22052622
- Bouhleh M.A., Lambert M., David-Cordonnier M.-H. Targeting transcription factor binding to DNA by competing with DNA binders as an approach for controlling gene expression. *Curr Top Med Chem*. 2015;15(14):1323-1358. doi 10.2174/1568026615666150413154713
- Bushweller J.H. Targeting transcription factors in cancer – from undruggable to reality. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(11):611-624. doi 10.1038/s41568-019-0196-7
- Cai Q., Wang X., Li X., Gong R., Guo X., Tang Y., Yang K., Niu Y., Zhao Y. Germline HOXB13 p.Gly84Glu mutation and cancer susceptibility: a pooled analysis of 25 epidemiological studies with 145,257 participants. *Oncotarget*. 2015;6(39):42312-42321. doi 10.18632/oncotarget.5994
- Cao Q., Wang X., Zhao M., Yang R., Malik R., Qiao Y., Poliakov A., ... Feng F.Y., Kalantry S., Qin Z.S., Dhanasekaran S.M., Chinnaiyan A.M. The central role of EED in the orchestration of polycomb group complexes. *Nat Commun*. 2014;5:3127. doi 10.1038/ncomms4127
- Chetverina D., Vorobyeva N.E., Mazina M.Y., Fab L.V., Lomaev D., Golovkina A., Mogila V., Georgiev P., Ziganshin R.H., Erokhin M. Comparative interactome analysis of the PRE DNA-binding factors: purification of the Combgap-, Zeste-, Psq-, and Adfl-associated proteins. *Cell Mol Life Sci*. 2022;79(7):353. doi 10.1007/s00018-022-04383-2
- Chetverina D., Vorobyeva N.E., Györfy B., Shtil A.A., Erokhin M. Analyses of genes critical to tumor survival reveal potential 'super-targets': focus on transcription. *Cancers (Basel)*. 2023;15(11):3042. doi 10.3390/cancers15113042

- Crona D.J., Whang Y.E. Androgen receptor-dependent and -independent mechanisms involved in prostate cancer therapy resistance. *Cancers (Basel)*. 2017;9(6):67. doi 10.3390/cancers9060067
- Erokhin M., Georgiev P., Chetverina D. *Drosophila* DNA-binding proteins in polycomb repression. *Epigenomes*. 2018;2(1):1. doi 10.3390/epigenomes2010001
- Ewing C.M., Ray A.M., Lange E.M., Zuhlke K.A., Robbins C.M., Tembe W.D., Wiley K.E., ... Montie J.E., Xu J., Carpten J.D., Isaacs W.B., Cooney K.A. Germline mutations in HOXB13 and prostate-cancer risk. *N Engl J Med*. 2012;366(2):141-149. doi 10.1056/NEJMoa1110000
- Feng Y., Zhang T., Wang Y., Xie M., Ji X., Luo X., Huang W., Xia L. Homeobox genes in cancers: from carcinogenesis to recent therapeutic intervention. *Front Oncol*. 2021;11:770428. doi 10.3389/fonc.2021.770428
- Goldman M.J., Craft B., Hastie M., Repečka K., McDade F., Kamath A., Banerjee A., Luo Y., Rogers D., Brooks A.N., Zhu J., Haussler D. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nat Biotechnol*. 2020;38(6):675-678. doi 10.1038/s41587-020-0546-8
- Hagenbuchner J., Auserlechner M.J. Targeting transcription factors by small compounds – current strategies and future implications. *Biochem Pharmacol*. 2016;107:1-13. doi 10.1016/j.bcp.2015.12.006
- Hankey W., Chen Z., Wang Q. Shaping chromatin states in prostate cancer by pioneer transcription factors. *Cancer Res*. 2020;80(12):2427-2436. doi 10.1158/0008-5472.CAN-19-3447
- Hayward S.W., Dahiya R., Cunha G.R., Bartek J., Deshpande N., Narayan P. Establishment and characterization of an immortalized but non-transformed human prostate epithelial cell line: BPH-1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1995;31(1):14-24. doi 10.1007/BF02631333
- Hubert K.A., Wellik D.M. Hox genes in development and beyond. *Development*. 2023;150(1):dev192476. doi 10.1242/dev.192476
- Hwang J.H., Arafeh R., Seo J.-H., Baca S.C., Ludwig M., Arnoff T.E., Sawyer L., ... Kregel S., Van Allen E.M., Drake J.M., Freedman M.L., Hahn W.C. CREB5 reprograms FOXA1 nuclear interactions to promote resistance to androgen receptor-targeting therapies. *eLife*. 2022;11:e73223. doi 10.7554/eLife.73223
- Jolma A., Yan J., Whittington T., Toivonen J., Nitta K.R., Rastas P., Morgunova E., ... Hughes T.R., Lemaire P., Ukkonen E., Kivioja T., Taipale J. DNA-binding specificities of human transcription factors. *Cell*. 2013;152(1-2):327-339. doi 10.1016/j.cell.2012.12.009
- Jolma A., Yin Y., Nitta K.R., Dave K., Popov A., Taipale M., Enge M., Kivioja T., Morgunova E., Taipale J. DNA-dependent formation of transcription factor pairs alters their binding specificity. *Nature*. 2015;527(7578):384-388. doi 10.1038/nature15518
- Khan S.F., Damerell V., Omar R., Du Toit M., Khan M., Maranyane H.M., Mlaza M., Bleloch J., Bellis C., Sahm B.D.B., Peres J., ArulJothi K.N., Prince S. The roles and regulation of TBX3 in development and disease. *Gene*. 2020;726:144223. doi 10.1016/j.gene.2019.144223
- Lambert M., Jambon S., Depauw S., David-Cordonnier M.-H. Targeting transcription factors for cancer treatment. *Molecules*. 2018;23(6):1479. doi 10.3390/molecules23061479
- Lang S.H., Smith J., Hyde C., Macintosh C., Stower M., Maitland N.J. Differentiation of prostate epithelial cell cultures by matrigel/stromal cell glandular reconstruction. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2006;42(8):273-280. doi 10.1290/0511080.1
- Li Y., Song J., Zhou P., Zhou J., Xie S. Targeting undruggable transcription factors with PROTACs: advances and perspectives. *J Med Chem*. 2022;65(15):10183-10194. doi 10.1021/acs.jmedchem.2c00691
- Lingbeek M.E., Jacobs J.J.L., van Lohuizen M. The T-box repressors *TBX2* and *TBX3* specifically regulate the tumor suppressor gene *p14^{ARF}* via a variant T-site in the initiator. *J Biol Chem*. 2002;277(29):26120-26127. doi 10.1074/jbc.M200403200
- Ortiz-Lombardia M., Foos N., Maurel-Zaffran C., Saurin A.J., Graba Y. Hox functional diversity: novel insights from flexible motif folding and plastic protein interaction. *BioEssays*. 2017;39(4):1600246. doi 10.1002/bies.201600246
- Pomerantz M.M., Qiu X., Zhu Y., Takeda D.Y., Pan W., Baca S.C., Gusev A., ... Lee G.-S.M., Corey E., Long H.W., Zwart W., Freedman M.L. Prostate cancer reactivates developmental epigenomic programs during metastatic progression. *Nat Genet*. 2020;52(8):790-799. doi 10.1038/s41588-020-0664-8
- Schuettengruber B., Bourbon H.-M., Di Croce L., Cavalli G. Genome regulation by Polycomb and Trithorax: 70 years and counting. *Cell*. 2017;171(1):34-57. doi 10.1016/j.cell.2017.08.002
- Siegel R.L., Miller K.D., Wagle N.S., Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. 2023;73(1):17-48. doi 10.3322/caac.21763
- Tsherniak A., Vazquez F., Montgomery P.G., Weir B.A., Kryukov G., Cowley G.S., Gill S., ... Garraway L.A., Root D.E., Golub T.R., Boehm J.S., Hahn W.C. Defining a cancer dependency map. *Cell*. 2017;170(3):564-576.e16. doi 10.1016/j.cell.2017.06.010
- Vazquez F., Sellers W.R. Are CRISPR screens providing the next generation of therapeutic targets? *Cancer Res*. 2021;81(23):5806-5809. doi 10.1158/0008-5472.CAN-21-1784
- Vishnoi K., Viswakarma N., Rana A., Rana B. Transcription factors in cancer development and therapy. *Cancers (Basel)*. 2020;12(8):2296. doi 10.3390/cancers12082296
- Webber M.M., Quader S.T.A., Kleinman H.K., Bello-DeOcampo D., Storto P.D., Bice G., DeMendonca-Calaca W., Williams D.E. Human cell lines as an in vitro/in vivo model for prostate carcinogenesis and progression. *Prostate*. 2001;47(1):1-13. doi 10.1002/pros.1041
- Weiner A.B., Faisal F.A., Davicioni E., Karnes R.J., Griend D.J.V., Lotan T.L., Schaeffer E.M. Somatic HOXB13 expression correlates with metastatic progression in men with localized prostate cancer following radical prostatectomy. *Eur Urol Oncol*. 2021;4(6):955-962. doi 10.1016/j.euo.2020.05.001
- Xie X., Yu T., Li X., Zhang N., Foster L.J., Peng C., Huang W., He G. Recent advances in targeting the “undruggable” proteins: from drug discovery to clinical trials. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8(1):335. doi 10.1038/s41392-023-01589-z
- Yao J., Chen Y., Nguyen D.T., Thompson Z.J., Eroshkin A.M., Nerlakanti N., Patel A.K., ... Coppola D., Zhang J., Perera R., Kim Y., Mahajan K. The homeobox gene, *HOXB13*, regulates a mitotic protein-kinase interaction network in metastatic prostate cancers. *Sci Rep*. 2019;9(1):9715. doi 10.1038/s41598-019-46064-4
- Yarosh W., Barrientos T., Esmailpour T., Lin L., Carpenter P.M., Osann K., Anton-Culver H., Huang T. TBX3 is overexpressed in breast cancer and represses *p14^{ARF}* by interacting with histone deacetylases. *Cancer Res*. 2008;68(3):693-699. doi 10.1158/0008-5472.CAN-07-5012
- Yu M., Mazor T., Huang H., Huang H.-T., Kathrein K.L., Woo A.J., Chouinard C.R., ... Roeder R.G., Kim C.F., Zon L.I., Fraenkel E., Cantor A.B. Direct recruitment of polycomb repressive complex 1 to chromatin by core binding transcription factors. *Mol Cell*. 2012;45(3):330-343. doi 10.1016/j.molcel.2011.11.032
- Zabalza C.V., Adam M., Burdelski C., Wilczak W., Wittmer C., Kraft S., Krech T., ... Minner S., Simon R., Sauter G., Schlomm T., Tsourlakis M.C. HOXB13 overexpression is an independent predictor of early PSA recurrence in prostate cancer treated by radical prostatectomy. *Oncotarget*. 2015;6(14):12822-12834. doi 10.18632/oncotarget.3431
- Zhang J., Lee D., Dhiman V., Jiang P., Xu J., McGillivray P., Yang H., ... Cheng C., Yue F., Liu X.S., White K.P., Gerstein M. An integrative ENCODE resource for cancer genomics. *Nat Commun*. 2020;11(1):3696. doi 10.1038/s41467-020-14743-w
- Zhuang J.-J., Liu Q., Wu D.-L., Tie L. Current strategies and progress for targeting the “undruggable” transcription factors. *Acta Pharmacol Sin*. 2022;43(10):2474-2481. doi 10.1038/s41401-021-00852-9

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 07.02.2025. После доработки 08.04.2025. Принята к публикации 17.04.2025.

doi 10.18699/vjgb-25-83

Кариологическая дифференциация среди сортов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), контрастных по селекционному статусу и типу развития

А.Ф. Мутерко ¹, Е.Д. Бадаева ², Е.В. Зуев ³, Е.А. Салина ¹¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия³ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия muterko@gmail.com, muterko@bionet.nsc.ru

Аннотация. На протяжении многих лет оценка внутривидовой изменчивости пшеницы не теряет своей актуальности. Хотя большинство современных сортов пшеницы относят к чистолинейным, гетерогенность сортовых популяций выступает одним из механизмов поддержания популяционного гомеостаза. Возможно, высокая эволюционная стабильность конститутивного гетерохроматина и его устойчивое распределение на хромосомах позволяют эффективно использовать кариологический анализ не только для исследования генезиса и таксономии рода *Triticum* L., но и для изучения внутривидового разнообразия пшеницы. В этой связи проведена классификация 87 российских сортов мягкой пшеницы различного селекционного статуса (староместные и современные сорта) и типа развития (яровые и озимые) на основании оценки кариограмм, выполненной с использованием двух подходов. Первый подход основан на качественной оценке кариограмм по распределению гетерохроматиновых С-блоков на хромосомах. Мы также предположили, что количественная оценка кариограмм по размеру индивидуальных С-блоков (второй подход) сделает классификацию сортов более адекватной. Исследовались вариабельность, информативность и разрешающая способность диагностических признаков, тенденции в группировании сортов, а также их ассоциации с селекционным статусом и типом развития. Результаты выявили высокий потенциал С-окраски в дискриминации современных сортов мягкой пшеницы по типу развития и обособлении их озимых форм от местных культур. Гомогенность современных сортов по тестируемым кариологическим признакам была выше, чем староместных, а озимых – чем яровых. Полученная классификация отражает сохранение высокой общности в кариограммах современных яровых культур и сортовых популяций местного возделывания, а также слабую различимость кариограмм староместных сортов, контрастных по типу развития. Сравнительный анализ классификаций 20 выборочных сортов по данным С-окрашивания и ОНП-генотипирования (3126 полиморфных маркеров) предполагает, что изучение кариотипической изменчивости помогает составить более верное представление о дифференциации сортовых совокупностей пшеницы по селекционному статусу, чем при использовании ОНП-маркеров, детектирующих генную изменчивость, особенно при ограниченном количестве диагностических признаков.

Ключевые слова: мягкая яровая и озимая пшеница; староместные и современные сорта; селекция; кариологический анализ; кариосистематика; С-окраска хромосом

Для цитирования: Мутерко А.Ф., Бадаева Е.Д., Зуев Е.В., Салина Е.А. Кариологическая дифференциация среди сортов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), контрастных по селекционному статусу и типу развития. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(6):753-768. doi 10.18699/vjgb-25-83

Финансирование. Кариотипирование сортов пшеницы выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-76-30003-П). Кариосистематика проведена в рамках бюджетного проекта FWNR-2022-0017.

Karyological differentiation among bread wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) with distinct breeding statuses and growth habits

A.F. Muterko ¹, E.D. Badaeva ², E.V. Zuev ³, E.A. Salina ¹¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia² Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia³ Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia muterko@gmail.com, muterko@bionet.nsc.ru

Abstract. The assessment of intraspecific variability of wheat has been relevant for years. Although most modern wheat cultivars are considered to be pure lines, the heterogeneity of varietal populations is one of the mechanisms for maintaining population homeostasis. It is possible that the high evolutionary stability of constitutive heterochromatin and

its stable distribution within chromosomes will allow us to use karyological analysis not only for studying the genesis and taxonomy of *Triticum* L., but also for studying the intraspecific diversity of wheat. In this regard, a classification of 87 Russian cultivars of common wheat differing in breeding status (landraces and modern cultivars) and growth habit (spring and winter) was carried out using two alternative approaches for assessing karyograms. The first approach uses the qualitative assessment of karyograms based on the distribution of C-bands on chromosomes. We also proposed that quantification of karyograms based on the size of C-bands would make the classification of cultivars more adequate. The variability, informative value and resolution of diagnostic features, trends in grouping cultivars, and their associations with the breeding status and growth habit were studied. A high potential of karyotyping with C-banding in discriminating modern cultivars by growth habit, as well as in separating winter cultivars from landraces has been revealed. In terms of the tested karyological features, the homogeneity of modern cultivars was higher than that of local cultivars, and the homogeneity of winter wheat was higher than that of spring wheat. The obtained classification reflects the preservation of high similarity in the karyograms of modern spring cultivars and landraces, as well as the low distinguishability between the karyograms of landraces differing in growth habit. A comparative analysis of the classifications of 20 cultivars using C-banding and SNP genotyping (3,126 polymorphic markers) suggests that studying the karyotypic variability allows us to infer a more accurate differentiation of wheat varietal populations based on the breeding status than using SNP markers that detect genetic variability, especially when the number of diagnostic features is limited.

Key words: common winter and spring wheat; modern and local cultivars; landrace; breeding; karyological analysis; karyosystematics; C-banding

For citation: Muterko A.F., Badaeva E.D., Zuev E.V., Salina E.A. Karyological differentiation among bread wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) with distinct breeding statuses and growth habits. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Genet Breed.* 2025;29(6):753-768. doi 10.18699/vjgb-25-83

Введение

Возделывание мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. ($2n = 6x = 42$, BBAADD) в различных эколого-географических регионах при ее исключительно широком распространении привело к накоплению структурных, генетических и физиологических изменений и возникновению огромного разнообразия внутривидовых форм (Zohary et al., 2012; Zhao et al., 2023). В этой связи актуальным представляется исследование изменчивости пшеницы в пределах вида. Хотя большинство современных сортов пшеницы относят к чистолинейным, неотъемлемая гетерогенность сортовых популяций выступает одним из механизмов поддержания популяционного гомеостаза (Фадеева, Нарбут, 1969; Kudriavtsev, 2006; Serpolay-Besson et al., 2011), что приводит к плохо воспроизводимым результатам при их дифференциации (Kudriavtsev, 2006; Metakovskiy et al., 2024). Высокая эволюционная стабильность гетерохроматиновых блоков, а также их устойчивое распределение на хромосомах создают предпосылки для успешного применения хромосомных маркеров при решении подобных задач.

Ранее кариологический анализ успешно зарекомендовал себя в изучении генезиса и таксономии пшеницы в пределах рода (Iordansky et al., 1978a, b; Zurabishvili et al., 1978; Badaeva et al., 1986, 1994, 2007, 2015a, 2022; Gill et al., 1991; Jiang J. et al., 1993, 1994; Friebe, Gill, 1996; Dedkova et al., 2004, 2007, 2009), однако правомочность и перспективность его применения в оценке популяционной изменчивости этой культуры останутся предметом обсуждений. Во многом это обусловлено как достаточно высокой трудоемкостью кариологического анализа, так и сложностью описания кариотипа сорта в форме, доступной для статистической обработки. Так, кариограмма хромосом модельного сорта Chinese Spring служит стандартом при описании делеционных линий (Endo, Gill, 1996) и составлении физических карт хромосом (Delaney et al., 1995; Mickelson-Young et al., 1995), но в связи с отсут-

ствием ряда С-блоков, присутствующих у других видов или сортов пшеницы, она не может быть напрямую использована для характеристики внутривидового полиморфизма. В то же время, хотя многие авторы отмечают широкое разнообразие рисунков дифференциального окрашивания хромосом мягкой пшеницы (Iordansky et al., 1978a; Zurabishvili et al., 1978; Seal, 1982; Friebe, Gill, 1994), приводимые ими кариограммы непригодны для статистической обработки и анализа структуры популяций.

Совершенствование метода флуоресцентной гибридизации *in situ*, разработка системы олигонуклеотидов существенно упростили и удешевили проведение анализа и сделали возможным исследование больших выборок (Jiang M. et al., 2017; Huang et al., 2018; Guo et al., 2019; Hu et al., 2022). При этом оценка частоты и распределения полиморфных вариантов служила для выделения групп родственных сортов (Huang et al., 2018; Guo et al., 2019; Hu et al., 2022). Иной подход – «хромосомная паспортизация», основанная на сравнении кариотипа конкретного образца с обобщенной видовой идиограммой (Badaeva et al., 1990). В отличие от рассмотренного ранее подхода, диагностическим признаком здесь выступает индивидуальный блок конститутивного гетерохроматина (С-блок). Впервые этот подход был использован для оценки разнообразия пшеницы-спельты (Dedkova et al., 2004) и европейской группы полбы (Dedkova et al., 2009), а полученная с его помощью структура популяций *T. dicoccum* хорошо соответствовала существующей таксономической группировке видов (Гончаров, 2012; Badaeva et al., 2015b). Структура популяции *T. araraticum*, выявленная с помощью хромосомного анализа (Badaeva et al., 2022), полностью соответствовала данным молекулярно-генетического исследования тех же образцов, выполненного с использованием SSAP-маркеров.

В зависимости от селекционного статуса различают староместные (местные) и современные сорта пшеницы. Местные сорта-популяции локально адаптированы, они

традиционно возделываются на изолированных территориях, а их семеноводство осуществляется без преднамеренной гибридизации и целенаправленного изменения генотипа (Zeven, 1998). Тем не менее генетическое разнообразие местных пшениц поддерживалось возделыванием смеси из разных генотипов или часто даже смеси разных культур, что создавало возможность обмена генетическим материалом между растениями (Zeven, 1980, 1998; Feldman, 2001). Переход к научно обоснованной селекции мягкой пшеницы с целенаправленным подбором родительских генотипов, интрогрессией чужеродных генов, использованием мутагенеза произошел в конце XIX—начале XX в. (Feldman, 2001). Поскольку при создании сортов часто привлекались образцы из географически разобщенных популяций, а также представители родственных таксонов (Mujeeb-Kazi et al., 2013; Sharma M. et al., 2020; Sharma S. et al., 2021; Boehm, Cai, 2024), не исключена возможность образования качественно новых, специфических кариотипов, изолированно поддерживаемых в пуле селекционных сортов. Данное обстоятельство актуализирует оценку потенциала кариологического анализа в дифференциации и классификации сортовых совокупностей пшеницы.

Взаимосвязь между кариотипом сорта и его происхождением имеет естественные основания, поэтому принципиально важно тестировать ассоциации кариотипа и с другими, менее очевидными, но существенными в его формировании факторами. Одним из таких факторов является климатический режим региона возделывания, оказывающий непосредственное влияние на формирование типа развития пшеницы. Так, озимые сорта высевают до наступления зимних холодов, поддерживающих процесс яровизации в условиях низкой температуры и сокращенного фотопериода. Их вегетация продолжается с наступлением теплого периода года, и выколашиваются они раньше яровых культур, которые весной только высевают. Таким образом, разница в сроках колошения озимых и яровых культур может быть одним из механизмов репродуктивной изоляции при формировании специфических признаков кариотипов у сортов с альтернативным посевным сезоном. Исследования подобного рода, однако, нам неизвестны.

В настоящей работе определяется потенциал кариотипирования по конституционному гетерохроматину (С-окраска) в дискриминации сортовых популяций мягкой пшеницы российской селекции. Исследуется соотношение полученной классификации с селекционным статусом (староместные и современные) и типом развития сортов (озимые и яровые). Тестируются два подхода в извлечении диагностических признаков. Первый подход основан на качественной оценке кариограмм по распределению гетерохроматиновых С-блоков на хромосомах. Мы также предположили, что количественная оценка кариограмм по размеру индивидуальных С-блоков (второй подход) делает классификацию сортов более адекватной. Обсуждаются преимущества и недостатки карисистематики сортовых популяций в сравнении с генотипированием, основанным на однонуклеотидном полиморфизме (ОНП-генотипирование).

Материалы и методы

Растительный материал. Кариологический анализ проведен на 87 сортах мягкой пшеницы из разных регионов России. Образцы представлены произвольными выборками из 44 староместных (выведенные путем отбора из местных популяций и поступившие в коллекцию ВИР или районированные на территории СССР до 1940 г.) и 43 современных сортов (созданные после 1940 г. с участием гибридизации, в том числе отдаленной), содержащими равные фракции яровых и озимых форм (Приложение, табл. S1)¹.

Кариологический анализ. Для получения и окрашивания хромосомных препаратов применялась стандартная методика С-бэндинга (Badaeva et al., 1994). Хромосомы классифицировали в соответствии с генетической номенклатурой (Gill et al., 1991). Оценка кариограмм была выполнена с использованием двух подходов. Качественная оценка основана на дискриминации типов хромосом по наличию С-блоков, обозначенных на референсной кариограмме. Количественная оценка предполагала визуальное определение размера С-блоков по шестибальной шкале (от 0 до 5) в соответствии с предложенными ранее рекомендациями (Badaeva et al., 1990). Для этого хромосомы конкретного сорта сравнивали с обобщенной видовой идиограммой и каждому выявленному блоку присваивали номер от 0 до 5 в зависимости от размера: 1 – мелкий, 2 – небольшой, но четко видный, 3 – средний, 4 – крупный, 5 – очень крупный. Если в какой-либо позиции блок отсутствовал или был едва различим, ему присваивали значение «0». Константные блоки, не варьирующие по размеру, из анализа исключались.

Анализ данных. Кластерный анализ проведен методами иерархической кластеризации и К-средних на евклидовых дистанциях, рассчитанных по исходным бинарным данным. Анализ методом К-средних выполнен на стандартизированной (центрированной и шкалированной) матрице дистанций. В определении оптимального количества кластеров для инициализации алгоритма К-средних использована статистика разрыва (функция *fviz_nbclust*, пакет *Rfactoextra*). Визуализация кластеров на плоскости проведена методом многомерного шкалирования исходной бинарной матрицы (функция *cmdscale*, пакет *Rstats*) (Becker et al., 1988).

Выбор метода агломеративной иерархической кластеризации осуществлялся среди восьми алгоритмов, имплементированных в функции *hclust* (пакет *Rstats*) с использованием следующих подходов. 1. Эмпирическая оценка метода основывалась на его способности разделять сорта по рассматриваемым признакам (селекционный статус, тип развития и их комбинация). Поскольку наибольшее количество состояний признака равно четырем (четыре варианта комбинаций селекционного статуса с типом развития), проводился срез тестируемой топологии на четыре кластера объемом не менее трех сортов. В каждом кластере подсчитывалось количество сортов с одинаковым состоянием признака и отбиралось наибольшее, затем эти значения суммировались по всем кластерам. 2. Для оцен-

¹ Табл. S1–S6 и рис. S1–S11 Приложения см. по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx25.pdf>

ки бережливости кладограммы, выраженной наименьшим количеством изменений, объясняющих ее топологию, применялся алгоритм Фитча, имплементированный в функции *parsimony* из пакета *R phangorn* (Schliep, 2011).

Кладограммы рассчитаны функцией *hclust* и визуализированы с использованием *R* пакета *dendextend* (Galili, 2015). Оценка сохранения клад на дендрограмме, поддержка их монофилии проведены методом бутстрэп (Felsenstein, 1985) с 1000 итераций, имплементированным в функции *boot.phylo* из *R* пакета *ape* (Paradis, Schliep, 2019). Запутанность топологий рассчитана с помощью функции *untangle* (*R* пакет *dendextend*) в три раунда методом *random*, и дополнительный раунд методом *step2side*. Топологическая дистанция между дендрограммами (симметричная разница) (Robinson, Foulds, 1987) вычислена функцией *dist.dendlist* (*R* пакет *dendextend*).

Выделение групп сортов из кладограммы осуществляли путем среза ее топологии под заданное число кластеров, используя функцию *cutree* из пакета *R stats* (Becker et al., 1988), центры которых рассчитывали для каждого сорта из матрицы дистанций как среднее значение расстояний между данным сортом и сортами из текущего кластера. Стандартизированные координаты центров кластеров использованы в факторном анализе.

Факторный анализ проведен методом главных компонент, утилизируя тестируемые признаки в качестве добавочных качественных (функция *PCA*, пакет *R FactoMineR*) (Husson et al., 2010). Коэффициенты корреляции Пирсона (r) между добавочными переменными (признаками) и измерениями рассчитывались как квадратные корни из показателей *eta2*, а корреляции между измерениями и значениями этих переменных – как квадратные корни из показателей *cos2*. Предполагая нормальное распределение коэффициентов корреляции (согласно центральной предельной теореме), асимптотические p -значения для $r > 0.40$ при 87 наблюдениях были < 0.01 (мощность = 0.9).

Для множественного корреспондентного анализа была использована функция *MCA* (*R* пакет *FactoMineR*) на исходных бинарных данных, преобразованных в логические уровни. Тестируемые признаки утилизированы в качестве добавочных переменных.

Статистическая значимость предположений о сверхпредставленности оценивалась с помощью точного теста Фишера (функция *fisher.test* из *R* пакета *stats*), с последующей фильтрацией результатов по p -значению ≥ 0.05 .

Логистическая регрессия рассчитана с помощью функции *glm* (*R* пакет *stats*), утилизирующей квазибиномиальную модель с функцией связи *logit*.

Первичные данные ОНП-генотипирования 20 сортов из тестируемой выборки получены из работы (Afonnikova et al., 2024).

Результаты

Результаты кариологической дифференциации 87 российских сортов, а также анализ сопряженности их селекционного статуса и типа развития с полученной классификацией последовательно представлены по двум типам диагностических признаков: тип хромосом и размер С-блоков.

Качественная оценка кариограмм.

Тип хромосом как дифференцирующий признак

Ассоциация типа хромосом с селекционным статусом и типом развития сортов

При использовании типа хромосом в качестве диагностического признака суммарно детектировано 205 уникальных кариограмм для хромосом из геномов А, В и D (рис. S1). Хромосомы 4D и 5D были исключены из анализа, поскольку использованный вариант С-окраски не позволял надежно разделять их полиморфные варианты. Хотя частота встречаемости отдельных типов хромосом сильно варьировала в зависимости от селекционного статуса сортов, их типа развития, а также комбинации этих признаков (рис. S2), между геномами и группами гомеологичных хромосом различий в их распределении по тестируемым признакам не выявлено. В группах сортов с альтернативными проявлениями признаков представлено почти равное количество типов хромосом из каждого генома или гомеологической группы, что указывает на отсутствие смещения в исходных данных. Обнаружено 12 групп ассоциированных типов хромосом, характеризующихся идентичными наборами во всех сортах (табл. S2). В большинстве случаев группы представлены парами, три группы содержали три ассоциированных типа, а одна – четыре.

Для оценки статистической значимости ассоциации типов хромосом с признаками применен точный тест Фишера на сверхпредставленность в выборке сортов, гомогенных по тестируемому признаку (табл. S3). Большинство типов хромосом (144, или 70 %) были неинформативны, поскольку тест на их сверхпредставленность результативал с уровнем значимости альтернативной гипотезы $p \geq 0.05$. Количество сверхпредставленных типов хромосом в современных сортах было больше, чем в староместных сортах идентичного типа развития, при отсутствии разницы между контрастными по тестируемому признакам выборками (рис. 1, а, в).

Аналогичные результаты получены при оценке сверхпредставленности типов хромосом среди озимых и яровых сортов с идентичным селекционным статусом, и наоборот, среди староместных и современных сортов идентичного типа развития (см. рис. 1, б, г). Отсюда следует, что гомогенность современных сортов выше, чем местных, а озимых – чем яровых.

Кластерный анализ сортов по типу хромосом

Кластерный анализ проведен методами иерархической кластеризации и К-средних с целью выбора подхода, дающего наиболее адекватно интерпретируемое представление о дифференциации сортов по тестируемому признакам.

Согласно статистике разрыва, оптимальное количество кластеров, на которые разбивается выборка сортов алгоритмом К-средних, соответствует трем. Хотя визуализация кластеров на плоскости главных координат подтверждает хорошее разрешение между ними (рис. 2, а), высокой гомогенностью по рассматриваемым признакам отличался только третий кластер (см. рис. 2, б). В него вошел 21 исключительно современный сорт преимуще-

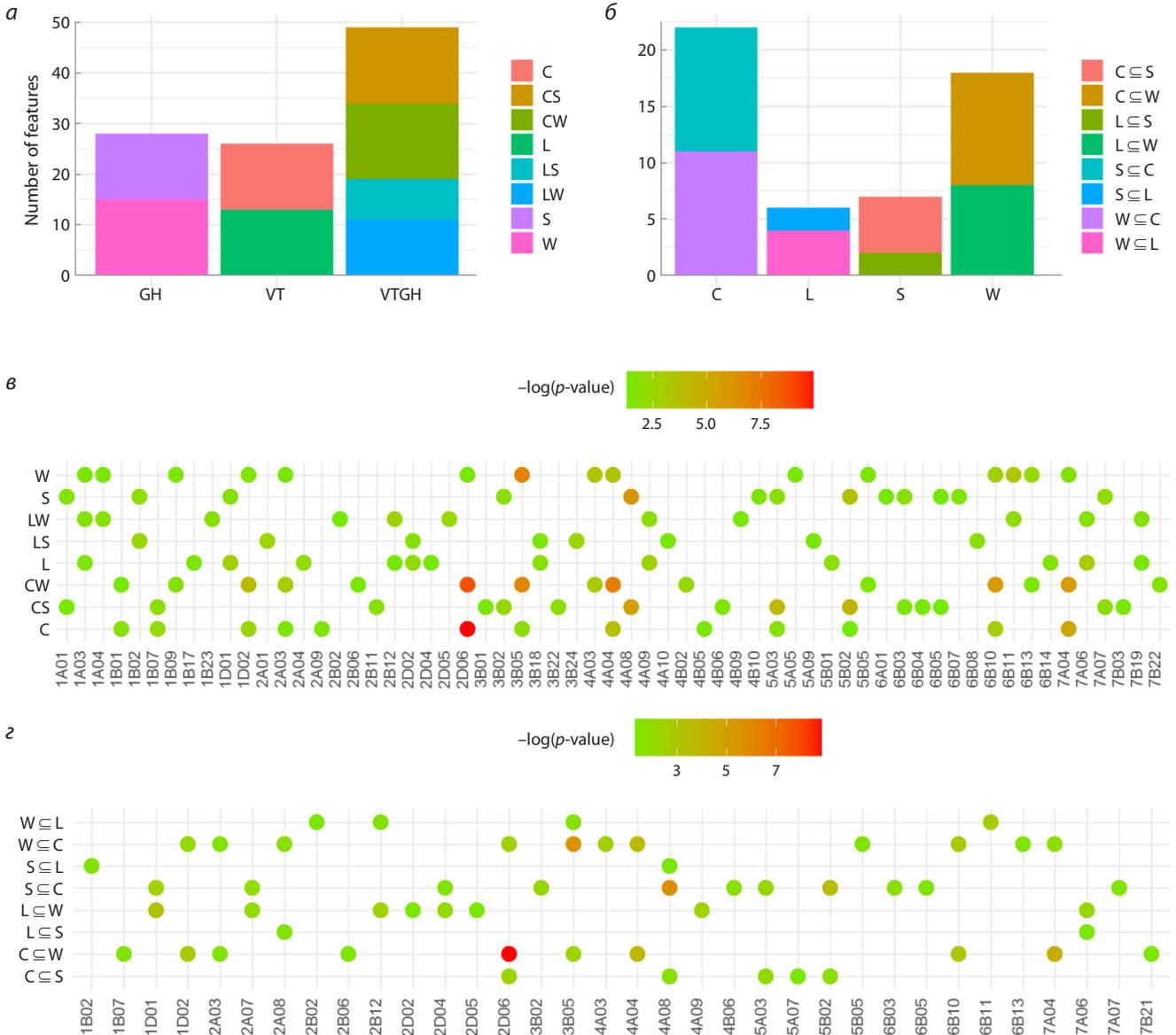


Рис. 1. Ассоциация типа хромосом с селекционным статусом и типом развития сортов.

Количество типов хромосом, ассоциированных с селекционным статусом (VT), типом развития (GH) и комбинацией этих признаков (VTGH) в общей выборке (а) и среди озимых (W) и яровых (S) староместных (W⊆L, S⊆L) и современных (W⊆C, S⊆C) сортов, и наоборот, среди местных (L) и современных (C) культур яровой (L⊆S, C⊆S) и озимой (L⊆W, C⊆W) пшеницы (б). Значения $p < 0.05$ теста на сверхпредставленность в выборке сортов, гомогенных по тестируемому признаку, из генеральной совокупности (в) и подвыборок (д).

ственно озимого типа развития (20 сортов). Первый кластер содержал 30 сортов с преобладанием староместных (27 сортов), одинаково представленных по типу развития (16 озимых и 14 яровых). Второй кластер, состоящий из 36 сортов, был наиболее гетерогенным (см. рис. 2, б).

Важно отметить, что по итогам проведенного анализа выборка сортов оптимально разделилась на три кластера, а не на ожидаемые четыре, как это предполагалось по числу рассматриваемых контрастных проявлений признаков (староместные/современные, озимые/яровые или их комбинации), и что современные сорта разделились по типу развития с отделением большей части озимых (87%), тогда как местные культуры не различимы по данному признаку. При этом CS группируются со староместными

сортами и большей частью сосредоточены во втором кластере, с преобладанием местных яровых культур.

Выбор метода агломеративной иерархической кластеризации осуществлялся эмпирически, согласно наилучшему разделению сортов по рассматриваемым признакам, а также по наименьшему количеству изменений, объясняющих тестируемую топологию (табл. S4). Оба подхода предсказывают наилучший результат для топологии кладограммы, рассчитанной методом Варда, с учетом критерия кластеризации (метод “ward.D2”).

На дендрограмме сортов две мажорные клады, характеризующиеся наибольшим удалением друг от друга, разделяют озимые сорта современной селекции (22 из 23) и остальные группы (см. рис. 2, в). Более 70% диспер-

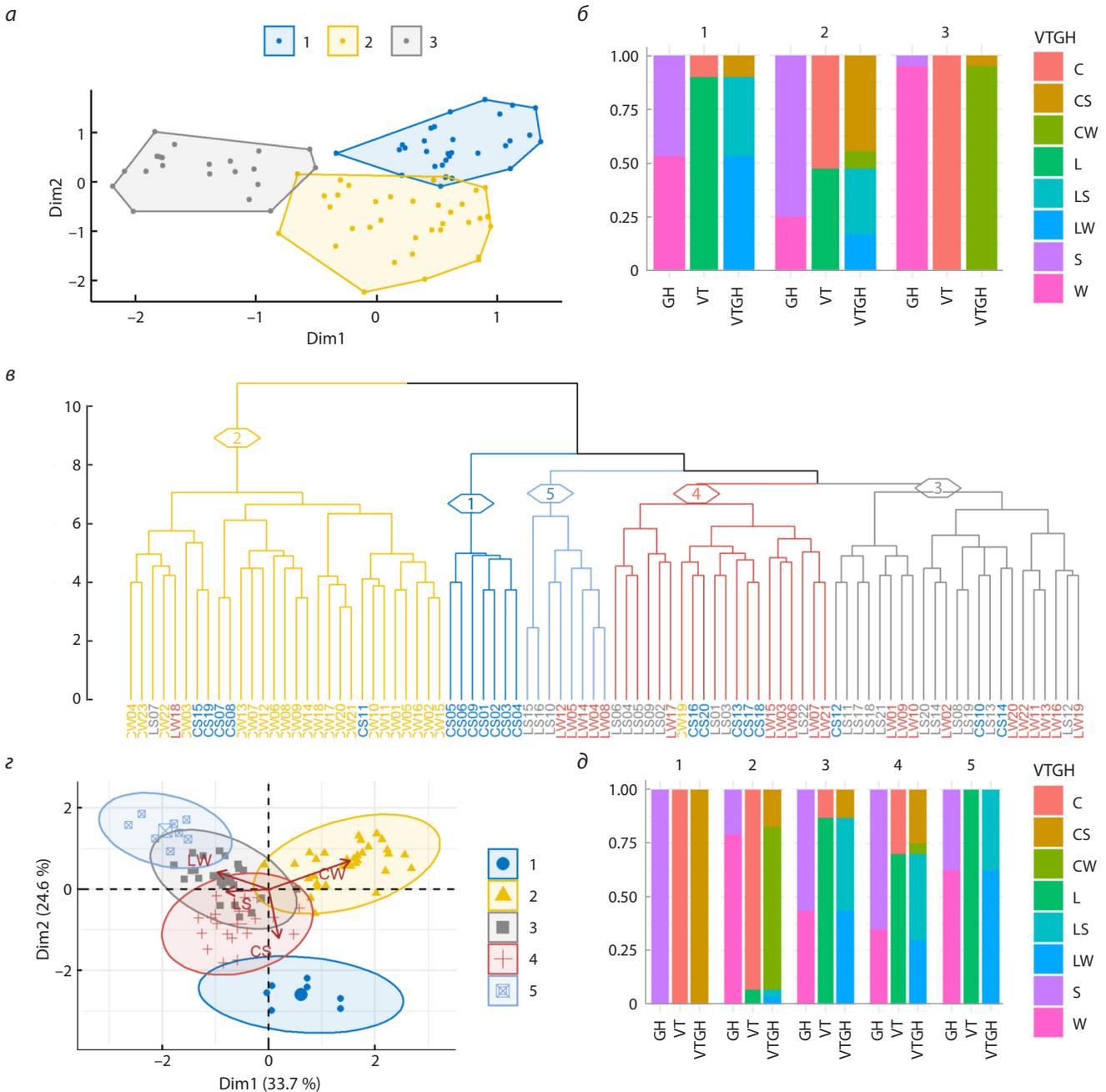


Рис. 2. Кластерный анализ сортов по типу хромосом.

a – визуализация кластеров, рассчитанных методом К-средних на плоскости главных координат; *б* – фракции сортов (W – озимые, S – яровые, L – староместные, C – современные) с альтернативными проявлениями тестируемых признаков в этих кластерах; *в* – дендрограмма иерархической кластеризации сортов, вычисленная методом Варда. Для наглядности цветом выделены первые пять кластеров с их представлением на плоскости главных факторов (*г*) и соответствующими фракциями сортов с альтернативным проявлением тестируемых признаков (*д*).

сии в средних дистанциях между сортами и мажорными кладами объясняется данным разделением, а именно выделением CW в отдельный кластер. При дальнейшей обрезке топологии выделяются небольшая группа из семи CS и крупный кластер, объединяющий почти все староместные образцы (42 из 44). Совершенно однородный кластер CS (кластер 1), хотя и характеризуется намного большим удалением как от староместных (кластер 3), так и от современных озимых сортов (кластер 2) по сравнению с удалением последних двух друг от друга, сильнее тяготеет

к группе сортов преимущественно местного возделывания (суммарная длина ветвей между кластерами 1 и 3 в 2.4 раза короче, чем между кластерами 1 и 2), среди которых уже насчитывается 40 % от CS (см. рис. 2, *д*). Эта тенденция более наглядно отражена на плоскости главных факторов тяготения сортов к кластерам (см. рис. 2, *г*). Здесь первый фактор положительно коррелирует с входением сорта в кластер 2 ($r = 0.85$), а второй фактор отрицательно коррелирует с входением сорта в кластер 1 ($r = -0.94$). На графике главных компонент большая часть CS (75 %)

локализована в отрицательных координатах первого измерения. CS высоко коррелируют со вторым измерением ($r = 0.98$), корреляция с которым также более выражена у LW ($r = 0.63$) и LS ($r = 0.31$), чем у CW ($r = 0.13$). Таким образом, мажорная клада из кластеров 1 и 3 объединяет большинство CS со староместными сортами. Примечательно, что в кластере 3 CS группируются с местными культурами преимущественно ярового типа. Можно предполагать, что современные яровые сорта подверглись менее интенсивной селекции, сохранив большую общность кариограмм со староместными сортами. Несмотря на подобие результатов альтернативных подходов кластерного анализа, иерархическая кластеризация дает более адекватно интерпретируемое представление о дифференциации сортов. Поддержка монофилии большинства клад была низкой, однако статистически достоверной (9.3–99.3 %) для всех клад высшего ранга (рис. S3).

Оптимизация длины ветвей (кофенетических дистанций между сортами) текущей топологии дендрограммы методом максимизации правдоподобия привела к сжа-

тию кластеров и лучшему их разрешению на плоскости главных координат (рис. S4). Логарифм правдоподобия ($\log\text{Lik}$) при этом возрастает от -12355 до -4115 . В этой системе более убедительным, но по-прежнему несовершенным становится разделение сортов по селекционному статусу, тогда как по типу развития староместные сорта полностью сливаются, но расщепление современных сортов по данному признаку усиливается.

Корреспондентный анализ сортов по типу хромосом

Распределение сортов на плоскости первых двух измерений представлено на рис. 3, а. Фракция объяснимой дисперсии равномерно распределена между главными измерениями (3.7 и 3.6 % соответственно). Однако целью настоящего корреспондентного анализа является не оценка вклада отдельных типов хромосом в распределение сортов, а исследование взаимосвязи между этим распределением и тестируемыми признаками, представленными здесь добавочными качественными переменными, исходя из их корреляций с измерениями.

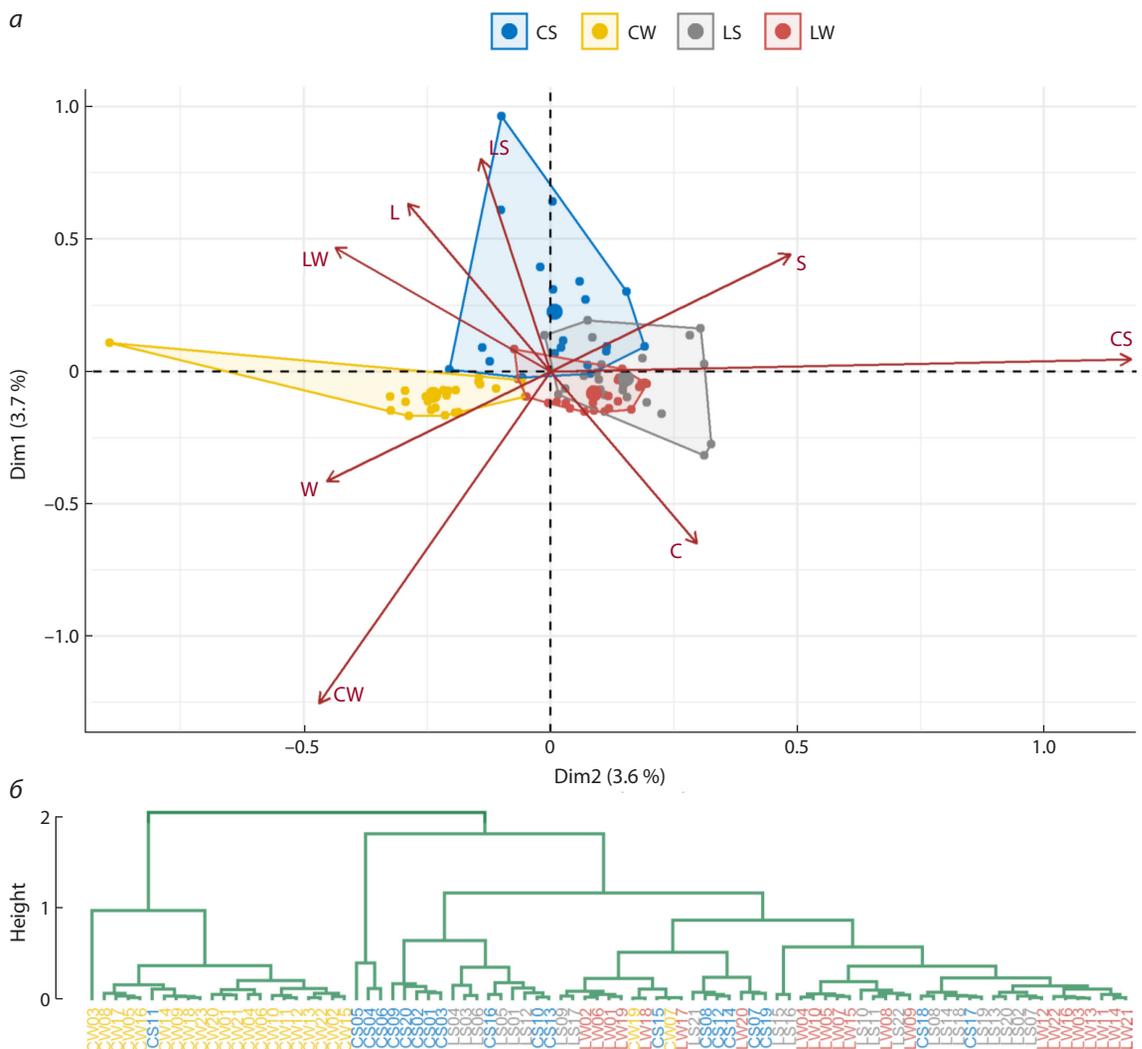


Рис. 3. Корреспондентный анализ сортов по типу хромосом.

а – распределение сортов (W – озимые, S – яровые, L – староместные, C – современные) на плоскости первых двух главных измерений; б – дендрограмма, вычисленная по координатам сортов на плоскости главных измерений.

Первое измерение высоко коррелирует с признаком, объединяющим селекционный статус и тип развития сортов ($r = 0.66$), при этом в большей степени с их типом развития ($r = 0.47$), чем с селекционным статусом ($r = 0.29, p > 0.14$). Со вторым измерением тоже наилучшим образом коррелирует признак, объединяющий селекционный статус и тип развития сортов ($r = 0.80$), но, в отличие от первого измерения, преимущественно за счет селекционного статуса ($r = 0.64$), а не типа развития ($r = 0.43$). Таким образом, тип развития в равной степени коррелирует с обоими измерениями, тогда как корреляции признака «селекционный статус сортов» с главными измерениями различаются более чем в два раза. Кроме того, признак, объединяющий селекционный статус и тип развития, сильнее тяготеет к разделению сортов по селекционному статусу (корреляция со вторым измерением на 21 % больше, чем с первым), т. е. разделение сортов скорее обусловлено их селекционным статусом, чем типом развития. Характерно, что тенденция к группированию по селекционному статусу наиболее выражена для CW ($r = 0.75$ со вторым измерением) и LS ($r = 0.47$ со вторым измерением), но не для CS ($r = 0.03 [p > 0.89]$ со вторым измерением). Корреляции CW и LS с типом развития настолько малы ($r = 0.28$ и $r = 0.08$ с первым измерением), что статистически незначимы ($p > 0.17$ и 0.87), в отличие от CS ($r = 0.64 [p < 1e-4]$ с первым измерением). Староместные озимые культуры (LW) одинаково слабо и статистически незначимо коррелировали с обоими измерениями ($r = 0.27$ и $0.25 [p > 0.20]$ со вторым и первым измерением соответственно). Таким образом, расщепление выборки детектируется только среди современных сортов, но не староместных. При этом выделение CW обусловлено главным образом их селекционным статусом, фактором селекции (искусственным отбором), который не сказывается, однако, на распределении CS.

На плоскости главных измерений можно также видеть, как хорошо различаются по типу развития современные сорта (площади кластеров озимых и яровых образцов не перекрываются) и насколько плотно слиты по этому же признаку староместные культуры. За исключением CW03, сорта CW наиболее гомогенны ($KB = 0.42$), они образуют компактную группу, в которой можно выделить плотное ядро из семи сортов (CW02, CW09, CW14, CW15, CW18, CW21, CW23). Староместные образцы тоже сгруппированы относительно компактно ($KB = 0.89$), тогда как CS формируют наиболее диффузный кластер ($KB = 1.02$) и, следовательно, наиболее гетерогенны.

Ввиду обнаружения новых факторов, выявляющих скрытые тенденции в распределении сортов, выполнен сравнительный анализ их иерархической кластеризации. В этой связи координаты сортов на плоскости главных измерений утилизированы для расчета матрицы дистанций и кластеризация сортов проведена с использованием аналогичного метода расчета топологии, что и на оригинальных данных (метод Варда). В новом варианте кладограммы (см. рис. 3, б), несмотря на полную перестройку топологии (запутанность топологий 97 %, топологическая дистанция 166 ветвей), значительно улучшилось разделение современных сортов. В частности, кластер CW стал более гомогенным. Из него полностью исключены староместные сорта и все яровые, кроме CS11; выделился об-

разец CW03, несущий три хромосомные интрогрессии от *T. miguschovae*, а CW07 перешел в кластер староместных сортов. Кластер CS расщепился, но сорта по-прежнему группируются с местными культурами преимущественно ярового типа. Изменились также дистанции между сортами, при этом их корреляция сохранилась на высоком уровне ($r = 0.80, p < 1e-5$).

Количественная оценка кариограмм.

Размер С-блоков как дифференцирующий признак

Ассоциация С-блоков с селекционным статусом и типом развития сортов

В ходе количественной оценки кариограмм по размеру С-блоков было выделено 98 диагностических категорий (рис. S5). Оценка ассоциации С-блока с тестируемым признаком проведена с помощью логистической регрессии, в ходе которой рассчитывалась статистическая значимость повышения шансов обнаружения С-блока в сортах с конкретным состоянием тестируемого признака при увеличении его размера на единицу.

При оценке отношения шансов детекции С-блоков в сортах, различающихся по селекционному статусу, статистически значимые результаты ($p < 0.05$) получены по 22 С-блокам, при этом количество детектирующихся С-блоков более выражено в староместных сортах и было в 1.4 раза больше, чем в современных. Этот же анализ выявил 27 С-блоков, ассоциированных с типом развития пшеницы, большая их часть (60 %) отождествлялась с озимым типом (табл. S5). Аналогично среди как озимых, так и яровых сортов преобладало количество С-блоков, ассоциированных со староместными сортами, а количество С-блоков, ассоциированных с озимым типом развития, было больше по сравнению с яровым типом и среди современных, и среди староместных сортов (рис. 4, а). Однако в современных сортах идентифицировано вдвое больше С-блоков, ассоциированных с альтернативными типами развития, чем в староместных, а в озимых детектировано большее количество С-блоков, ассоциированных с альтернативным селекционным статусом, чем в яровых. Это же было справедливо при тестировании ассоциации С-блоков с комбинациями признаков (см. рис. 4, а).

Полученные результаты полностью согласуются с ассоциацией тестируемых признаков с типом хромосом (см. рис. 1), подтверждая более высокую гомогенность современных сортов, чем староместных, а озимых, чем яровых, также и при количественной оценке кариограмм. Однако при сопоставлении староместных и современных сортов, безотносительно их типа развития или в подвыборках его альтернативных состояний, в местных культурах высокая вероятность обнаружения существует для большего количества С-блоков. Отмеченная же выше гомогенность выборки современных сортов при тестировании комбинации признаков достигается за счет увеличения фракции нуль-аллелей (вероятность отсутствия С-блока на хромосоме, $oddFC < 1$), а в случае тестирования подвыборок из современных и староместных культур – за счет лучшей дифференцированности кариограмм современных сортов, различающихся по типу развития. Таким образом, подтверждается не только большая разобщенность яровых и

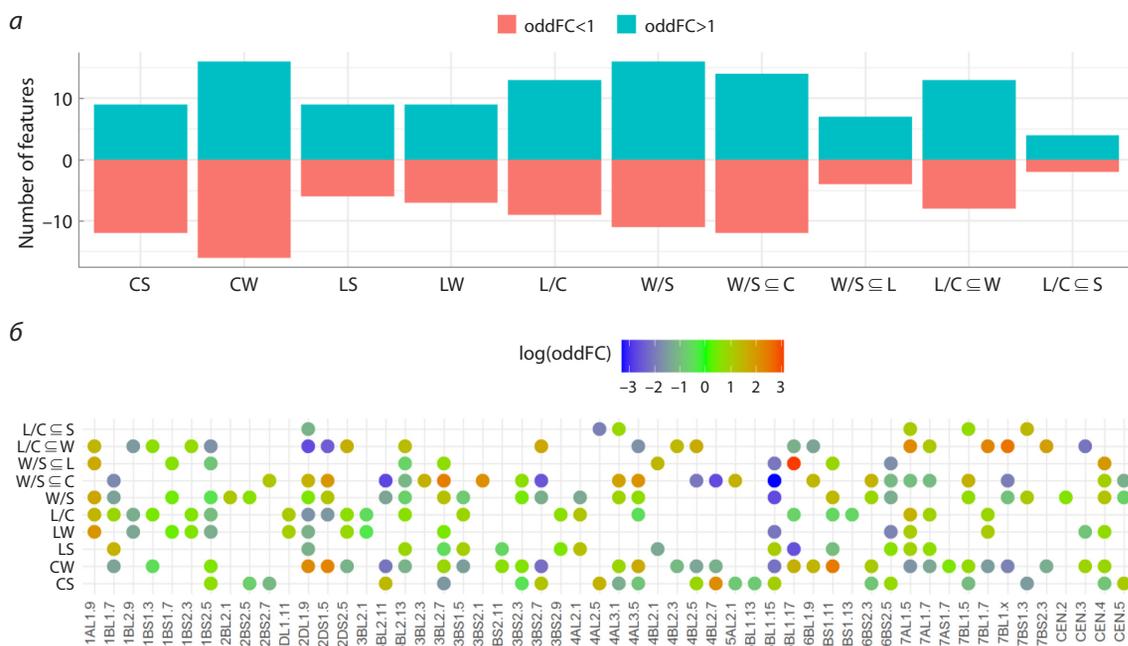


Рис. 4. Ассоциация С-блоков с селекционным статусом и типом развития сортов.

а – количество С-блоков, ассоциированных с селекционным статусом, типом развития и комбинацией этих признаков, в общей выборке и в подвыборках озимых (W), яровых (S), староместных (L) и современных (C) сортов, а также среди озимых и яровых форм староместных (W ⊆ L, S ⊆ L) и современных (W ⊆ C, S ⊆ C) сортов, и наоборот, среди местных и современных культур яровой (L ⊆ S, C ⊆ S) и озимой (L ⊆ W, C ⊆ W) пшеницы. *б* – мультипликативный фактор отношения шансов встречаемости С-блока (oddFC) в выборке сортов, гомогенных по тестируемому признаку, из генеральной совокупности и подвыборок.

озимых форм в пуле современных сортов по сравнению со староместными, но и способность ее выявления в ходе ассоциативного анализа при количественной оценке кариограмм, в отличие от качественной.

Надо отметить, что степень ассоциации (мультипликативный фактор отношения шансов) была выше для большей части С-блоков, ассоциированных с CW (см. рис. 4, б). Таким образом, большинство С-блоков (их присутствие или отсутствие), ассоциированных с современными сортами или озимым типом развития, специфичны для CW. Следовательно, современные сорта озимой селекции обладают вдвое большим набором специфических кариологических признаков (С-блоков), которые позволяют выделить их в отдельную группу. Суммарно по всем вышеприведенным вариантам анализа на ассоциацию С-блоков с тестируемыми признаками менее половины (45 %) были неинформативны.

Кластерный анализ сортов по размеру С-блоков

Хотя алгоритм статистики разрыва предсказывает оптимальное разбиение выборки сортов на семь кластеров, лучшее разрешение получено при выделении трех. Но даже в этом случае почти полностью разделяются только два из них (рис. 5, а, б). В одном из этих кластеров преобладают CW (74 %), в него вошли 17 из 23 современных озимых сортов. Другой, наиболее крупный кластер содержит преимущественно староместные сорта (68 %), которые в равной степени представлены по типу развития. Сюда же вошла и большая часть CS (80 %), что подтверждает их тяготение к староместным, а не к современным

сортам. Высокая гетерогенность кластеров по тестируемым признакам делает данный метод кластеризации мало полезным для дифференциации рассматриваемой выборки сортов.

Результаты иерархической кластеризации, выполненной методом Варда (предсказывающий наилучшее разделение сортов по тестируемым признакам и оценку бережливости топологии, табл. S6), в целом (по разделению на мажорные клады) подобны вышеприведенной классификации сортов по типу хромосом, хотя топологии соответствующих дендрограмм совершенно запутаны (до 90 %, топологическая дистанция 144 ветви, рис. S6, S7), и сохранилось только 13 общих клад, которые, впрочем, распутываются на 62 %, но сохраняют топологическую дистанцию в 14 ветвей (рис. S8). В новом варианте следует отметить большую гомогенность клады CW, а также ее разделение на два неравноценных по объему кластера (см. рис. 5, в). Правомерность этого разделения подтверждается высокой сопряженностью размеров ряда С-блоков на хромосомах 1BS и 3BS (рис. S9). Кроме того, CS и LW группируются плотнее и однороднее. Наконец, топология дендрограммы отличалась лучшей поддержкой монофилии клад ($Q3 = 43.5\%$, рис. S10), что следует из лучшей сопряженности диагностических признаков, полученных при количественной оценке кариограмм.

Факторный анализ по размеру С-блоков

Факторный анализ проведен методом главных компонент, с использованием тестируемых признаков в качестве добавочных переменных. На плоскости главных компонент

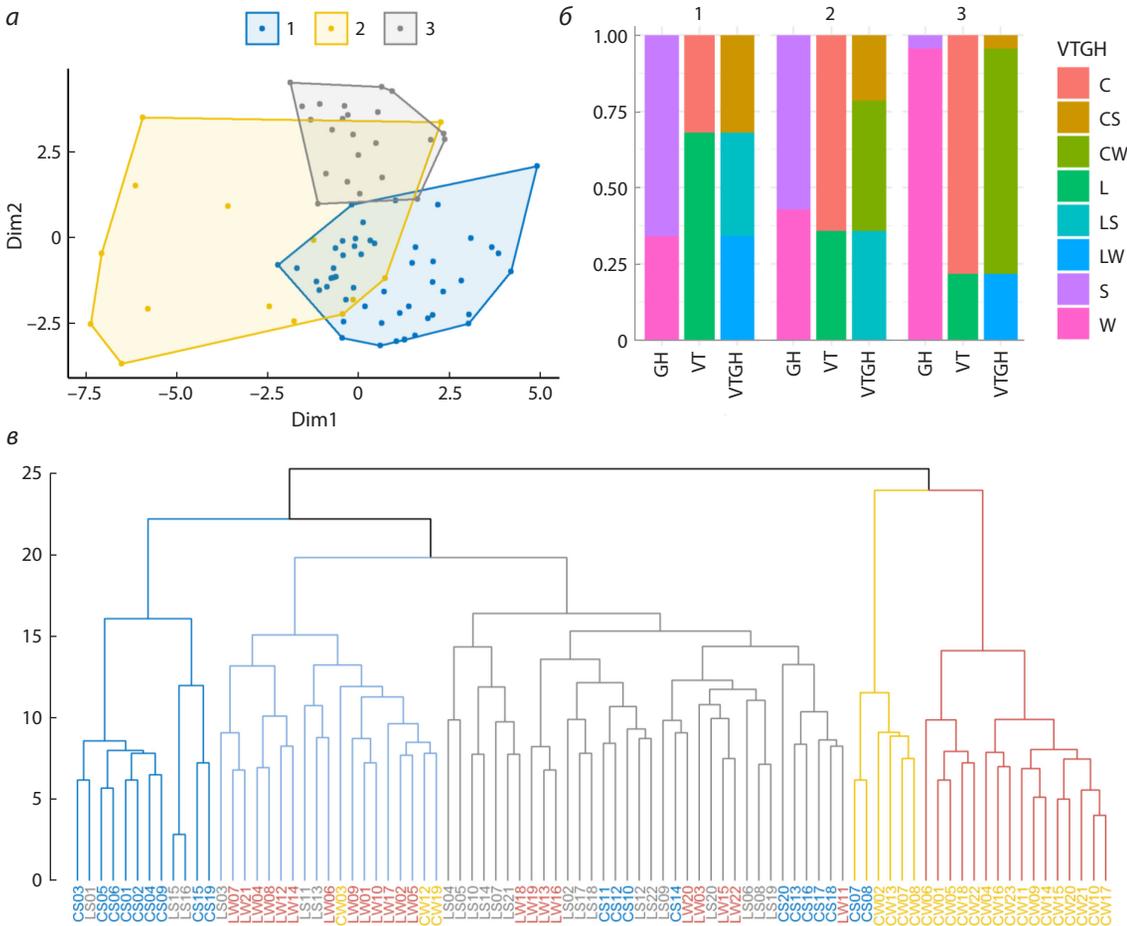


Рис. 5. Кластерный анализ сортов по размеру С-блоков.

a – визуализация кластеров, рассчитанных методом К-средних, на плоскости главных координат; *б* – фракции сортов с альтернативными проявлениями тестируемых признаков в этих кластерах (W – озимые, S – яровые, L – староместные, C – современные сорта); *в* – дендрограмма иерархической кластеризации сортов, вычисленная методом Варда (первые пять клад выделены цветом для наглядности).

(рис. 6, *a*) хорошо отделяются только CW, с плотным ядром из восьми сортов. Яровые современные сорта почти полностью перекрываются с местными культурами, преимущественно тоже яровыми. Это существенно отличается от распределения данных кластеров, наблюдаемого в ходе анализа по типу хромосом, где кластеры яровых сортов альтернативного селекционного статуса перекрывались в значительно меньшей степени. К другой отличительной особенности результатов анализа относится наметившаяся тенденция в разделении староместных культур по типу развития. Наконец, в связи с переходом от бинарной шкалы к шестибалльной изменяется плотность кластеров – они становятся разреженнее, разрешение в разделении сортов возрастает. Доля объяснимой дисперсии, приходящаяся на каждый из факторов, составляет менее 10 %, что подтверждает слабую согласованность диагностических признаков, однако их суммарное значение (18.7 %) в 2.6 раза больше полученного по главным измерениям в ходе корреспондентного анализа сортов по типу хромосом.

Отметим, что в данном анализе интересно не влияние комбинаций признаков (размера С-блоков) на различение

сортов, а выявление тенденций в группировании сортов по тестируемым признакам, которые, впрочем, слабо и статистически незначимо ($p > 0.24$) коррелируют с первым фактором. В этой связи имеет смысл рассмотреть распределение сортов в пространстве, образованном второй и третьей компонентами (см. рис. 6, *б, в*), высоко коррелирующими с тестируемыми признаками. Так, корреляция типа развития максимальна со вторым фактором ($r = 0.71$), в то время как селекционный статус сортов сильнее коррелирует с третьим ($r = 0.57$). Поскольку корреляция с типом развития выше, чем с селекционным статусом, то и разделение сортов по данному признаку значительно лучше ($\text{cos}^2 = 0.78$ для озимого и ярового типа, $\text{cos}^2 = 0.52$ для староместного и современного статуса), в этом заключается очередное отличие от корреспондентного анализа по типу хромосом. Следовательно, кроме отчетливого выделения CW, существует тенденция к разделению сортов по типу развития (см. рис. 6, *в*), которая преобладает над их селекционным статусом (см. рис. 6, *б*), и в особенности это относится к современным сортам. CS сильнее тяготеют к LS, чем CW к LW, в результате староместные сорта группируются плотнее, чем современные. Движе-

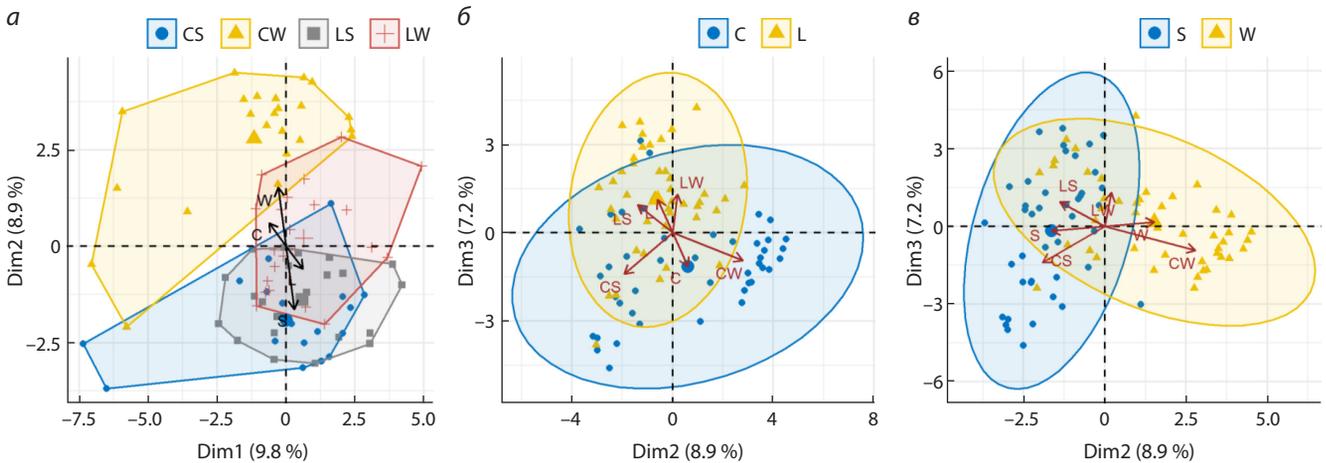


Рис. 6. Факторный анализ по размеру С-блоков.

Распределение сортов представлено на плоскости первых двух (а), а также второго и третьего (б, в) главных факторов. В последнем случае выделены группы сортов (W – озимые, S – яровые, L – староместные, C – современные) с идентичным селекционным статусом (б) и типом развития (в).

ние кластера LW в направлении озимого типа развития (W, положительное направление второго измерения Dim2) смещает направленное перпендикулярно влияние их староместного статуса (L, положительное направление третьего измерения Dim3), в результате данный кластер движется по диагонали (см. рис. 6, а). Интересно отметить влияние современной селекции на обособление озимой пшеницы. На кластер LW селекционный статус оказывает намного более сильное влияние, чем тип развития ($\cos^2 = 0.32$ с Dim3, $\cos^2 = 0.008$ с Dim2), тогда как в кластере CW влияние типа развития преобладает ($\cos^2 = 0.08$ с Dim3, $\cos^2 = 0.74$ с Dim2).

Сравнительный анализ кариологической классификации с ОНП-генотипированием

Для оценки преимуществ и недостатков кариологического подхода в классификации сортов пшеницы сравнительно с ОНП-генотипированием тестировалась их разрешающая способность в дифференциации выборки из 16 озимых культур, контрастных по селекционному статусу, и четырех современных яровых сортов. Анализ проведен по 120 признакам при оценке по типу хромосом, по 88 признакам при количественной оценке кариограмм по размеру С-блоков и по 3126 признакам при ОНП-генотипировании. В последнем случае использованы только однозначно интерпретируемые ОНП-маркеры, исключая гетерозиготы.

При сопоставлении качественного метода оценки кариограмм с ОНП-генотипированием корреляция дистанций между сортами очень низкая ($r = 0.22$, $p > 0.07$), запутанность топологий дендрограмм, вычисленных методом Варда, составляет не менее 40 % при топологической дистанции в 32 ветви. Даже минимальная оценка сохранения монофилии клад, рассчитанных по результатам ОНП-генотипирования (48.7 %), превышала третий квартиль по данному показателю при использовании типа хромосом в качестве диагностических признаков ($Q_3 = 34.5$ %) (рис. 7, а, в). На плоскости главных измерений по типу хромосом полностью разделяются все три группы сортов (см. рис. 7, з). По результатам ОНП-генотипирования сор-

та хорошо разделились только по типу развития, тогда как группа озимой пшеницы не различима по селекционному статусу (см. рис. 7, б). В этой связи кажется очевидным преимущество кариологического анализа по типу хромосом в классификации сортов по селекционному статусу, в силу его большей разрешающей способности при данных критериях дискриминации, несмотря на меньшее количество диагностических признаков и их низкую согласованность.

Применение размера С-блоков в качестве диагностического признака привело к еще большему снижению сходства между дендрограммами, повысив запутанность топологий до более чем 80 % и увеличив топологическую дистанцию до 36 ветвей, с полной утратой корреляции дистанций. В остальном различия между альтернативными подходами в оценке кариограмм по отношению к ОНП-генотипированию сходны с ранее отмеченными особенностями количественного метода: это и лучшая согласованность исходных данных в поддержке монофилии клад ($Q_3 = 56.4$ %, см. рис. 7, д), и выделение CW более разреженным кластером, и пересечение кластеров CS с LW (см. рис. 7, е). Таким образом, независимо от подхода в оценке кариограмм, к существенным отличиям кариологической классификации от ОНП-генотипирования относятся отчетливое обособление современных сортов озимой селекции и тяготение CS к староместным сортам, которое сильнее выражено в классификации по размеру С-блоков.

Обсуждение

Настоящее исследование направлено на оценку потенциала кариологического анализа в дифференциации таких сложных объектов, как сортовые совокупности, на примере отечественных сортов мягкой пшеницы местного возделывания и современных селекционных образцов. В этой связи: 1) протестированы два способа извлечения диагностических признаков из кариограмм на пригодность к дискриминации исходя из пределов их вариабельности (степени полиморфизма), информативности и

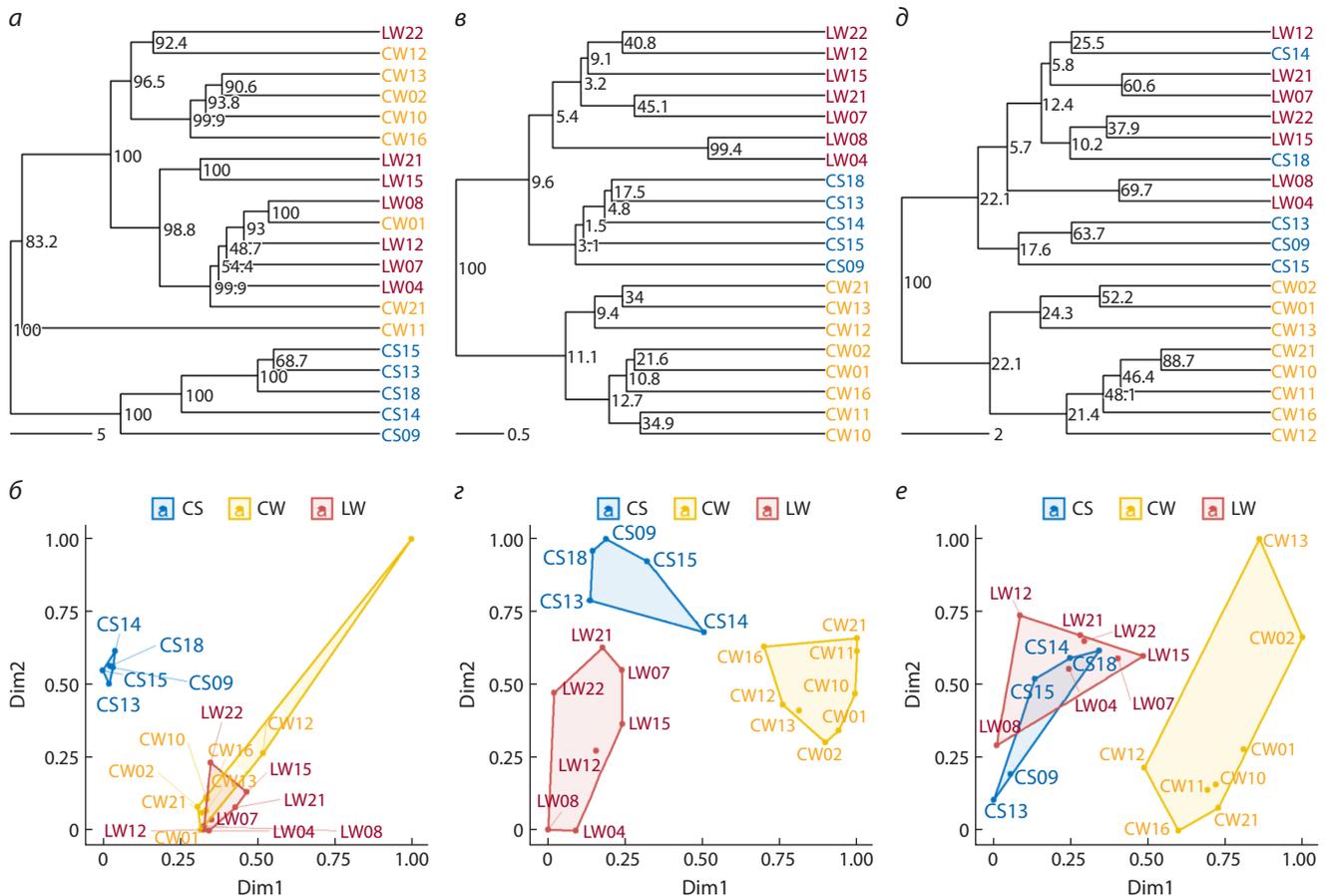


Рис. 7. Сравнительный анализ кариологической классификации с ОНП-генотипированием.

Дендрограммы и распределение сортов (W – озимые, S – яровые, L – староместные, С – современные) на плоскости главных координат представлены по результатам ОНП-генотипирования (а, б), анализу типа хромосом (в, г) и размеру С-блоков (д, е).

разрешающей способности; 2) проведена оценка преимуществ и недостатков данного подхода в сравнении с ОНП-генотипированием; 3) выполнен анализ кариологических классификаций на предмет наличия тенденций в распределении сортов в соответствии с их селекционным статусом и типом развития, а также оценены вклад последних в наблюдаемую кластеризацию и ее статистическая значимость.

В основе используемых диагностических признаков лежит вариабельность блоков конститутивного гетерохроматина. Два альтернативных подхода в ее оценке тестировались на разрешающую способность в дискриминации российских сортов мягкой пшеницы по их селекционному статусу и типу развития. Подход, базирующийся на качественной оценке кариограммы, использует бинарную шкалу, отражающую присутствие/отсутствие С-блока на хромосоме (распределение С-блоков по длине хромосомы). Недостатком этого подхода является то, что хромосомы, различающиеся только по одному С-блоку, будут отнесены к разным типам, при этом разница между ними будет оцениваться так же, как и между хромосомами с существенно различающимися кариограммами. Так, в классификации, основанной на данном методе, образец CW03 с тремя уникальными интрогрессиями от *T. miguschovae*

выделяется отдельной ветвью на дендрограмме и высоко обособливается от остальных сортов в пространстве главных измерений в ходе корреспондентного анализа.

Предполагая сокращение количества выделяемых категорий за счет объединения сходных типов хромосом и, следовательно, более адекватную классификацию сортов, мы осуществили переход к шестибальной шкале оценки кариограмм по размеру индивидуальных С-блоков (количественная оценка). Действительно, при таком подходе количество выделяемых категорий сократилось вдвое (с 205 до 98), но в среднем во столько же раз возросло разрешение сортов (рис. S11). Последнее обусловлено трехкратным расширением диапазона оценочной шкалы, что позволяет более углубленно исследовать генезис сортов, поскольку чем выше разрешение метода, тем больше общих признаков среди классифицируемых образцов он способен детектировать. В ходе анализа главных компонент это привело не только к увеличению доли объяснимой дисперсии в кариограммах, но и к вскрытию существенности менее очевидных факторов в систематизации исследуемого материала. В частности, в классификации сортов по типу хромосом (качественная оценка кариограмм) первостепенное значение имеет фактор селекции, тогда как в классификации, основанной на ко-

личественной оценке кариограмм (размер С-блоков), обнаруживается более существенный вклад типа развития. В иерархической кластеризации преимущество перехода к шестибальной шкале выражено в более плотной и однородной группировке сортов по рассматриваемым признакам, что оправдывает ожидаемое повышение адекватности их классификации. Поддержка монофилии клад была тоже выше, указывая на лучшую согласованность исходных данных (сопряженность диагностических признаков). Наконец, в исследовании ассоциации альтернативных дифференцирующих признаков с селекционным статусом и типом развития сортов, несмотря на сокращение диагностических категорий, неинформативная фракция сократилась с 70 до 45 %. Тем не менее, несмотря на вышеперечисленные преимущества этого подхода, его разрешающая способность в разграничении яровых современных сортов и староместных культур значительно уступает качественному подходу в оценке кариограмм. Кроме того, в интерпретации результатов следует принять риски от влияния субъективного фактора при оценке размера С-блоков.

Поскольку С-блоки представляют сегменты неактивного хроматина, отличающегося высокой степенью эволюционного консерватизма, их применение в качестве классификационных признаков более оправданно в исследовании генезиса сортов, чем специфичности их генотипов. Кариологические признаки данного типа преимущественно селекционно нейтральны и не подвержены адаптивному действию естественного отбора. В этой связи любая ассоциация кариограммы и сопряженного с формированием специфического для данного типа развития генотипа отражает только общность их происхождения. Ввиду особенностей интенсивной селекции, вероятно, что подобные ассоциации будут сильнее выражены среди современных сортов, чем среди местных популяций. Сортные совокупности локально адаптированы к эколого-географическим условиям региона возделывания, поэтому ожидается взаимосвязь между типом развития пшеницы и ее происхождением. Мы также предположили, что более гомогенные современные сорта, в создании которых нередко использовались сходные наборы элитных сортов-основателей, будут характеризоваться большей сопряженностью кариограммы с типом развития, чем гетерогенные и локально адаптированные староместные сорта. Это предположение основывается на том факте, что в процессе окультуривания имеют место события генетического дрейфа, такие как «бутылочное горлышко» и «эффект основателя», причем современные сорта испытывают воздействие этих эволюционных событий в очередной раз, когда выщепляются из пула пшениц местного возделывания (Ladizinsky, 1985; Tanksley, McCouch, 1997; Feldman, Levy, 2023). Так, исследование выборки китайских сортов мягкой пшеницы на основании FISH-анализа выявило существенную роль «эффекта основателя» в их кластеризации (Huang et al., 2018; Hu et al., 2022). В качестве диагностирующего признака авторы упомянутых работ брали сходство рисунков распределения нескольких полиморфных ДНК зондов, что в нашем исследовании соответствует качественному признаку «тип хромосомы».

Кроме того, чем интенсивнее сорта задействованы в селекции, тем сильнее они дивергируют и обособливаются, что приводит к сужению генетического разнообразия современных сортов (Reif et al., 2005; Haudry et al., 2007; Sindhu, 2022). Исходя из того, что количество сортов озимой мягкой пшеницы, допущенной к использованию на территории РФ, заметно превышает количество яровых сортов (432 и 336 соответственно (Государственный реестр..., 2024)), можно предположить, что селекция отечественной озимой пшеницы проводится более интенсивно и должна быть более обособлена от староместных сортов. Действительно, в ходе факторного анализа показана сильная ассоциация типа развития с классификацией современных сортов по типу хромосом, тогда как кариограммы староместных сортов слабо различимы по данному признаку. При этом с повышением разрешающей способности метода сопряженность типа развития с хромосомной дифференциацией слабо усилилась, с обозначением тенденции к разделению по типу развития и местных культур. Ранее при анализе 20 российских сортов с использованием SSR- и ISBP-маркеров было также отмечено разделение по субкластерам озимых и яровых форм (Адонина и др., 2016).

В ходе исследования выявлено различное влияние современной селекции на обособление озимой и яровой пшеницы. Так, современные озимые сорта, независимо от типа дифференцирующего признака (тип хромосомы или размер С-блока) и способа классификации, благодаря большей общности кариотипов выделяются строго разграниченной группой, в которой обнаруживается плотное ядро из семи-восьми сортов со сходной кариограммой. Таким образом, тип развития этих сортов ассоциирован не просто с аллельным состоянием контролирующих его генов, а отражает обособленный от яровых и староместных культур кариотип, сложившийся в ходе многолетнего и целенаправленного отбора. Данное наблюдение подтверждает большую общность в генеалогии современных сортов озимой селекции (Novoselskaya-Dragovich et al., 2015). Об этом свидетельствует и их высокая гомогенность, согласно количеству ассоциированных кариологических признаков обоих типов и межсортным дистанциям. Действительно, большинство CW сортов, вошедших в настоящее исследование, имели в своей родословной сорт Безостая 1, что, вероятно, тоже могло сказаться на обособлении этой группы.

Яровые современные сорта, в отличие от озимых, менее интенсивно задействованы в селекции. Они испытали меньшее влияние искусственного отбора и сохранили больше сродства со староместными культурами, причем преимущественно тоже ярового типа. Последнее особенно отчетливо проявляется в классификации, основанной на количественной оценке кариограмм. В данной системе кластер современных сортов яровой селекции почти полностью перекрывается сортами местного возделывания, при этом ни один из них не входит в кластер современных сортов озимой селекции (см. рис. 3, а, рис. 6, а). Факторный анализ по этим данным также подчеркивает преобладание типа развития над селекционным статусом в распределении сортов. Следует отметить, что, несмотря

на близость современных яровых к сортам местного возделывания, оба подхода кариологической классификации выявляют тенденцию в их обособлении от последних. Это выражается как в однородности кластеризации CS среди староместных культур, так и в выделении их части в самостоятельную кладу. Учитывая полное разделение CW и CS и тенденцию в разделении по данному признаку у староместных сортов, тип развития представляется существенным фактором в дифференциации культурной пшеницы, репродуктивной изолированности сортовых популяций, их эколого-географическом распространении.

При сопоставлении кариологического метода с ОНП-генотипированием были выявлены как его ключевые недостатки, так и преимущества в классификации сортов пшеницы. Среди недостатков выделяются главным образом ограниченное количество диагностических признаков и их низкая согласованность. Если количественное ограничение обусловлено природой признаков данного типа, то слабая поддержка монофилетичности клад на дендрограмме связана не только с их низкой сопряженностью в выборке, но и вытекает из их первого недостатка (Rokas, Carroll, 2005). Низкую согласованность кариологических признаков можно объяснить высокой частотой рекомбинации С-блоков, обусловленной как их большой разобщенностью на хромосоме, так и комбинаторными событиями в распределении гомологичных хромосом в ходе мейоза (Blary, Jenczewski, 2019; Koo et al., 2020; Mason, Wendel, 2020; Fan et al., 2021), а также изменениями в рисунках окрашивания хромосом в результате интрогрессий и хромосомных перестроек. Определенный вклад вносит технология приготвления и окрашивания препаратов метафазных пластинок, а также немалая доля субъективности при оценке размера С-блоков.

Соображения о монофилии клад исходят из систематики видов, основанной на их филогении. Однако предположение о полной репродуктивной изоляции, обычно применяемое к видам, недопустимо для свободно скрещивающихся между собой сортов пшеницы, а в создание сортов, как отмечено во вступительной части статьи, часто привлекались образцы из географически разобщенных популяций и даже представители родственных таксонов. Оценка монофилии клад на дендрограммах, приведенных в настоящем исследовании, отражает преимущественно степень сопряженности диагностических признаков. Действительно, поддержка монофилетичности клад была несколько выше при использовании количественного метода кариотипирования. И хотя статистическая достоверность монофилии была значимой для всех клад высшего ранга, независимо от подхода в оценке кариограмм, она резко убывала до полного исчезновения при переходе ккладам более низких рангов. В то же время обоснование монофилии было несопоставимо сильнее и статистически значимым для всех клад дендрограммы, рассчитанной по данным ОНП-генотипирования, в котором количество диагностических признаков было на порядок больше, а их сопряженность выше, ввиду более высокой плотности картирования на хромосомах.

Тем не менее ценность дифференцирующих признаков в задачах классификации определяется их способностью к дискриминации выборки по требуемым качествам. В то

время как ОНП-маркеры дают представление об аллельной, генной изменчивости, полиморфизм по хромосомным маркерам отражает изменчивость кариотипа в целом. Поскольку структура гетерохроматиновых С-блоков не подвержена генетической рекомбинации и конверсии, они эволюционно более стабильны. Хромосомные aberrации, также относящиеся к хромосомным маркерам, приводят к значительным нарушениям в мейозе гетерозигот, тем самым нивелируя гетерогенность популяции, и способствуют сохранению аутентичности исходных популяций в течение времени, как, например, отмечено для группы европейской полбы с маркерной 5B-7A транслокацией (Dedkova et al., 2009; Badaeva et al., 2015b). Таким образом, хромосомные маркеры представляются более надежными для систематизации сортовых совокупностей пшеницы с точки зрения достоверности и воспроизводимости классификации, особенно когда количество диагностических признаков ограничено. Комбинаторная изменчивость на уровне хромосом формирует новые кариотипы (классификационные категории в кариологической дифференциации), но не изменяет комбинации признаков в группах сцепления, которые часто отражены в сопряженных маркерах при ОНП-генотипировании. В результате из большого количества согласованных диагностических признаков еще не следует лучшая дискриминация их носителей, так как последняя зависит и от типа этих признаков. Действительно, сопоставление ОНП- и хромосомных маркеров, в частности при использовании типа хромосом, но не размера С-блоков в качестве диагностического признака, подтвердило превосходство последних в дискриминации выборочных 20 сортов пшеницы как по селекционному статусу, так и по типу развития, несмотря на их низкую согласованность.

Существенно, что применение хромосомных маркеров достоверно различает сорта озимой пшеницы в зависимости от их селекционного статуса, тогда как при ОНП-генотипировании эти же сорта группируются совместно. Данное обстоятельство, возможно, обусловлено, как отмечено выше, различием в типе изменчивости, детектируемой ОНП- и хромосомными маркерами. Другими словами, кариотипы разного происхождения могут не различаться по аллельному состоянию многих генов (отсюда высокая согласованность ОНП-маркеров). Не исключено, что увеличение числа ОНП-маркеров повысит разрешающую способность этого метода в дискриминации тестируемой выборки сортов по селекционному статусу. Однако количество таких маркеров уже более чем на порядок превышает минимальный набор кариологических характеристик, достаточный для успешного разрешения данной проблемы, подчеркивая преимущество кариологического метода, особенно при ограниченном, малом количестве диагностических признаков.

Закключение

Проведенное исследование выявило высокий потенциал кариотипирования по конститутивному гетерохроматину в дискриминации современных российских сортов мягкой пшеницы по типу развития и обособлении их озимых форм от староместных культур. При этом гомогенность современных сортов по тестируемым кариологическим

признакам была выше, чем местных, а озимых – чем яровых. Полученная классификация отражает сохранение высокой общности в кариотипах современных сортов яровой селекции и сортовых популяций местного возделывания, а также слабую различимость кариотипов последних, контрастных по типу развития. В связи с более однозначной ассоциацией рисунков дифференциального окрашивания хромосом с происхождением сортов, а также их высокой эволюционной стабильностью предполагается, что анализ кариотипической изменчивости помогает составить более верное представление о дифференциации сортовых совокупностей пшеницы по данному признаку, чем при использовании ОНП-маркеров, детектирующих генную изменчивость, особенно при ограниченном количестве диагностических характеристик.

Список литературы / References

- Адонина И.Г., Леонова И.Н., Бадаева Е.Д., Салина Е.А. Генотипирование сортов мягкой пшеницы разных регионов России. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016;20(1):44-50. doi 10.18699/VJ16.107
- [Adonina I.G., Leonova I.N., Badaeva E.D., Salina E.A. Genotyping of hexaploid wheat varieties from different Russian regions. *Russ J Genet Appl Res*. 2017;7(1):6-13. doi 10.1134/S2079059717010014]
- Гончаров Н.П. Сравнительная генетика пшениц и их сородичей. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2012
- [Goncharov N.P. Comparative Genetics of Wheats and their Related Species. Novosibirsk: Acad. Publ. House "Geo", 2012 (in Russian)]
- Государственный реестр сортов и гибридов сельскохозяйственных растений, допущенных к использованию: официальное издание. М.: Росинформагротех, 2024
- [State Register of Varieties and Hybrids of Agricultural Plants Admitted for Usage (National List): official publication. Moscow: Rosinformagrotech Publ., 2024 (in Russian)]
- Фадеева Т.С., Нарбут С.И. Генетические типы сортов и особенности чистолинейных сортов. *Вестник Ленинградского государственного университета*. 1969;21(4):123-131
- [Fadeeva T.S., Narbut S.I. Genetic characteristics of varieties and characteristics of pure-line varieties. *Vestnik Leningradskogo Gosudarstvennogo Universiteta = Herald of the Leningrad State University*. 1969;21(4):123-131 (in Russian)]
- Afonnikova S.D., Kiseleva A.A., Fedyaeva A.V., Komyshev E.G., Koval V.S., Afonnikov D.A., Salina E.A. Identification of novel loci precisely modulating pre-harvest sprouting resistance and red color components of the seed coat in *T. aestivum* L. *Plants*. 2024;13:1309. doi 10.3390/plants13101309
- Badaeva E.D., Shkutina F.M., Bogdevich I.N., Badaev N.S. Comparative study of *Triticum aestivum* and *T. timopheevi* genomes using C-banding technique. *Plant Syst Evol*. 1986;154:183-194. doi 10.1007/BF00990122
- Badaeva E.D., Sozinova L.F., Badaev N.S., Muravenko O.V., Zelenin A.V. "Chromosomal passport" of *Triticum aestivum* L. *em Thell.* cv. Chinese Spring and standardization of chromosomal analysis of cereals. *Cereal Res Commun*. 1990;18(4):273-281
- Badaeva E.D., Badaev N.S., Gill B.S., Filatenko A.A. Intraspecific karyotype divergence in *Triticum araraticum* (*Poaceae*). *Plant Syst Evol*. 1994;192:117-145. doi 10.1007/BF00985912
- Badaeva E.D., Dedkova O.S., Gay G., Pukhalskiy V.A., Zelenin A.V., Bernard S., Bernard M. Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution. *Genome*. 2007;50(10):907-926. doi 10.1139/g07-072
- Badaeva E.D., Dedkova O.S., Pukhalskiy V.A., Zelenin A.V. Chromosomal changes over the course of polyploid wheat evolution and domestication. In: Ogihara Y., Takumi S., Handa H. (Eds) *Advances in Wheat Genetics: From Genome to Field*. Tokyo: Springer, 2015a; 83-89. doi 10.1007/978-4-431-55675-6_9
- Badaeva E.D., Keilwagen J., Knüpffer H., Waßermann L., Dedkova O.S., Mitrofanova O.P., Kovaleva O.N., Liapunova O.A., Pukhalskiy V.A., Özkan H., Graner A., Willcox G., Kilian B. Chromosomal passports provide new insights into diffusion of emmer wheat. *PLoS One*. 2015b;10(5):e0128556. doi 10.1371/journal.pone.0128556
- Badaeva E.D., Konovalov F.A., Knüpffer H., Fricano A., Ruban A.S., Kehel Z., Zoshchuk S.A., ... Filatenko A., Bogaard A., Jones G., Özkan H., Kilian B. Genetic diversity, distribution and domestication history of the neglected GGA¹A¹ gene pool of wheat. *Theor Appl Genet*. 2022;135(3):755-776. doi 10.1007/s00122-021-03912-0
- Becker R.A., Chambers J.M., Wilks A.R. *The New S Language: A Programming Environment for Data Analysis and Graphics*. Berlin: Springer, 1988
- Blary A., Jenczewski E. Manipulation of crossover frequency and distribution for plant breeding. *Theor Appl Genet*. 2019;132(3):575-592. doi 10.1007/s00122-018-3240-1
- Boehm J., Jr., Cai X. Enrichment and diversification of the wheat genome via alien introgression. *Plants*. 2024;13(3):339. doi 10.3390/plants13030339
- Dedkova O.S., Badaeva E.D., Mitrofanova O.P., Zelenin A.V., Pukhalskiy V.A. Analysis of intraspecific divergence of hexaploid wheat *Triticum spelta* L. by C-banding of chromosomes. *Russ J Genet*. 2004;40:1111-1126. doi 10.1023/B:RUGE.0000044755.18085.7e
- Dedkova O., Badaeva E., Mitrofanova O., Bilinskaya E., Pukhalskiy V. Analysis of intraspecific diversity of cultivated emmer *Triticum dicoccum* (Schrank.) Schuebl using C-banding technique. *Russ J Genet*. 2007;43:1271-1285. doi 10.1134/S1022795407110105
- Dedkova O., Badaeva E., Amosova A., Martynov S., Ruanet V., Mitrofanova O., Pukhalskiy V. Diversity and the origin of the European population of *Triticum dicoccum* (Schrank) Schuebl. As revealed by chromosome analysis. *Russ J Genet*. 2009;45:1082-1091. doi 10.1134/S1022795409090099
- Delaney D.E., Nasuda S., Endo T.R., Gill B.S., Hulbert S.H. Cytologically based physical maps of the group-2 chromosomes of wheat. *Theor Appl Genet*. 1995;91(4):568-573. doi 10.1007/BF00223281
- Endo T.R., Gill B.S. The deletion stocks of common wheat. *J Hered*. 1996;87(4):295-307. doi 10.1093/oxfordjournals.jhered.a023003
- Fan C., Hao M., Jia Z., Neri C., Chen X., Chen W., Liu D., Lukaszewski A.J. Some characteristics of crossing over in induced recombination between chromosomes of wheat and rye. *Plant J*. 2021;105(6):1665-1676. doi 10.1111/tpj.15140
- Feldman M. Origin of cultivated wheat. In: Bonjean A.P., Angus W.J. (Eds) *The World Wheat Book: A History of Wheat Breeding*. Technique & Doc, 2001;3-56
- Feldman M., Levy A.A. *Wheat Evolution and Domestication*. Springer, 2023. doi 10.1007/978-3-031-30175-9
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985;39(4):783-791. doi 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x
- Friebe B., Gill B.S. C-band polymorphism and structural rearrangements detected in common wheat (*Triticum aestivum*). *Euphytica*. 1994;78:1-5. doi 10.1007/BF00021392
- Friebe B., Gill B.S. Chromosome banding and genome analysis in diploid and cultivated polyploid wheats. In: Jauhar P.P. (Ed.) *Methods in Genome Analysis in Plants*. CRC Press, 1996;39-60
- Galili T. dendextend: an R package for visualizing, adjusting, and comparing trees of hierarchical clustering. *Bioinformatics*. 2015;31(22):3718-3720. doi 10.1093/bioinformatics/btv428
- Gill B.S., Friebe B., Endo T.R. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*). *Genome*. 1991;34(5):830-839. doi 10.1139/g91-128
- Guo J., Gao D., Gong W., Li H., Li J., Li G., Song J., Liu J., Yang Z., Liu C. Genetic diversity in common wheat lines revealed by fluorescence in situ hybridization. *Plant Syst Evol*. 2019;305:247-254. doi 10.1007/s00606-019-1567-y
- Haudry A., Cenci A., Ravel C., Bataillon T., Brunel D., Poncet C., Hochu I., Poirier S., Santoni S., Glémin S., David J. Grinding up wheat:

- a massive loss of nucleotide diversity since domestication. *Mol Biol Evol.* 2007;24(7):1506-1517. doi 10.1093/molbev/msm077
- Hu Z., Luo J., Wan L., Luo J., Li Y., Fu S., Liu D., Hao M., Tang Z. Chromosomes polymorphisms of Sichuan wheat cultivars displayed by ND-FISH landmarks. *Cereal Res Commun.* 2022;50:253-262. doi 10.1007/s42976-021-00173-x
- Huang X., Zhu M., Zhuang L., Zhang S., Wang J., Chen X., Wang D., ... Chu C., Du P., Qi Z., Wang H., Chen P. Structural chromosome rearrangements and polymorphisms identified in Chinese wheat cultivars by high-resolution multiplex oligonucleotide FISH. *Theor Appl Genet.* 2018;131(9):1967-1986. doi 10.1007/s00122-018-3126-2
- Husson F., Le S., Pages J. Exploratory Multivariate Analysis by Example Using R. Chapman and Hall, 2010
- Iordansky A.B., Zurabishvili T.B., Badaev N.S. Linear differentiation of cereal chromosomes. I. Common wheat and its supposed ancestors. *Theor Appl Genet.* 1978a;51(4):145-152. doi 10.1007/BF00273138
- Iordansky A.B., Zurabishvili T.G., Badaev N.S. Linear differentiation of cereal chromosomes: III. Rye, triticale and 'Aurora' variety. *Theor Appl Genet.* 1978b;51(6):281-288. doi 10.1007/BF00274816
- Jiang J., Friebe B., Gill B.S. Recent advances in alien gene transfer in wheat. *Euphytica.* 1993;73:199-212. doi 10.1007/BF00036700
- Jiang J., Friebe B., Gill B.S. Chromosome painting of Amigo wheat. *Theor Appl Genet.* 1994;89(7-8):811-813. doi 10.1007/BF00224501
- Jiang M., Xao Z.Q., Fu S.L., Tang Z.X. FISH karyotype of 85 common wheat cultivars/lines displayed by ND-FISH using oligonucleotide probes. *Cereal Res Commun.* 2017;45:549-563. doi 10.1556/0806.45.2017.049
- Koo D.H., Friebe B., Gill B.S. Homoeologous recombination: a novel and efficient system for broadening the genetic variability in wheat. *Agronomy.* 2020;10(8):1059. doi 10.3390/agronomy10081059
- Kudriavtsev A.M. Intravarietal heterogeneity of durum wheat is an important component of species biodiversity. *Russ J Genet.* 2006; 42(10):1437-1440. doi 10.1134/S1022795406100139
- Ladizinsky G. Founder effect in crop-plant evolution. *Econ Bot.* 1985; 39:191-199. doi 10.1007/BF02907844
- Mason A.S., Wendel J.F. Homoeologous exchanges, segmental allopolyploidy, and polyploid genome evolution. *Front Genet.* 2020;11: 1014. doi 10.3389/fgene.2020.01014
- Metakovsky E., Melnik V.A., Pascual L., Wrigley C.W. How important are genetic diversity and cultivar uniformity in wheat? The case of Gliadins. *Genes (Basel).* 2024;15(7):927. doi 10.3390/genes 15070927
- Mickelson-Young L., Endo T.R., Gill B.S. A cytogenetic ladder map of the wheat homoeologous group 4 chromosomes. *Theor Appl Genet.* 1995;90(7-8):1007-1011. doi 10.1007/BF00222914
- Mujeeb-Kazi A., Kazi A.G., Dundas I., Rasheed A., Ogbonnaya F.C., Kishii M., Bonnett D., Wang R.C., Xu S., Chen P., Mahmood T., Bux H., Farrakh S. Genetic diversity for wheat improvement as a conduit to food security. In: Sparks D.L. (Ed.) *Advances in Agronomy.* Acad. Press, Burlington, 2013;179-257. doi 10.1016/B978-0-12-417187-9.00004-8
- Novoselskaya-Dragovich A.Y., Bepalova L.A., Shishkina A.A., Melnik V.A., Upelnik V.P., Fisenko A.V., Dedova L.V., Kudryavtsev A.M. Genetic diversity of common wheat varieties at the gliadin-coding loci. *Russ J Genet.* 2015;51(3):262-271. doi 10.1134/S1022795415030102
- Paradis E., Schliep K. ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics.* 2019;35(3): 526-528. doi 10.1093/bioinformatics/bty633
- Reif J.C., Zhang P., Dreisigacker S., Warburton M.L., van Ginkel M., Hoisington D., Bohn M., Melchinger A.E. Wheat genetic diversity trends during domestication and breeding. *Theor Appl Genet.* 2005;110(5):859-864. doi 10.1007/s00122-004-1881-8
- Robinson D.F., Foulds L.R. Comparison of phylogenetic trees. *Math Biosci.* 1987;53(1-2):131-147. doi 10.1016/0025-5564(81)90043-2
- Rokas A., Carroll S.B. More genes or more taxa? The relative contribution of gene number and taxon number to phylogenetic accuracy. *Mol Biol Evol.* 2005;22(5):1337-1344. doi 10.1093/molbev/msi121
- Schliep K.P. phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics.* 2011;27(4):592-593. doi 10.1093/bioinformatics/btq706
- Seal A.G. C-banded wheat chromosomes in wheat and triticale. *Theor Appl Genet.* 1982;63(1):39-47. doi 10.1007/BF00303488
- Serpoly-Besson E., Dawson J., Chable V., van Bueren E.L., Osman A., Pino S., Silveri D., Goldringer I. Diversity of different farmer and modern wheat varieties cultivated in contrasting organic farming conditions in western Europe and implications for European seed and variety legislation. *Org Agric.* 2011;1(3):127-145. doi 10.1007/s13165-011-0011-6
- Sharma M., Punya S., Gupta B.B. Role of wild relatives for development of climate-resilient varieties. In: Salgotra R.K., Zargar S.M. (Eds) *Rediscovery of Genetic and Genomic Resources for Future Food Security.* Springer, Singapore, 2020;303-314. doi 10.1007/978-981-15-0156-2_11
- Sharma S., Schulthess A.W., Bassi F.M., Badaeva E.D., Neumann K., Graner A., Özkan H., Werner P., Knüpffer H., Kilian B. Introducing beneficial alleles from plant genetic resources into the wheat germplasm. *Biology (Basel).* 2021;10(10):982. doi 10.3390/biology 10100982
- Sindhu A. Wheat genetic diversity trends as a result of domestication and plant breeding. *Pharma Innovation.* 2022;11(6):427-433
- Tanksley S.D., McCouch S.R. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science.* 1997;277(5329):1063-1066. doi 10.1126/science.277.5329.1063
- Zeven A.C. Polyploidy and domestication: the origin and survival of polyploids in cytotype mixtures. In: Lewis W.H. (Ed.) *Polyploidy.* Basic Life Sciences. Vol. 13. Springer, 1980;385-407. doi 10.1007/978-1-4613-3069-1_20
- Zeven A.C. Landraces: a review of definitions and classifications. *Euphytica.* 1998;104:127-139. doi 10.1023/A:1018683119237
- Zhao X., Guo Y., Kang L., Yin C., Bi A., Xu D., Zhang Z., ... Kear P., Wang J., Liu Z., Fu X., Lu F. Population genomics unravels the Holocene history of bread wheat and its relatives. *Nat Plants.* 2023; 9(3):403-419. doi 10.1038/s41477-023-01367-3
- Zohary D., Hopf M., Weiss E. *Domestication of Plants in the Old World.* Oxford Univ. Press, 2012
- Zurabishvili T.G., Iordansky A.B., Badaev N.S. Linear differentiation of cereal chromosomes. II. Polyploid wheats. *Theor Appl Genet.* 1978;51(5):201-210. doi 10.1007/BF00273766

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 06.03.2025. После доработки 19.05.2025. Принята к публикации 26.05.2025.

doi 10.18699/vjgb-25-84

Картирование локусов и генов, определяющих время колошения и созревания яровой мягкой пшеницы в условиях длинного дня, и оценка их влияния на урожайность

А.А. Киселёва , А.И. Стасюк , И.Н. Леонова , Е.А. Салина Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
 antkiseleva@bionet.nsc.ru

Аннотация. Продолжительность вегетационного периода оказывает значительное влияние на формирование урожая и является одной из важных характеристик сортов яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). К основным межфазным периодам, влияющим на продолжительность вегетации, относятся время от всходов до колошения и от колошения до созревания. Для выявления генов и локусов, ассоциированных с этими признаками в условиях длинного дня, характерного для Западной Сибири, и оценки их влияния на структуру урожая мы провели картирование QTL с последующей оценкой признаков урожайности у линий, несущих различные аллели генов, определяющих скорость развития. В качестве картирующей популяции мы использовали растения F₂, полученные от скрещивания контрастных по скорости развития сортов Обская 2 и Тулун 15. QTL анализ выявил новый локус на длинном плече хромосомы 7В, ассоциированный со временем созревания, и два локуса на хромосоме 2D и коротком плече хромосомы 7В, ассоциированных со временем колошения. Анализ генов, входящих в состав локусов, позволил выявить гены-кандидаты для признака «всходы–созревание», паттерны экспрессии которых соответствовали генам известного регулятора скорости созревания *NAM-1*. Локализация локусов для признака «всходы–колошение» позволила предположить, что они соответствуют известным генам *Ppd-D1* и *Vrn-B3*. Анализ потомства линий с сочетанием аллелей *Ppd-D1a* и *Vrn-B3a* показал, что *Ppd-D1a* оказывает больший эффект на время колошения, чем *Vrn-B3a*, а сочетание этих двух аллелей приводит к наиболее раннему колошению, в среднем на пять дней раньше линий с аллелями *Ppd-D1b* и *vrn-B3*. Оценка признаков структуры урожая (количество и масса зерен с главного колоса и с растения, масса 1000 зерен) показала, что ген *Ppd-D1* ассоциирован со всеми признаками на высоком уровне значимости, при этом в большинстве случаев аллель *Ppd-D1a* негативно влиял на урожайность. Ген *Vrn-B3* влиял на признаки урожайности в меньшей степени по сравнению с *Ppd-D1*.

Ключевые слова: мягкая пшеница; время колошения; время созревания; урожайность; QTL картирование; *Ppd-D1*; *Vrn-B3*

Для цитирования: Киселёва А.А., Стасюк А.И., Леонова И.Н., Салина Е.А. Картирование локусов и генов, определяющих время колошения и созревания яровой мягкой пшеницы в условиях длинного дня, и оценка их влияния на урожайность. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(6):769-778. doi 10.18699/vjgb-25-84

Финансирование. QTL анализ и изучение локусов времени колошения и созревания проведены в рамках бюджетного проекта «Молодежные лаборатории» FWNR-2024-0009. Оценка влияния аллелей *Ppd-D1a* и *Vrn-B3a* на показатели продуктивности выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 21-76-30003-П, <https://rscf.ru/project/21-76-30003/> <<https://rscf.ru/project/21-76-30003/>>.

Mapping loci and genes controlling heading and maturity time in common wheat under long-day conditions and assessing their effects on yield-related traits

А.А. Kiseleva , А.И. Stasyuk , I.N. Leonova , E.A. Salina 

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

 antkiseleva@bionet.nsc.ru

Abstract. The duration of the vegetation period significantly impacts yield formation and is one of the important characteristics of spring common wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. The primary developmental phases influencing the vegetation period include the time from seedling emergence to heading and from heading to maturity. To identify genes and loci associated with these traits under long-day conditions typical of Western Siberia and to assess their impact on yield components, we conducted QTL mapping followed by an evaluation of yield-related traits in lines carrying different alleles of key heading time genes. For mapping, we used an F₂ population derived from a

cross between the varieties Obskaya 2 and Tulun 15, which contrast in their heading and maturity times. QTL analysis identified a novel locus on the long arm of chromosome 7B associated with maturity time, as well as two loci on chromosome 2D and the short arm of chromosome 7B associated with heading time. Gene analysis within these loci revealed candidate genes for the “seedling-maturity” trait, with expression patterns corresponding to the known maturity time regulator *NAM-1*. The localization of loci for the “seedling-to-heading” trait suggested their correspondence to the well-known genes *Ppd-D1* and *Vrn-B3*. Analysis of progeny carrying the *Ppd-D1a* and *Vrn-B3a* allele combination demonstrated that *Ppd-D1a* had a stronger effect on heading time than *Vrn-B3a*, and their combined presence resulted in the earliest heading – on average, five days earlier than in lines with the *Ppd-D1b* and *vrn-B3* alleles. Evaluation of yield-related traits (number and weight of grains per main spike and per plant, and 1,000-grain weight) indicated that *Ppd-D1* was significantly associated with all traits, with the *Ppd-D1a* allele generally exerting a negative effect on yield. In contrast, *Vrn-B3* had a comparatively smaller effect on yield traits than *Ppd-D1*.

Key words: common wheat; heading time; maturity time; yield traits; QTL mapping; *Ppd-D1*; *Vrn-B3*

For citation: Kiseleva A.A., Stasyuk A.I., Leonova I.N., Salina E.A. Mapping loci and genes controlling heading and maturity time in common wheat under long-day conditions and assessing their effects on yield-related traits. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(6):769-778. doi 10.18699/vjgb-25-84

Введение

Урожайность пшеницы и ее адаптивный потенциал к различным условиям среды во многом связаны с продолжительностью основных стадий развития. Особенно важен переход от вегетативного развития к генеративному – время колошения, а также время созревания. Чаще всего при анализе сортов для предсказания сроков колошения исследуют аллельный состав следующих генов: *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, *Ppd-D1* и реже *Vrn-B3* (*TaFT-1*), поскольку они оказывают наибольшее воздействие на данный признак (Zhang Y. et al., 2010; Kiss et al., 2014; Chen S. et al., 2018; Mizuno et al., 2022; Palomino, Cabrera, 2023). Основные гены, влияющие на время созревания, – это гены *NAM-B1* и *NAM-A1* (Hagenblad et al., 2012; Alhabbar et al., 2018b).

Большинство аллелей *Ppd-1*, определяющих нечувствительность к фотопериоду (доминантные аллели), характеризуется изменениями в промоторной области – делециями или инсерциями (Beales et al., 2007; Wilhelm et al., 2009; Nishida et al., 2013), где располагаются различные регуляторные последовательности. Кроме того, для *Ppd-B1* известны доминантные аллели, характеризующиеся увеличенным числом копий (Díaz et al., 2012). Доминантный аллель *Ppd-D1a* в настоящее время чаще всего используется в мировой селекции из всех генов *Ppd-1* (Seki et al., 2011). Так, согласно (Guo et al., 2010), этот аллель обнаружен у 33 % сортов мягкой пшеницы в Южной Америке, у 45.5 % сортов, возделываемых в южной части Европы, и у 8 % сортов в северной и западной частях Европы. Самое высокое распространение данный аллель получил в Азии – 57.4 % культивируемых в Китае сортов. Среди японских сортов 84 % являются носителями этого доминантного аллеля (Seki et al., 2011). В то же время среди сортов отечественной селекции аллель *Ppd-D1a*, который может не только ускорять переход к колошению, но и оказывать положительное влияние на другие характеристики растений, встречается довольно редко (Лихенко и др., 2014; Лысенко и др., 2014). В большинстве исследований эффект данного аллеля изучают в условиях короткого дня, в таких условиях он сокращает время перехода к колошению на 20–30 дней. Тем не менее имеются немногочисленные сведения, что аллель *Ppd-D1a* может ускорять время колошения на 3–5 дней даже в условиях длинного дня (Worland et al., 1998; Kiseleva et al., 2014).

Еще один важный ген – *Vrn-B3*, который считается центральным регулятором времени колошения. Аллель *Vrn-B3a* обуславливает раннее цветение. Его экспрессия усилена в результате инсерции ретроэлемента протяженностью 5300 п. н. в промоторной области (Yan et al., 2006). Этот аллель очень редко встречается у культивируемых сортов (Zhang X.K. et al., 2008; Iqbal et al., 2011; Chen F. et al., 2013; Лысенко и др., 2014). Известны еще четыре аллеля гена *Vrn-B3*, обозначенные литерами b/c/d/e, но они имеют гораздо менее выраженный эффект на время колошения (Chen F. et al., 2013; Berezhnaya et al., 2021).

Аллель дикого типа гена *NAM-B1* связан с более ранним созреванием, при этом у современных сортов он практически не встречается из-за его негативного влияния на урожайность (Lundström et al., 2017). Для его гомеолога *NAM-A1* тоже были описаны аллели (*NAM-A1a* и *NAM-A1b*), ассоциированные с более ранним созреванием (Alhabbar et al., 2018a).

Условия внешней среды в значительной степени влияют на скорость развития мягкой пшеницы. Для разных регионов выращивания пшеницы в России характерны различия в климатических условиях. Несмотря на очевидную важность изучения регуляции времени колошения и созревания в условиях длинного дня, характерного для большинства регионов России, генетические механизмы, проявляющиеся при таком фотопериоде, мало изучены. Например, в некоторых работах показано влияние *Vrn-1*, *Vrn-B3* и *NAM-A1* на время созревания (Zaitseva, Lemesh, 2015; Alhabbar et al., 2018a; Whittal et al., 2018), но в нашем предыдущем исследовании не обнаружено связи между аллельным состоянием этих генов и временем созревания на яровых сортах в условиях Западной Сибири и выявлены новые локусы на хромосомах 2A, 3B, 4A, 5B, 7A и 7B, ассоциированные с этим признаком (Kiseleva et al., 2023).

Таким образом, генетический контроль скорости развития растений пшеницы сильно зависит от условий выращивания, и в разных климатических зонах на признак будут влиять разные гены. Для Западной Сибири актуальны скороспелые сорта мягкой пшеницы с высокой урожайностью, поскольку в настоящее время среди зарегистрированных для данного региона сортов большая часть относится к среднеспелым, а возделывание яровых сортов с различными сроками созревания позволяет варьировать время уборки урожая, что необходимо для уменьшения

потери урожая от перестоя (Белан и др., 2021). Это определяет необходимость дополнительного анализа и изучения известных и выявления новых локусов и генов, контролирующих продолжительность основных периодов развития, а также создания сортов и линий пшеницы, сроки колошения и созревания которых соответствуют конкретным условиям среды.

Цель нашей работы – определение локусов и входящих в их состав генов, ассоциированных с продолжительностью основных фаз развития яровой мягкой пшеницы, и оценка их влияния на урожайность в условиях Западной Сибири.

Материалы и методы

Материал. Картирующая популяция была получена от скрещивания сортов яровой мягкой пшеницы Обская 2 и Тулун 15. Сорт Обская 2 входит в группу среднеспелых и характеризуется высокой урожайностью и хлебопекарными качествами на уровне ценной пшеницы. Тулун 15 относится к раннеспелым сортам, имеет высокое качество зерна, но уступает сорту Обская 2 по урожайности. Гибридизация сортов, последующее самоопыление гибридов F₁ и выращивание растений F₂ были проведены в условиях тепличного комплекса ФИЦ ИЦиГ СО РАН. Последующие поколения (F₃ и F₄) были также получены самоопылением при последующем выращивании в полевых условиях (рис. S1)¹.

Анализ фенотипа. Растения поколений F₃ и F₄, полученные в результате скрещивания сортов Обская 2 × Тулун 15, высевали в 2018 и 2019 гг. на опытном поле Сибирского НИИ растениеводства и селекции (пос. Краснообск, Новосибирская область, 54.914070°N, 82.975379°E).

Колошение растений пшеницы определяли как время выхода колоса из трубки на 1/2, а время колошения – как продолжительность периода (количество дней) от всходов до момента колошения для каждого отдельного растения в рядке. Созревание определяли твердым зерном, пожелтением и высыханием колосьев и стеблей для каждого отдельного растения в рядке. Период налива зерна вычисляли как разницу между временем созревания и колошения. Почва опытного участка – чернозем выщелоченный. Полевой опыт закладывали на делянках шириной 0.5 м, по 20 зерен в ряду. Высевали по два ряда каждого образца с расстоянием между рядами 20 см. Созревшие растения убирали в снопы, подсушивали, после чего проводили оценку элементов структуры урожая. Оценивали число зерен в главном колосе, массу зерна с главного колоса, число и массу зерен с растения, массу 1000 зерен. Структурный анализ выполняли для 20 растений каждого образца.

Погодные условия в Новосибирской области в период вегетации отличались от среднеголетних. Так, в мае 2018 г. фактическая среднемесячная температура была 7 °С при норме 12.5 °С, а количество осадков составило 82 мм, что в 2.5 раза выше нормы. Температура в июне, июле и августе 2018 г. была близка к среднеголетним значениям. По количеству осадков июнь и июль существенно не отличались от нормы. В августе наблюдалась

теплая сухая погода с количеством выпавших осадков 35 мм при норме 53 мм. В 2019 г. весь вегетационный период температурный режим соответствовал среднеголетним наблюдениям. По влагообеспеченности май 2019 г. существенно не отличался от среднеголетних данных. В июне и августе наблюдался дефицит влаги, так как выпало 26 и 22 мм осадков при норме 59 и 53 мм соответственно. В июле была теплая и влажная погода, выпало 98 мм осадков при норме 69 мм.

Выделение ДНК и ПЦР. Геномную ДНК выделяли из листьев растений пшеницы с использованием модифицированного протокола, опубликованного в работе (Plaschke et al., 1995). Для определения аллелей генов *Vrn-1*, *Vrn-B3* и *Ppd-D1* были выбраны опубликованные ранее аллель-специфичные праймеры (Yan et al., 2004, 2006; Fu et al., 2005; Beales et al., 2007; Shcherban et al., 2012). Амплификацию проводили на приборе T100 Thermal Cycler (BioRad, США) с применением реактивов BioMaster HS-Taq ПЦР-Color («Биолабмикс», Россия) согласно протоколам, опубликованным в соответствующих статьях.

Генотипирование, построение генетических карт и картирование QTL. В ходе исследования картирующей F₂ популяции мягкой пшеницы, полученной от скрещивания сортов Обская 2 × Тулун 15 (84 линии) ДНК этих линий и родительских сортов была генотипирована на высокопроизводительном чипе Illumina Infinium 20K Wheat (TraitGenetics GmbH, Германия). Всего проанализировано 17267 маркеров.

Генетические карты построены в программе MultiPoint UltraDense (Mester et al., 2003). Удаляли маркеры с количеством ошибок более 25 и сегрегацией (χ^2) более 42. Минимальный размер для группы косегрегирующих маркеров (сцепленные маркеры, локализующиеся в одной позиции) был равен 2. При делении на кластеры $rf = 1.5$. Упорядочение маркеров в кластерах осуществлялось по алгоритму GES (guided evolutionary strategy) с ресемплингом методом складного ножа (jackknife). Далее для получения стабильных карт выполнялся контроль монотонности с удалением выбивающихся маркеров и последовательным удалением дестабилизирующих маркеров.

С помощью разработанных генетических карт и данных, полученных в результате анализа фенотипа, было проведено картирование локусов, определяющих время колошения, время созревания и период налива зерна на материале популяций от скрещивания Обская 2 × Тулун 15. Для картирования локусов использовали программу MultiQTL по алгоритму CIM (Compositive Interval Mapping).

Приоритизация генов из локусов. Функциональную характеристику генов-кандидатов и аннотацию последовательностей проводили на основе данных IWGSC RefSeq v.1.0. Для оценки паттернов экспрессии генов использовали данные секвенирования транскриптома мягкой пшеницы сорта Ажурная, полученные на материале различных частей растения в ходе развития от прорастания до полной спелости (Ramírez-González et al., 2018). В качестве «референсных» транскриптов были выбраны последовательности *NAM-A1* (*TraesCS6A02G108300.1/2*) и *NAM-D1* (*TraesCS6D02G096300.1*), поскольку *NAM-B1* у CS представлен нефункциональным аллелем, ID для него в аннотации генов по RefSeq не представлено.

¹ Рис. S1, S2 и табл. S1–S8 см. по адресу:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx26.xlsx>

Статистический анализ. Описательная статистика, ANOVA, анализ Тьюки, коэффициенты корреляции Пирсона (r) были рассчитаны с применением базовых функций языка программирования R. Все графики построены с помощью пакета R ggplot2 (Wickham, 2016).

Результаты

Оценка продолжительности фаз развития растений картирующей популяции

Время колошения растений в популяции варьировало от 34 до 41 дня. Данные описательной статистики для трех признаков представлены в табл. S1. Распределение признака «время колошения» было приближено к нормальному (рис. 1), распределение времени созревания и периода налива зерна смещено в сторону меньшего значения. Корреляция между временем созревания и периодом налива зерна была очень высокой: $r^2 = 0.96$.

Генетические карты и QTL картирование

Для построения генетических карт популяции Обская 2 × Тулун 15 были отобраны 3323 полиморфных маркера. Картировано 2629 маркеров, из них 534 скелетных. Всего было разработано 25 групп сцепления, и хромосомы 3В, 3D, 5D представлены несколькими группами. Обобщенные данные приведены в табл. S2, графическое изображение карт – на рис. S2.

С использованием модели CIM были картированы значимые локусы на хромосомах 2D и 7В, ассоциированные с продолжительностью фаз развития мягкой пшеницы

(рис. 2). При этом локус на хромосоме 2D был связан только со временем колошения и объяснял 37 % вариации данного признака (PEV). Локус на коротком плече хромосомы 7В тоже был ассоциирован со временем колошения, объясняя 20 % вариации. А два локуса на длинном плече этой хромосомы были связаны со временем созревания и периодом налива зерна и совпадали между собой. Значения PEV для времени созревания составило 11.5 %, для периода налива зерна – 18 %.

Локус на хромосоме 2D, ассоциированный со временем колошения, приходился на интервал между маркерами BS00022276_51 (позиция на RefSeq v.1.0 29454345) и wsnp_CAP12_c1503_764765 (позиция на RefSeq v.1.0 35683599). Таким образом, наиболее вероятным генотипом для этого QTL является *Ppd-D1* (позиция 33952048–33956269), локализация которого на физической карте как раз соответствует промежутку между выявленными маркерами.

Локус на хромосоме 7В, ассоциированный со временем колошения, приходился на интервал между маркерами Tdurum_contig5352_556 (позиция на RefSeq v.1.0 5061935) и AX-95248379 (позиция на RefSeq v.1.0 12717101). Наиболее вероятный ген-кандидат для этого QTL – *Vrn-B3* (позиция 9702354–9704354), локализация которого на физической карте соответствует промежутку между маркерами.

Для локусов времени созревания и периода налива зерна на длинном плече хромосомы 7В известных генов не обнаружено. Поиск в базе данных WheatQTLdb также не выявил локусов со схожим расположением.

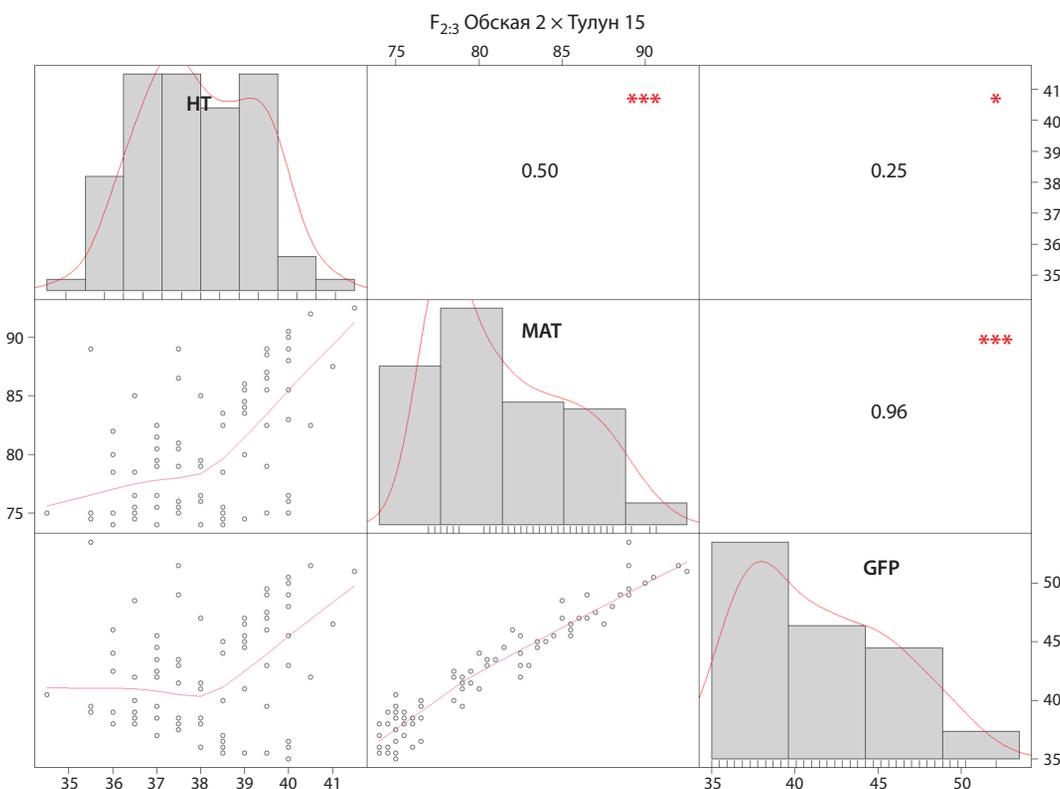


Рис. 1. Коэффициент корреляции Пирсона между признаками скорости развития.

HT – время колошения; MAT – время созревания; GFP – период налива зерна. Достоверные различия: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

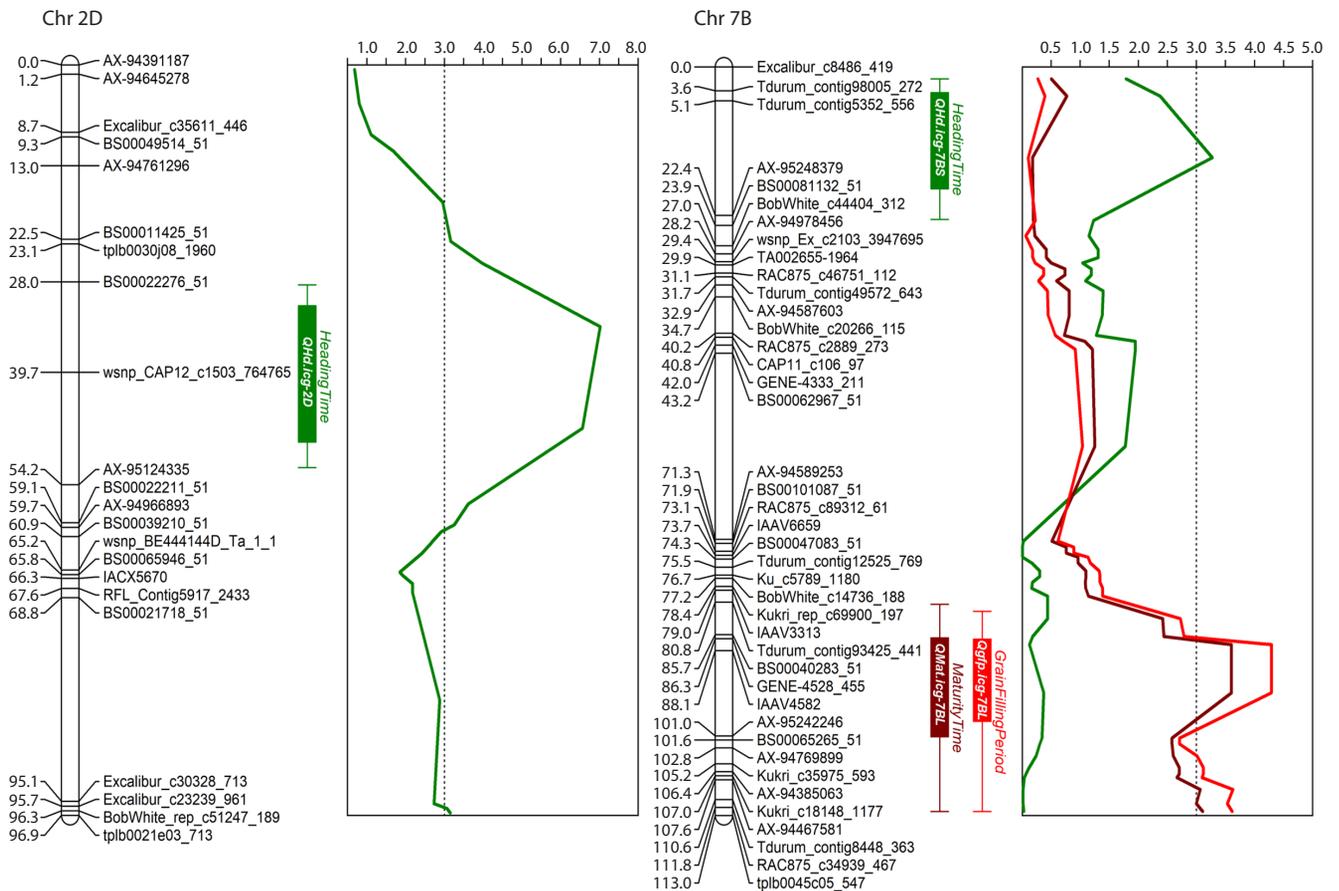


Рис. 2. Генетические карты хромосом 2D и 7B (представлены только скелетные маркеры) с обозначенными на них локусами времени колошения (зеленый цвет), времени созревания (бордовый) и периода налива зерна (красный).

Гены-кандидаты из состава локуса времени созревания и периода налива зерна

Локус *QMat.icg-7BL* расположен в интервале 712618516–721195460 (RefSeq v.1.0), в нем находится 141 ген (табл. S3). Анализ паттернов экспрессии этих генов в разных тканях в ходе развития растения позволил выявить несколько кандидатов (табл. S4).

Всего было описано восемь генов, преимущественно экспрессирующихся во флаговом и пятом листе после колошения или в зерне: *TraesCS7B02G455300*, *TraesCS7B02G459500*, *TraesCS7B02G459600*, *TraesCS7B02G460500*, *TraesCS7B02G460300*, *TraesCS7B02G454000*, *TraesCS7B02G461300* и *TraesCS7B02G461400*.

Отбор растений с различными аллелями генов *Ppd-D1* и *Vrn-B3*

Гены *Ppd-D1* и *Vrn-B3* были выявлены как основные кандидаты, определяющие время колошения у растений изучаемой популяции в результате QTL анализа, поэтому была проведена ПЦР для идентификации их аллелей. Генотипирование показало, что ранний сорт Тулун 15 содержит аллели *Ppd-D1a* и *Vrn-B3a*, а сорт Обская 2 – аллели *Ppd-D1b* и *vrn-B3*. При этом оба сорта характеризовались одинаковым аллельным составом генов *Vrn-1*: *Vrn-Ala*, *Vrn-B1c*, *vrn-D1*.

Далее были генотипированы растения популяции F_2 . В результате отобрано 34 растения, у которых *Ppd-D1* и *Vrn-B3* находились в гомозиготном состоянии. По аллельному составу отобранные растения были распределены на четыре группы (см. рис. S1). Потомство F_3 и F_4 этих растений высеяно в поле для определения сроков колошения для каждой группы.

Оценка времени колошения у растений популяции F_3 и F_4

Оценка времени от всходов до колошения в 2018 г. показала, что раньше всех выколашивались растения из группы 1 (34.5 дня), несущие доминантные аллели *Ppd-D1a* и *Vrn-B3a* (рис. 3). Растения, несущие аллель *Ppd-D1a* и аллель *vrn-B3* (группа 2), выколашивались на 2.8 дня позже растений из группы 1 (37.3 дня). Растения из группы 3 (*Ppd-D1b* и *Vrn-B3a*) выколосились на 38-й день от всходов. Позже всех выколашивались растения из группы 4 (40.3 дня), у которых оба гена были в рецессивном состоянии. Колошение родительского сорта Обская 2, несмотря на одинаковый аллельный состав с группой 4, было самым поздним – 42.9 дня, а у сорта Тулун 15 – на 3 дня позже растений из группы 1 с таким же составом аллелей (*Ppd-D1a* и *Vrn-B3a*).

Оценка продолжительности периода от всходов до колошения в 2019 г. показала, что самым коротким этот

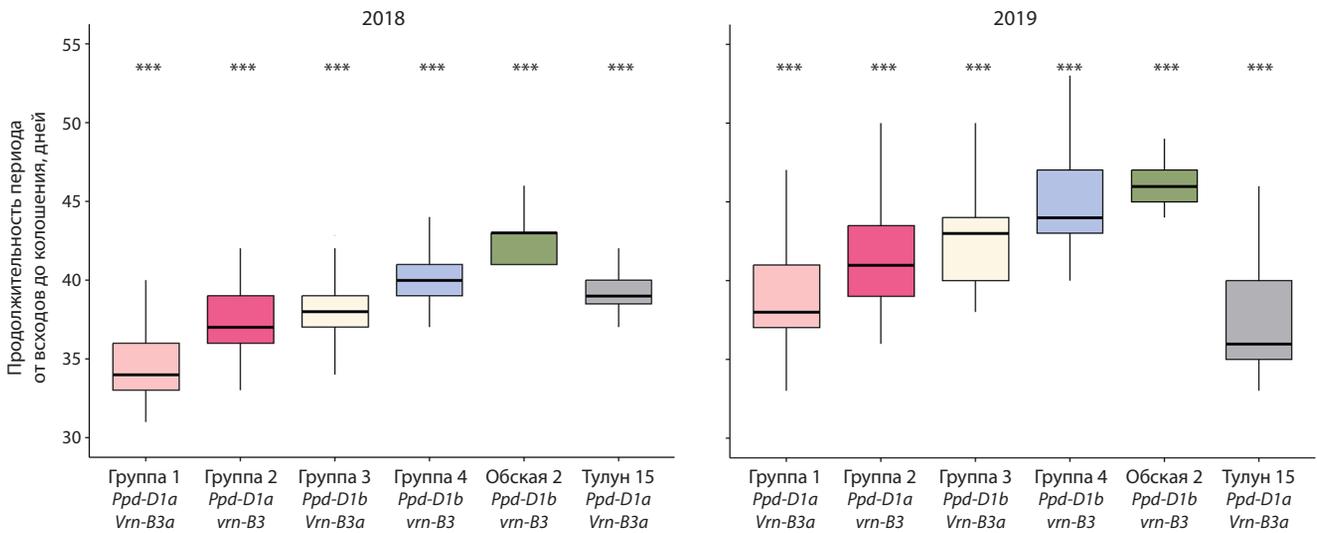


Рис. 3. Сравнение продолжительности периода от всходов до колошения у растений популяций F_3 – F_4 , полученных от скрещивания сортов Обская 2 и Тулун 15.

*** Достоверные отличия гибридов от родительских сортов при $p < 0.001$.

период (37.1 дня) был у родительского сорта Тулун 15 (см. рис. 3). Растения из группы 1, имеющие такой же аллельный состав генов *Vrn* и *Ppd*, выколосились на 39-й день от всходов, т. е. на 5.8 дня раньше, чем растения из группы 4 (рецессивные *vrn-B3* и *Ppd-D1b*). У растений из группы 2, несущих доминантный аллель *Ppd-D1a* и рецессивный аллель *vrn-B3*, период от всходов до колошения был на 2.5 дня длиннее, чем в группе 1, и составил 41.5 дня. Еще более поздние сроки колошения (42.8 дня) отмечены в группе 3, растения которой содержат рецессивный аллель *Ppd-D1b* и доминантный *Vrn-B3a*. Из всей гибридной популяции позже всех выколашивались растения группы 4, содержащие рецессивные аллели *Ppd-D1b* и *vrn-B3*, – 44.8 дня от всходов. Сорт Обская 2 показал самое продолжительное время от всходов до колошения – 46.8 дня.

ANOVA подтвердил, что аллели генов *Ppd-D1* и *Vrn-B3* влияют на время колошения в оба года исследований с высоким уровнем значимости (табл. S5). Присутствие аллеля *Ppd-D1a* ускоряло колошение в 2018 г. на 3.5 дня, а в 2019 – на 4.4 дня. Присутствие аллеля *Vrn-B3a* ускоряло колошение в 2018 г. на 2.3 дня, а в 2019 – на 2.5 дня. Сочетание этих аллелей приводило к колошению на 5.5 (2018) и 6.5 дня (2019) раньше по сравнению с сочетанием рецессивных аллелей этих генов.

Влияние аллелей генов *Ppd-D1* и *Vrn-B3* на компоненты урожайности

В оба года были также оценены параметры «число зерен в главном колосе», «масса зерен с главного колоса», «число зерен с растения», «масса зерен с растения», «масса 1000 зерен» (табл. S6). По результатам ANOVA, группа, к которой относятся растения (на основании сочетания аллелей *Ppd-D1* и *Vrn-B3*), значимо влияла на все признаки, а год выращивания – на все, кроме количества зерен с растения и массы зерен с растения (табл. S7).

Количество зерен с главного колоса у растений сорта Обская 2 в 2018 г. было самым высоким, 39.25, и значимо

(p -value < 0.001) отличалось от растений из всех четырех изучаемых групп. Самое низкое число зерен с колоса наблюдалось у растений из группы 1 (25.65 зерна), которая достоверно отличалась по этому признаку от групп 3 (29.08 зерна) и 4 (28.56 зерна). У растений из группы 2 и у сорта Тулун 15 число зерен в колосе было 26.83 и 31.60 соответственно, но достоверных различий с растениями других групп не выявлено. В 2019 г. значимые различия отмечены только между группами 1 (38.68 зерна) и 3 (43.67 зерна).

Масса зерен с главного колоса у сорта Обская 2 в оба года была значимо выше, чем у всех других растений в эксперименте: 1.99 г в 2018 г. и 2.21 г в 2019 г. Растения сорта Тулун 15 имели самую низкую массу зерен с колоса как в 2018 (0.94 г), так и в 2019 г. (1.38 г). Однако в 2018 г. у этого сорта существенных различий с растениями из всех четырех групп не было, а в 2019 г. значимые различия наблюдались с растениями из группы 3 (1.76 г). При сравнении растений между группами в 2018 г. этот признак был значимо ниже у групп 1 (1.04 г) и 2 (1.02 г), чем у групп 3 (1.25 г) и 4 (1.20 г). В 2019 г. масса зерен с главного колоса у групп 1 (1.51 г) и 2 (1.40 г) была значимо ниже, чем у растений из группы 3 (1.76 г).

Число зерен с растения в 2018 г. было наименьшим у группы 1 (45.54 зерна) и значимо отличалось в сравнении с группами 2 (63.18), 3 (66.52), 4 (59.91) и сортом Обская 2 (72.30 зерна). С сортом Тулун 15 (54.60 зерна) достоверных различий не выявлено. В 2019 г. между всеми изучаемыми растениями значимых различий по этому признаку не было.

Масса зерен с растения в 2018 г. была самой высокой у сорта Обская 2 (3.56 г) и значимо отличалась от остальных групп. Значимые отличия наблюдались и у растений из группы 1 (1.78 г) с растениями из групп 3 (2.71 г) и 4 (2.44 г). В 2019 г. сорт Обская 2 также характеризовался достоверно большей массой зерен с растения (3.53 г) в сравнении со всеми другими растениями в эксперимен-

те. Масса зерен с растения в группах 1, 2, 3, 4 и у сорта Тулун 15 была 2.03 г, 2.13, 2.39, 2.28 и 2.34 г соответственно, но достоверных различий между ними в 2019 г. не обнаружено.

Наиболее высокий показатель массы 1000 зерен в оба года (48.95 г в 2018 г. и 45.94 г в 2019 г.) отмечен у сорта Обская 2, что значимо выше, чем у других растений в эксперименте. У сорта Тулун 15 этот показатель был самым низким: 29.58 г в 2018 г. и 34.15 г в 2019 г., а значимые различия в 2018 г. были с растениями из групп 1 (38.86 г), 2 (36.51 г) и 4 (38.62 г), а в 2019 г. – с растениями из группы 3 (39.28 г). В 2018 г. растения из группы 1 (38.86 г) значимо не отличались от растений из групп 2 (36.51 г), 3 (40.96 г) и 4 (38.62 г). Также не выявлено различий между группами 3 и 4. В 2019 г. не было достоверных отличий у группы 1 (37.70 г) в сравнении с группами 3 (39.28 г) и 4 (37.15 г). У растений из группы 2 масса 1000 зерен составила 32.93 г, что значимо ниже, чем в группах 1, 3 и 4.

Все эти наблюдения подтверждаются факторным анализом, где в качестве фактора использовали аллели генов *Ppd-D1* и *Vrn-B3* (см. табл. S7). Так, ANOVA показал, что аллельное состояние гена *Ppd-D1* значимо ассоциировано со всеми оцененными признаками в оба года исследований на высоком уровне значимости, кроме количества зерен с растения в 2019 г. При этом влияние аллельного состояния гена *Vrn-B3* демонстрировало более низкий уровень значимости для всех признаков по сравнению с *Ppd-D1*. И в 2019 г. *Vrn-B3* показал значимый уровень ассоциации только с массой 1000 зерен. В целом можно сказать, что линии из групп 3 и 4 имеют высокий потенциал урожайности, но все равно меньший, чем исходный сорт Обская 2.

Обсуждение

Новый локус, ассоциированный со временем созревания

Корреляция между временем созревания и периодом налива зерна была очень высокой (0.96), что говорит о том, что основной вклад в формирование общего времени созревания в случае данной популяции и в условиях длинного дня вносит именно вторая фаза – период налива зерна, а не время колошения, хотя разброс этого признака составил около 7 дней, что является довольно значительным различием. Ранее некоторые авторы отмечали, что время созревания не всегда зависит от времени колошения и, вероятно, формируется под влиянием независимых механизмов (May, Van Sanford, 1992; Kajimura et al., 2011). Однако генов, специфически ассоциированных со временем созревания, у мягкой пшеницы, помимо *NAM-I* генов, практически неизвестно (Hagenblad et al., 2012).

В настоящей работе мы выявили на длинном плече хромосомы 7В локус *QMat.icg-7BL*, ассоциированный со временем созревания; он локализован в интервале 712618516–721195460 (RefSeq v.1.0). Несмотря на наличие значительного числа работ по определению маркеров и локусов времени созревания, в результате которых были описаны локусы на большинстве хромосом мягкой пшеницы, кроме 3А и 6А (Kulwal et al., 2003; McCartney et al., 2005; Huang et al., 2006; Kamran et al., 2013; Yu et al., 2015; Perez-Lara et al., 2016; Zou et al., 2017), ассоциаций

именно на 7В для времени созревания известно всего несколько. Мы предположили, что этот локус совпадает с ранее установленным нами локусом времени созревания, выявленным с помощью GWAS на материале популяции отечественных сортов яровой мягкой пшеницы (Kiseleva et al., 2023). Но картированный в нашей работе *QMat.icg-7BL* был расположен ближе к теломере и не пересекался с локусом на 7В, картированным в упомянутой публикации. Сопоставление его локализации с другим локусом на хромосоме 7В, ассоциированным со временем созревания (Kulwal et al., 2003), также не выявило пересечений. Таким образом, можно говорить, что мы выявили новый локус времени созревания.

В границах данного локуса был обнаружен 141 ген. На основании анализа паттернов экспрессии в разных тканях в ходе развития растения были выявлены несколько генов, кандидатов для времени созревания. Ген *TraesCS7B02G455300* характеризовался паттерном экспрессии, наиболее близким к паттерну генов *NAM-A1* и *NAM-D1*, – пик во флаговом листе на стадии полной спелости. Этот ген кодирует 12-оксофитодиеноатредуктазу 1, важный фермент, участвующий в биосинтезе жасмоновой кислоты. В литературе он был предложен в качестве одного из генов-кандидатов для регулирования плотности соломины (Taria et al., 2025). Гены *TraesCS7B02G459500*, *TraesCS7B02G459600*, *TraesCS7B02G460500* и *TraesCS7B02G460300* также экспрессировались во флаговом листе после стадии колошения и дополнительно имели похожий паттерн экспрессии в пятом листе. *TraesCS7B02G454000* экспрессировался сильнее по мере созревания в пятом листе и в первом листе только на стадии кушения. *TraesCS7B02G461300* и *TraesCS7B02G461400* аннотированы как Pseudo-Response Regulators, т. е. они относятся к тому же семейству, что и один из основных генов времени колошения, *Ppd-1*. Эти гены имели хотя и слабый уровень экспрессии, но характерный только для зерна на стадиях молочной и восковой спелости.

Аллели *Ppd-D1a* и *Vrn-B3a* значимо влияют на время колошения в условиях длинного дня

При одинаковом сочетании аллелей *Vrn-A1a*, *Vrn-B1c* и *vrn-D1* наличие доминантных аллелей *Ppd-D1a* и *Vrn-B3a* приводит к самому быстрому выколашиванию в условиях длинного дня. Если присутствует доминантный аллель *Ppd-D1a* и рецессивный *vrn-B3*, время колошения увеличивается на 2.5–3 дня. У растений с рецессивным аллелем *Ppd-D1b* и доминантным *Vrn-B3a* происходит удлинение периода «всходы–колошение» еще на 1–1.3 дня.

Полученные результаты позволяют говорить о том, что доминантный аллель *Ppd-D1a* оказывает более сильное влияние на скорость перехода к генеративной фазе развития растений пшеницы, чем доминантный аллель *Vrn-B3a*, что также согласуется с результатами QTL анализа, который показал, что локус на хромосоме 2D объясняет больший процент вариации данного признака.

Растения, у которых оба гена находятся в рецессивной форме (группа 4), наиболее поздно, по сравнению с другими группами, переходят к колошению. Сорт Обская 2, так же как и растения из группы 4, содержит рецессивные

аллели *Ppd-D1b* и *vrn-B3* и выколашивается позже еще на 2–2.5 дня. QTL анализ не выявил других значимых локусов, ассоциированных со временем колошения. Это может быть связано с наличием минорных локусов, которые не были определены в анализе при достаточном уровне значимости и, вероятно, унаследованы растениями из группы 4 от раннеспелого сорта Тулун 15. Так, на сроки колошения, кроме изученных в настоящей работе генов, могут оказывать влияние такие известные гены, как *TaELF3*, *PhyC*, *PhyB*, *WPCL*, и многочисленные QTL на всех хромосомах, ассоциированные со скоростью перехода к генеративной фазе развития (Chen A. et al., 2014; Milec et al., 2014; Mizuno et al., 2016; Pearce et al., 2016; Wang et al., 2016; Zikhali et al., 2016).

При сопоставлении результатов оценки сроков колошения за два года (см. рис. 3) можно отметить, что во второй год исследований у гибридных растений всех групп и у сорта Обская 2 колошение наступило на 4–5 дней позже. Исключением является сорт Тулун 15, у которого продолжительность периода «всходы–колошение» осталась неизменной – 37 дней. Вероятно, увеличение этого периода связано с различиями погодных условий в 2018 и 2019 гг. Так, по данным сайта gismeteo.ru, среднемесячная температура воздуха в июне 2018 г. была 21.3 °С, а в июне 2019 г. – 18.5 °С, что на 2.8 °С ниже. Стабильность времени перехода к колошению сорта Тулун 15 может свидетельствовать о его высокой экологической пластичности.

Мы видим, что эффекты при сочетании аллелей *Ppd-D1a* и *Vrn-B3a* складываются (см. табл. S5). По принятой схеме инициации флоральной меристемы, которая ведет к колошению (Li C. et al., 2024), *Ppd-D1* является основным индуктором гена *Vrn-B3*. Возможно, *Ppd-D1a* не влияет на *Vrn-B3a*, поскольку его экспрессия уже усилена в результате изменений (инсерции) в промоторной области. Таким образом, можно предположить, что в случае присутствия аллеля *Vrn-B3a* *Ppd-D1a* влияет на время колошения через гены-гомеологи *Vrn-3* на хромосомах 7A и 7D. Хотя исследований, показывающих воздействие этих генов на время колошения мало, в работе (Bonnin et al., 2008) было показано, что нуклеотидные полиморфизмы в генах *Vrn-A3* и *Vrn-D3* ассоциированы со временем колошения.

Влияние аллелей раннего колошения на другие хозяйственно ценные признаки

Эффект генов *Ppd-1* на различные сельскохозяйственно значимые признаки уже обсуждался ранее. Например, в работе (Boden et al., 2015) показано, что эти гены играют важную роль в формировании архитектуры соцветий и развитии парных колосков у пшеницы. Также показано более комплексное влияние *Ppd-1* на характеристики колоса, а именно на длину колоса, число колосков, длину пыльников (Okada et al., 2019), изменение числа побегов и колосков (Li W.L. et al., 2002). В ряде исследований отмечено влияние *Ppd-1* на количество зерна с главного колоса и массу 1000 зерен (Wu et al., 2021). Согласно нашим результатам, *Ppd-D1a* был значимо отрицательно ассоциирован с такими признаками, как количество и масса зерен с колоса и с растения, масса 1000 зерен.

О влиянии генов *Vrn-3* на эти признаки информации мало. По нашим данным, эффект аллеля *Vrn-B3a* на изученные признаки был менее выражен по сравнению с *Ppd-D1a*, и его проявление сильнее зависело от условий выращивания.

В большинстве случаев, если различия были значимые (p -value < 0.001), доминантные аллели изученных генов были ассоциированы с меньшим значением признака (меньшее количество и вес зерен). При этом значения для родительского сорта Тулун 15 были еще меньше, что говорит о дополнительных генетических механизмах регулирования формирования данных признаков, не зависящих от продолжительности вегетативной фазы.

Отбор линий из разных групп спелости с хорошими показателями продуктивности

Среди растений поколения F₄ был произведен поиск высокопродуктивных линий во всех четырех группах, различающихся по срокам колошения. Отбор проводился по признакам «масса зерен с растения» и «масса 1000 зерен», характеризующим урожайность и крупность зерна. Кроме того, при отборе учитывалась и визуальная оценка растений в поле. Известно, что урожайность пшеницы имеет высокую корреляцию с продолжительностью вегетационного периода. В нашем эксперименте в каждой из групп наблюдалось варьирование как по массе зерен с растения, так и по массе 1000 зерен. Несмотря на то что в целом наиболее раннеспелая группа 1 характеризуется снижением показателей продуктивности, среди растений этой группы выделились линии, не уступающие по признакам «масса зерен с растения» и «масса 1000 зерен» растениям из группы 4 с поздним сроком колошения и существенно превышающие раннеспелую родительскую форму Тулун 15. У растений из группы 3 тоже были выделены линии с хорошими показателями этих признаков. Среди растений из группы 2 отмечены линии с конкурентными показателями массы зерен с растения, но по сравнению с другими группами показатель «масса 1000 зерен» был наименьшим. По результатам анализа было отобрано 19 линий из всех четырех групп растений, которые признаны перспективными для дальнейшей селекции (табл. S8).

Заключение

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что аллели *Ppd-D1a* и *Vrn-B3a* оказывают существенное влияние на сроки колошения яровой мягкой пшеницы в условиях длинного дня. При этом *Ppd-D1a* сильнее ускоряет колошение, но оказывает более выраженное негативное действие на признаки, характеризующие продуктивность. Сделано предположение, что в случае присутствия аллеля *Vrn-B3a* *Ppd-D1a* может влиять на время колошения через его гомеологи *Vrn-A3* и *Vrn-D3*. Прикладной характер результатов данной работы связан с получением новых перспективных селекционных линий яровой пшеницы, сроки колошения которых будут оптимальными для многих регионов России и мира с продолжительным фотопериодом.

Список литературы / References

- Белан И.А., Россеева Л.П., Блохина Н.П., Григорьев Ю.П., Мухина Я.В., Трубачеева Н.В., Першина Л.А. Ресурсный потенциал сортов пшеницы мягкой яровой для условий Западной Сибири и Омской области (аналитический обзор). *Аграрная наука Евро-Северо-Востока*. 2021;22(4):449-465. doi 10.30766/2072-9081.2021.22.4.449-465
- [Belan I.A., Rosseeva L.P., Blokhina N.P., Grigoriev Y.P., Mukhina Y.V., Trubacheeva N.V., Pershina L.A. Resource potential of soft spring wheat varieties for the conditions of Western Siberia and Omsk region (analytical review). *Agrarnaya Nauka Euro-Severo-Vostoka = Agric Science Euro-North-East*. 2021;22(4):449-465. doi 10.30766/2072-9081.2021.22.4.449-465 (in Russian)]
- Лихенко И.Е., Стасюк А.И., Щербань А.Б., Зырянова А.Ф., Лихенко Н.И., Салина Е.А. Изучение аллельного состава генов *Vrn-1* и *Ppd-1* у раннеспелых и среднеранних сортов яровой мягкой пшеницы Сибири. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014;18(4/1):691-703
- [Likhenko I.E., Stasyuk A.I., Shcherban A.B., Zyryanova A.F., Likhenko N.I., Salina E.A. Analysis of the allelic variation of the *Vrn-1* and *Ppd-1* genes in Siberian early and medium early varieties of spring wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2014;18(4/1):691-703 (in Russian)]
- Лысенко Н.С., Киселева А.А., Митрофанова О.П., Потокина Е.К. Каталог мировой коллекции ВИР. Вып. 815. Мягкая пшеница. Молекулярное тестирование аллелей *Vrn* и *Ppd* генов у допущенных к использованию в Российской Федерации селекционных сортов. СПб.: ВИР, 2014
- [Lysenko N.S., Kiseleva A.A., Mitrofanova O.P., Potokina E.K. VIR World Collection Catalogue. Iss. 815. Bread Wheat: Molecular Testing of the *Vrn* and *Ppd* Alleles in the Selection Varieties Approved for Use in the Russian Federation. St. Petersburg: VIR Publ., 2014 (in Russian)]
- Alhabbar Z., Islam S., Yang R., Diepeveen D., Anwar M., Balot S., Sultana N., Maddern R., She M., Zhang J., Ma W., Juhasz A. Associations of *NAM-A1* alleles with the onset of senescence and nitrogen use efficiency under Western Australian conditions. *Euphytica*. 2018a;214(10):180. doi 10.1007/s10681-018-2266-4
- Alhabbar Z., Yang R., Juhasz A., Xin H., She M., Anwar M., Sultana N., Diepeveen D., Ma W., Islam S. *NAM* gene allelic composition and its relation to grain-filling duration and nitrogen utilisation efficiency of Australian wheat. *PLoS One*. 2018b;13(10):e0205448. doi 10.1371/journal.pone.0205448
- Beales J., Turner A., Griffiths S., Snape J.W., Laurie D.A. A *Pseudo-Response Regulator* is misexpressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1* a mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*. 2007;115(5):721-733. doi 10.1007/s00122-007-0603-4
- Berezhnaya A., Kiseleva A., Leonova I., Salina E. Allelic variation analysis at the vernalization response and photoperiod genes in Russian wheat varieties identified two novel alleles of *Vrn-B3*. *Biomolecules*. 2021;11(12):1897. doi 10.3390/biom11121897
- Boden S.A., Cavanagh C., Cullis B.R., Ramm K., Greenwood J., Jean Finnegan E., Trevaskis B., Swain S.M. *Ppd-1* is a key regulator of inflorescence architecture and paired spikelet development in wheat. *Nat Plants*. 2015;1(2):14016. doi 10.1038/nplants.2014.16
- Bonnin I., Rousset M., Madur D., Sourdille P., Dupuits C., Brunel D., Goldringer I. FT genome A and D polymorphisms are associated with the variation of earliness components in hexaploid wheat. *Theor Appl Genet*. 2008;116(3):383-394. doi 10.1007/s00122-007-0676-0
- Chen A., Li C., Hu W., Lau M.Y., Lin H., Rockwell N.C., Martin S.S., Jernstedt J.A., Lagarias J.C., Dubcovsky J. Phytochrome C plays a major role in the acceleration of wheat flowering under long-day photoperiod. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(28):10037-10044. doi 10.1073/pnas.1409795111
- Chen F., Gao M., Zhang J., Zuo A., Shang X., Cui D. Molecular characterization of vernalization and response genes in bread wheat from the Yellow and Huai Valley of China. *BMC Plant Biol*. 2013;13:199. doi 10.1186/1471-2229-13-199
- Chen S., Wang J., Deng G., Chen L., Cheng X., Xu H., Zhan K. Interactive effects of multiple vernalization (*Vrn-1*-) and photoperiod (*Ppd-1*)-related genes on the growth habit of bread wheat and their association with heading and flowering time. *BMC Plant Biol*. 2018;18(1):374. doi 10.1186/s12870-018-1587-8
- Diaz A., Zikhali M., Turner A.S., Isaac P., Laurie D.A. Copy number variation affecting the *Photoperiod-B1* and *Vernalization-A1* genes is associated with altered flowering time in wheat (*Triticum aestivum*). *PLoS One*. 2012;7(3):e33234. doi 10.1371/journal.pone.0033234
- Fu D., Szucs P., Yan L., Helguera M., Skinner J.S., von Zitzewitz J., Hayes P.M., Dubcovsky J. Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Mol Genet Genomics*. 2005;273(1):54-65. doi 10.1007/s00438-004-1095-4
- Guo Z., Song Y., Zhou R., Ren Z., Jia J. Discovery, evaluation and distribution of haplotypes of the wheat *Ppd-D1* gene. *New Phytol*. 2010;185(3):841-851. doi 10.1111/j.1469-8137.2009.03099.x
- Hagenblad J., Asplund L., Balfourier F., Ravel C., Leino M.W. Strong presence of the high grain protein content allele of *NAM-B1* in Fennoscandian wheat. *Theor Appl Genet*. 2012;125(8):1677-1686. doi 10.1007/s00122-012-1943-2
- Huang X.Q., Cloutier S., Lycar L., Radovanovic N., Humphreys D.G., Noll J.S., Somers D.J., Brown P.D. Molecular detection of QTLs for agronomic and quality traits in a doubled haploid population derived from two Canadian wheats (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*. 2006;113(4):753-766. doi 10.1007/s00122-006-0346-7
- Iqbal M., Shahzad A., Ahmed I. Allelic variation at the *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, *Vrn-B3* and *Ppd-D1a* loci of Pakistani spring wheat cultivars. *Electron J Biotechnol*. 2011;14(1):1-8. doi 10.2225/vol14-issue1-fulltext-6
- Kajimura T., Murai K., Takumi S. Distinct genetic regulation of flowering time and grain-filling period based on empirical study of D-genome diversity in synthetic hexaploid wheat lines. *Breed Sci*. 2011; 61(2):130-141. doi 10.1270/jsbbs.61.130
- Kamran A., Iqbal M., Navabi A., Randhawa H., Pozniak C., Spaner D. Earliness per se QTLs and their interaction with the photoperiod insensitive allele *Ppd-D1a* in the Cutler × AC Barrie spring wheat population. *Theor Appl Genet*. 2013;126(8):1965-1976. doi 10.1007/s00122-013-2110-0
- Kiseleva A.A., Eggi E.E., Koshkin V.A., Sitnikov M.N., Roder M., Salina E.A., Potokina E.K. Detection of genetic determinants that define the difference in photoperiod sensitivity of *Triticum aestivum* L. near-isogenic lines. *Russ J Genet*. 2014;50(7):701-711. doi 10.1134/S102279541405007X
- Kiseleva A.A., Leonova I.N., Ageeva E.V., Likhenko I.E., Salina E.A. Identification of genetic loci for early maturity in spring bread wheat using the association analysis and gene dissection. *PeerJ*. 2023;11: e16109. doi 10.7717/peerj.16109
- Kiss T., Balla K., Veisz O., Láng L., Bedő Z., Griffiths S., Isaac P., Karsai I. Allele frequencies in the *VRN-A1*, *VRN-B1* and *VRN-D1* vernalization response and *PPD-B1* and *PPD-D1* photoperiod sensitivity genes, and their effects on heading in a diverse set of wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). *Mol Breed*. 2014;34(2):297-310. doi 10.1007/s11032-014-0034-2
- Kulwal P.L., Roy J.K., Balyan H.S., Gupta P.K. QTL mapping for growth and leaf characters in bread wheat. *Plant Sci*. 2003;164(2): 267-277. doi 10.1016/S0168-9452(02)00409-0
- Li C., Lin H., Debernardi J.M., Zhang C., Dubcovsky J. *GIGANTEA* accelerates wheat heading time through gene interactions converging on *FLOWERING LOCUS T1*. *Plant J*. 2024;118(2):519-533. doi 10.1111/tpj.16622
- Li W.L., Nelson J.C., Chu C.Y., Shi L.H., Huang S.H., Liu D.J. Chromosomal locations and genetic relationships of tiller and spike characters in wheat. *Euphytica*. 2002;125:357-366. doi 10.1023/A:1016069809977
- Lundström M., Leino M.W., Hagenblad J. Evolutionary history of the *NAM-B1* gene in wild and domesticated tetraploid wheat. *BMC Genet*. 2017;18(1):118. doi 10.1186/s12863-017-0566-7

- May L., Van Sanford D.A. Selection for early heading and correlated response in maturity of soft red winter wheat. *Crop Sci.* 1992;32(1): 47-51. doi 10.2135/cropsci1992.0011183X003200010011x
- McCartney C.A., Somers D.J., Humphreys D.G., Lukow O., Ames N., Noll J., Cloutier S., McCallum B.D. Mapping quantitative trait loci controlling agronomic traits in the spring wheat cross RL4452 × ‘AC Domain’. *Genome.* 2005;48(5):870-883. doi 10.1139/G05-055
- Mester D., Ronin Y., Hu Y., Peng J., Nevo E., Korol A. Efficient multipoint mapping: making use of dominant repulsion-phase markers. *Theor Appl Genet.* 2003;107(6):1102-1112. doi 10.1007/s00122-003-1305-1
- Milec Z., Valárik M., Bartoš J., Safář J. Can a late bloomer become an early bird? Tools for flowering time adjustment. *Biotechnol Adv.* 2014;32(1):200-214. doi 10.1016/j.biotechadv.2013.09.008
- Mizuno N., Kinoshita M., Kinoshita S., Nishida H., Fujita M., Kato K., Murai K., Nasuda S. Loss-of-function mutations in three homoeologous *PHYTOCLOCK 1* genes in common wheat are associated with the extra-early flowering phenotype. *PLoS One.* 2016;11(10): e0165618. doi 10.1371/journal.pone.0165618
- Mizuno N., Matsunaka H., Yanaka M., Nakata M., Nakamura K., Nakamaru A., Kiribuchi-Otobe C., Ishikawa G., Chono M., Hata K., Fujita M., Kobayashi F. Allelic variations of *Vrn-1* and *Ppd-1* genes in Japanese wheat varieties reveal the genotype-environment interaction for heading time. *Breed Sci.* 2022;72(5):343-354. doi 10.1270/jbsbs.22017
- Nishida H., Yoshida T., Kawakami K., Fujita M., Long B., Akashi Y., Laurie D.A., Kato K. Structural variation in the 5' upstream region of photoperiod-insensitive alleles *Ppd-A1a* and *Ppd-B1a* identified in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.), and their effect on heading time. *Mol Breed.* 2013;31(1):27-37. doi 10.1007/s11032-012-9765-0
- Okada T., Jayasinghe J.E.A.R.M., Eckermann P., Watson-Haigh N.S., Warner P., Hendrikse Y., Baes M., ... Albertsen M., Wolters P., Fleury D., Baumann U., Whitford R. Effects of *Rht-B1* and *Ppd-D1* loci on pollinator traits in wheat. *Theor Appl Genet.* 2019;132(7):1965-1979. doi 10.1007/s00122-019-03329-w
- Palomino C., Cabrera A. Evaluation of the allelic variations in vernalisation (*VRN1*) and photoperiod (*PPD1*) genes and genetic diversity in a Spanish spelt wheat collection. *Int J Mol Sci.* 2023;24(22):16041. doi 10.3390/ijms242216041
- Pearce S., Kippes N., Chen A., Debernardi J.M., Dubcovsky J. RNA-seq studies using wheat *PHYTOCHROME B* and *PHYTOCHROME C* mutants reveal shared and specific functions in the regulation of flowering and shade-avoidance pathways. *BMC Plant Biol.* 2016; 16(1):141. doi 10.1186/s12870-016-0831-3
- Perez-Lara E., Semagn K., Chen H., Iqbal M., N'Diaye A., Kaman A., Navabi A., Pozniak C., Spaner D. QTLs associated with agronomic traits in the Cutler × AC Barrie spring wheat mapping population using single nucleotide polymorphic markers. *PLoS One.* 2016;11(8):e0160623. doi 10.1371/journal.pone.0160623
- Plaschke J., Ganai M.W., Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor Appl Genet.* 1995;91(6-7):1001-1007. doi 10.1007/BF00223912
- Ramírez-González R.H., Borrill P., Lang D., Harrington S.A., Brinton J., Venturini L., Davey M., ... Sharpe A.G., Paux E., Spanagl M., Bräutigam A., Uauy C. The transcriptional landscape of polyploid wheat. *Science.* 2018;361(6403):eaar6089. doi 10.1126/science.aar6089
- Seki M., Chono M., Matsunaka H., Fujita M., Oda S., Kubo K., Kiribuchi-Otobe C., Kojima H., Nishida H., Kato K. Distribution of photoperiod-insensitive alleles *Ppd-B1a* and *Ppd-D1a* and their effect on heading time in Japanese wheat cultivars. *Breed Sci.* 2011;61(4): 405-412. doi 10.1270/jbsbs.61.405
- Shcherban A.B., Efremova T.T., Salina E.A. Identification of a new *Vrn-B1* allele using two near-isogenic wheat lines with difference in heading time. *Mol Breed.* 2012;29(3):675-685. doi 10.1007/s11032-011-9581-y
- Taria S., Arora A., Krishna H., Manjunath K.K., Kumar Sudhir, Singh B., Meena S., Malakondaiah A.C., Kousalya S., Padaria J.C., Singh P.K., Alam B., Kumar Sushil, Arunachalam A. Mapping of the QTLs governing stem-specific weight for stem reserve mobilisation in wheat (*Triticum aestivum* L.) under combined heat and drought stress. *Plant Physiol Rep.* 2025. doi 10.1007/s40502-025-00854-3
- Wang J., Wen W., Hanif M., Xia X., Wang H., Liu S., Liu J., Yang L., Cao S., He Z. *TaELF3-1DL*, a homolog of *ELF3*, is associated with heading date in bread wheat. *Mol Breed.* 2016;36(12):161. doi 10.1007/s11032-016-0585-5
- Whittal A., Kaviani M., Graf R., Humphreys G., Navabi A. Allelic variation of vernalization and photoperiod response genes in a diverse set of North American high latitude winter wheat genotypes. *PLoS One.* 2018;13(8):e0203068. doi 10.1371/journal.pone.0203068
- Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer, 2016. doi 10.1007/978-3-319-24277-4
- Wilhelm E.P., Turner A.S., Laurie D.A. Photoperiod insensitive *Ppd-A1a* mutations in tetraploid wheat (*Triticum durum* Desf.). *Theor Appl Genet.* 2009;118(2):285-294. doi 10.1007/s00122-008-0898-9
- Worland A.J.J., Börner A., Korzun V., Li W.M.M., Petrović S., Sayers E.J.J. The influence of photoperiod genes on the adaptability of European winter wheats. *Euphytica.* 1998;100(1/3):385-394. doi 10.1023/A:1018327700985
- Wu Y., Liu J., Hu G., Xue H., Xu H., Zhao C., Qin R., Cui F., Sun H. Functional analysis of the “Green Revolution” gene *Photoperiod-1* and its selection trends during bread wheat breeding. *Front Plant Sci.* 2021;12:745411. doi 10.3389/fpls.2021.745411
- Yan L., Helguera M., Kato K., Fukuyama S., Sherman J., Dubcovsky J. Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploid wheat. *Theor Appl Genet.* 2004;109(8):1677-1686. doi 10.1007/s00122-004-1796-4
- Yan L., Fu D., Li C., Blechl A., Tranquilli G., Bonafede M., Sanchez A., Valarik M., Yasuda S., Dubcovsky J. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(51):19581-19586. doi 10.1073/pnas.0607142103
- Yu M., Chen G.-Y., Pu Z.-E., Zhang L.-Q., Liu D.-C., Lan X.-J., Wei Y.-M., Zheng Y.-L. Quantitative trait locus mapping for growth duration and its timing components in wheat. *Mol Breed.* 2015; 35(1):44. doi 10.1007/s11032-015-0201-0
- Zaitseva O.I., Lemesh V.A. Allelic composition in the *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, and *Vrn-B3* genes of double haploid lines of hexaploid triticale. *Russ J Genet.* 2015;51(7):653-660. doi 10.1134/S1022795415070145
- Zhang X.K., Xiao Y.G., Zhang Y., Xia X.C., Dubcovsky J., He Z.H. Allelic variation at the vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, and *Vrn-B3* in Chinese wheat cultivars and their association with growth habit. *Crop Sci.* 2008;48(2):458-470. doi 10.2135/cropsci2007.06.0355
- Zhang Y., Liu W.C., Li J., Wei H.T., Hu X.R., Li Y.J., Lu B.R., Yang W.Y. Distribution and selective effects of *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, and *Vrn-D1* genes in derivative varieties from four cornerstone breeding parents of wheat in China. *Agric Sci China.* 2010;9(10):1389-1399. doi 10.1016/S1671-2927(09)60230-3
- Zikhali M., Wingen L.U., Griffiths S. Delimitation of the *Earliness per se D1* (*Eps-D1*) flowering gene to a subtelomeric chromosomal deletion in bread wheat (*Triticum aestivum*). *J Exp Bot.* 2016;67(1): 287-299. doi 10.1093/jxb/erv458
- Zou J., Semagn K., Iqbal M., N'Diaye A., Chen H., Asif M., Navabi A., Perez-Lara E., Pozniak C., Yang R.-C., Randhawa H., Spaner D. Mapping QTLs controlling agronomic traits in the ‘Attila’ × ‘CDC Go’ spring wheat population under organic management using 90K SNP array. *Crop Sci.* 2017;57(1):365-377. doi 10.2135/cropsci2016.06.0459

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.03.2025. После доработки 15.05.2025. Принята к публикации 16.05.2025.

doi 10.18699/vjgb-25-85

Пребридинговые исследования почти изогенных линий яровой мягкой пшеницы, отличающихся по наличию/отсутствию хромосомного замещения 3R(3D) от сорта тритикале Satu

С.Н. Сибикеев , И.Г. Адонина , А.Е. Дружин , З.Е. Фитилева , О.А. Баранова 

¹ Федеральное аграрное научное учреждение Юго-Востока, Саратов, Россия

² Федеральное исследовательское учреждение Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

 sibikeev_servey@mail.ru

Аннотация. Одним из источников устойчивости к возбудителям листовой и стеблевой ржавчин для мягкой пшеницы является австралийский сорт ярового тритикале Satu, несущий высокоэффективные сцепленные гены *SrSatu/LrSatu*, локализованные в хромосоме 3R. Однако они мало используются в практической селекции *Triticum aestivum* L. из-за недостаточной изученности влияния этих генов на продуктивность и качество зерна. В настоящей работе представлены результаты сравнительного исследования агрономической ценности почти изогенных линий-сисбов яровой мягкой пшеницы Л16 и Л17, полученных с участием сорта Satu и различающихся наличием (Л16) или отсутствием (Л17 (3D3D)) замещения 3R(3D). Хромосомное замещение 3R(3D) у Л16 выявлено при цитогенетическом анализе, сочетающем GISH с меченой геномной ДНК *Secale cereale* и FISH с зондами pSc119.2, pAs1. Линия Л16 высокоустойчива к *Puccinia triticina* и *P. graminis*, включая линейку расы Ug99. ПЦР-анализом с ДНК-маркерами генов *Sr* установлена неидентичность гена устойчивости у Л16 генам *Sr: Sr2, Sr24, Sr25, Sr28, Sr31, Sr32, Sr36, Sr38, Sr39, Sr47 и Sr57*. Урожайность зерна у Л16 в оба года исследований была ниже, чем у Л17 и сорта-стандарта Саратовская 76. По массе 1000 зерен Л16 уступила как Л17, так и Саратовской 76. Анализ элементов продуктивности главного колоса показал, что замещение 3R(3D) у Л16 значительно уменьшило длину колоса, повысив его плотность, и практически не повлияло на количество колосков и зерен в колосе и массу зерна с колоса. По содержанию белка в зерне линия Л16 значительно не отличалась ни от своего сибса Л17, ни от сорта Саратовская 76. Схожим образом не обнаружилось значимых различий по содержанию клейковины. Однако клейковина у Л16 была более слабой по сравнению как с Л17, так и с сортом Саратовская 76. По комплексному показателю SDS-седиментации Л16 уступила Л17, но незначимо различалась с сортом-стандартом. По показателям альвеографа у Л16 более низкие упругость теста и сила муки, но по сравнению с сортом-стандартом понижение силы муки незначимое. По объему хлеба Л16 с 3D(3R) имела большее значение, чем Саратовская 76, но незначимо отличалась от своего сибса Л17 с 3D3D. По пористости все три образца не отличались друг от друга. В целом по комплексу хозяйственно ценных признаков линия яровой мягкой пшеницы Л16 (3R(3D)) требует дальнейшей работы по улучшению ее селекционной ценности.
Ключевые слова: тритикале Satu; почти изогенные линии мягкой пшеницы; замещение 3R(3D); устойчивость к листовой и стеблевой ржавчин; влияние на продуктивность и качество зерна

Для цитирования: Сибикеев С.Н., Адонина И.Г., Дружин А.Е., Фитилева З.Е., Баранова О.А. Пребридинговые исследования почти изогенных линий яровой мягкой пшеницы, отличающихся по наличию/отсутствию хромосомного замещения 3R(3D) от сорта тритикале Satu. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(6): 779-788. doi 10.18699/vjgb-25-85

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

Prebreeding studies of near-isogenic spring bread wheat lines, differing by presence or absence of the 3R(3D) chromosomal substitution from the triticales cultivar Satu

S.N. Sibikeev , I.G. Adonina , A.E. Druzhin , Z.E. Fitileva , O.A. Baranova 

¹ Federal Center of Agriculture Research of the South-East Region, Saratov, Russia

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

³ All-Russian Research Institute of Plant Protection, Pushkin, St. Petersburg, Russia

 sibikeev_servey@mail.ru

Abstract. One of the sources of resistance to leaf and stem rust pathogens for bread wheat is the Australian spring triticale cultivar Satu, which carries highly effective linked *SrSatu/LrSatu* genes localized on chromosome 3R. However, they are little used in the practical breeding of *Triticum aestivum* L. The main reason for that is a low level of knowledge regarding the 3R(3D) chromosomal substitution. This paper presents the results of a comparative study of the agronomic value of near-isogenic spring bread wheat siblings, L16 and L17 = Satu/Saratovskaya 70//Saratovskaya 74/3/Saratovskaya 74, differing by presence (L16 (3R(3D))) or absence (L17 (3D3D)) of chromosome 3R from Satu in 2023–2024. The 3R(3D) chromosomal substitution in L16 was detected by cytogenetic analysis combining GISH with labeled *Secale cereale* genomic DNA and FISH with probes pSc119.2, pAs1. Line L16 is highly resistant to *Puccinia triticina* and *P. graminis*, including the Ug99 race. PCR analysis with DNA markers of *Sr* genes revealed the non-identity of the resistance gene in L16 to *Sr* genes: *Sr2*, *Sr24*, *Sr25*, *Sr28*, *Sr31*, *Sr32*, *Sr36*, *Sr38*, *Sr39*, *Sr47* and *Sr57*. L16 was inferior to both L17 and the standard cultivar Saratovskaya 76 in terms of 1,000-grain weight. An analysis of productivity elements of the main ear revealed that the 3R(3D) substitution in L16 significantly reduced the length of the ear, increased the density of the ear and did not significantly affect the number of spikelets and the number of grains per ear and the grain weight per ear. The grain protein content in L16 did not significantly differ from its L17 siblings or Saratovskaya 76. Similarly, there were no significant differences in gluten content. However, gluten in L16 was weaker in comparison with line L17 and Saratovskaya 76. According to the complex trait of SDS sedimentation, L16 was inferior to L17, but did not significantly differ from the standard cultivar. According to the alveograph, L16 had significantly lower dough elasticity and flour strength, but in comparison with the standard cultivar, the decrease in flour strength was not significant. L16 showed a higher bread volume than Saratovskaya 76, but did not significantly differ from its L17 sibling. There was no difference in porosity for all three samples. In general, in terms of the complex of agronomically valuable traits, the spring bread wheat line L16 (3R(3D)) requires further work to improve its breeding value.

Key words: triticale Satu; near isogenic lines of bread wheat; 3R(3D) substitution; resistance to leaf and stem rust; influence for productivity and grain quality

For citation: Sibikeev S.N., Adonina I.G., Druzhin A.E., Fitileva Z.E., Baranova O.A. Prebreeding studies of near-isogenic spring bread wheat lines, differing by presence or absence of the 3R(3D) chromosomal substitution from the triticale cultivar Satu. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(6):779-788. doi 10.18699/vjgb-25-85

Введение

Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) относится к основным продовольственным культурам. Из общего мирового производства зерна на долю пшеницы приходится свыше 27 %. По площади посевов она занимает одно из первых мест среди других зерновых культур и составляет важнейший продукт питания для трети населения земного шара. Интенсивная селекция на повышение продуктивности в XX веке привела к значительному обеднению генофонда этой культуры по генам устойчивости к болезням и вредителям (Дымченко и др., 1990).

По своим биологическим особенностям патогены обладают большой генетической изменчивостью, и для преодоления гена устойчивости растения-хозяина достаточно двух-трех эпифитотий и площади 50–100 тыс. гектаров посева. В настоящее время в зонах выращивания мягкой пшеницы основными болезнями продолжают оставаться стеблевая, листовая и желтая ржавчины, мучнистая роса, септориоз листьев и колоса, различные виды вирусной инфекции. Восприимчивость сортов мягкой пшеницы к болезням приводит к огромным потерям в урожае зерна и снижению показателей качества (Сибикеев, Крупнов, 2007).

Дикие родственники мягкой пшеницы обладают многими генами, представляющими агрономический интерес, и могут быть ценными источниками устойчивости к болезням, насекомым и экстремальным факторам окружающей среды (Сибикеев и др., 2019). Для защиты мягкой пшеницы от патогенов, и в первую очередь от ржавчинных болезней, широко привлекают гены устойчивости, локализованные в чужеродных хромосомах и транслокациях. Так, 39 из 82 идентифицированных генов *Lr* перенесе-

ны от «дикарей», 26 из 63 генов *Sr* интрогрессированы (McIntosh et al., 2013, 2018, 2022). Из *Secale cereale* L. перенесены и идентифицированы гены: *Sr27*, *Sr31*, *Sr50*, *SrIRS^{Amigo}* (McIntosh et al., 2013), а от тритикале – *SrSatu*, *SrBj*, *SrNin*, *SrLal*, *SrLa2* и *SrVen* (McIntosh et al., 1995; Adhikari, 1996).

Один из доноров устойчивости к возбудителям листовой и стеблевой ржавчин для мягкой пшеницы – австралийский сорт ярового тритикале Satu, несущий высокоэффективные сцепленные гены *SrSatu/LrSatu*, локализованные в хромосоме 3R. Причем *SrSatu* предположительно является аллельным гену *Sr27*, обнаруженному во многих сортах тритикале (McIntosh et al., 1995). Ген *SrSatu* высокоэффективен против рас *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* Erikss. & Henning из США, Кении и ЮАР, в том числе линейки расы Ug99, а именно – к ТТКСК, ТТКСТ, ТТТСК, ТРТТФ, ТТТТФ, РКQQC, QTHJC, ТРМКС, ТКТТФ, МССFC (Rahmatov et al., 2016). В Российской Федерации ген *SrSatu* эффективен к популяциям *P. graminis* Среднего и Нижнего Поволжья и Северо-Западного региона (Baranova et al., 2023; Баранова и др., 2024). Однако *SrSatu* крайне редко используется в селекции мягкой пшеницы. Главная причина – малая изученность влияния хромосомы 3R с генами *SrSatu/LrSatu* на цитологическую стабильность и показатели продуктивности зерна, качества муки и хлеба.

Для использования чужеродных замещений и транслокаций в селекции необходимы пребридинговые исследования, которые определяют их стабильность в геноме, влияние на адаптационные свойства растений, а также на элементы продуктивности, урожайности зерна и качества конечной продукции (Сибикеев, Дружин, 2015).

Цель наших исследований – по результатам изучения почти изогенных линий-сисбов яровой мягкой пшеницы Л16 (3R(3D)) и Л17 (3D3D) определить их цитологическую стабильность и перспективность для практической селекции как по эффективности против ржавчинных заболеваний, так и по влиянию на продуктивность зерна и качество муки и хлеба.

Материалы и методы

Используемый материал включал почти изогенные линии-сисбы яровой мягкой пшеницы Л16 и Л17, полученные от скрещивания устойчивого к возбудителям листовой и стеблевой ржавчины австралийского сорта ярового гексаплоидного тритикале Satu и восприимчивых к указанным видам ржавчины сортов яровой мягкой пшеницы Саратовская 70 и Саратовская 74. Родословная: Satu/Саратовская 70//Саратовская 74/3/Саратовская 74. Линии-сисбы Л16 и Л17 созданы с применением метода принудительных гетерозигот. В гетерозиготном состоянии они поддерживались до седьмого поколения, затем в течение трех поколений достигали и подтверждали гомозиготность растений сисбов. Обе линии принадлежат к разновидности альбидум, различаются по устойчивости к возбудителям листовой и стеблевой ржавчин (Л16 – устойчивая, Л17 – восприимчивая к ржавчинам). Таким образом, маркерными признаками наличия генов *SrSatu/LrSatu* от тритикале в Л16 были устойчивость к возбудителям листовой и стеблевой ржавчин. Для характеристики продуктивности зерна и качества муки и хлеба линии Л16 и Л17 сравнивали между собой, а также с сортом яровой мягкой пшеницы Саратовская 76 – стандартом, принятым Госкомиссией Российской Федерации по испытанию и охране селекционных достижений по Саратовской области.

Цитогенетические исследования. Анализ кариотипа линий проводили методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) зондов на основе повторяющихся последовательностей pSc119.2 (Bedbrook et al., 1980) и pAs1 (Rayburn, Gill, 1986) на митотических метафазных хромосомах. Препараты митотических хромосом готовили из меристемы корней проростков в соответствии с методикой (Badaeva et al., 2017). Для FISH применяли методику, описанную в работе (Salina et al., 2006), с незначительными модификациями. Геномную *in situ* гибридизацию (GISH) с использованием меченой геномной ДНК *S. cereale* в качестве зонда в сочетании с 10–30-кратным избытком немеченой фрагментированной ДНК *T. aestivum* осуществляли в соответствии с работой (Schubert et al., 1998). Препараты изучали с помощью микроскопа Axio Imager M1 (Zeiss, Германия), оснащенного цифровой камерой ProgRes MF CCD (Jenoptik, Германия) с использованием программы анализа изображения Isis (Meta Systems, Германия). Работы выполняли в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (Новосибирск, Россия).

Оценку цитологической стабильности проводили при изучении поведения хромосом в микроспорогенезе в мейозе. Стадии мейоза в микроспорогенезе изучали на временных давленных препаратах пыльников. Колосья линий Л16 и Л17 срезали до выхода из листовой оболочки и фиксировали в смеси 96 % этанола и ледяной уксусной кислоты (3:1). Через сутки после фиксации материал пе-

реносили в 70 % этиловый спирт, где он хранился до проведения анализа при температуре +2–4 °С. В качестве красителя применяли реактив Шиффа. Для каждой линии исследовали 100–200 микроспороцитов стадий мейоза (метафаза I и II, анафаза I и II, телофаза I и II, тетрады). Слайды изучались на микроскопе Axio Scope A 1 (Carl Zeiss) с объективами N-ACHROPLAN 40x/0.65 и N-ACHROPLAN 100x/1.25 0;1.

Фитопатологические исследования. Так как линия Л17 отбиралась как восприимчивый к *P. triticina* и *P. graminis* сибс Л16, в фитопатологических исследованиях использовали только Л16. Для оценки устойчивости линии Л16 к возбудителю стеблевой ржавчины в лабораторных условиях Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений брали популяции, собранные в 2022 г. в Арском районе Республики Татарстан (с сорта Надира) и Самойловском районе Саратовской области (с сорта Воевода). Анализ вирулентности *P. graminis* f. sp. *tritici* проводили с использованием стандартного набора из 20 линий-дифференциаторов: *Sr5*, *Sr21*, *Sr9e*, *Sr7b*, *Sr11*, *Sr6*, *Sr8a*, *Sr9g*, *Sr36*, *Sr9b*, *Sr30*, *Sr17*, *Sr9a*, *Sr9d*, *Sr10*, *SrTmp*, *Sr24*, *Sr31*, *Sr38*, *SrMcN*, а также дополнительных линий с генами *Sr*: *Sr2compl*, *Sr8b*, *Sr12*, *Sr13*, *Sr15*, *Sr20*, *Sr22*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr27*, *Sr28*, *Sr29*, *Sr32*, *Sr33*, *Sr35*, *Sr37*, *Sr39*, *Sr40*, *Sr44*, *SrWLD*, *Sr24+31*, *Sr36+31*, *Sr24+36*, *Sr7a+12*, *Sr17+13*, *Sr7b+18*, *Sr26+9g* и *Sr33+5* и сортов Аврора (*Sr31*) и Хакасская (восприимчивый контроль). Анализ вирулентности популяций патогена с сортов Надира и Воевода описан нами ранее (Babanova et al., 2023).

Размножение популяций возбудителя стеблевой ржавчины и анализ растений на устойчивость на стадии проростков осуществляли по методикам, принятым в мировой практике (Jin et al., 2007). Реакцию проростков на инокуляцию суспензией спор возбудителя стеблевой ржавчины проводили на 12-е сутки по стандартной 4-балльной шкале Е.С. Stakman с коллегами (1962). Об устойчивости/восприимчивости образца судили на основании типов реакции в двух повторностях. Устойчивыми считали растения с типами реакции «0», «0;», «1», «2»; восприимчивыми – «3», «4», «X».

Устойчивость к расе Ug99 (ТТКСК) была проверена на стадии взрослого растения в 2023 г. в фитопатологических питомниках растений Международного центра улучшения качества кукурузы и пшеницы (CIMMYT) в Кении, в Научно-исследовательской организации сельского хозяйства и животноводства (KALRO) в Нджоро (Njoro). Для оценки реакции растений использована модифицированная шкала Кобба (Peterson et al., 1948). Основной отличительной чертой патотипов расы Ug99 является вирулентность по отношению к носителям гена *Sr31*. Степень повреждения сортов с геном *Sr31* в KALRO в фитопатологических питомниках растений в вегетационный период 2023 г. была: для сорта Прохоровка (*Sr31*) – 60 % (60MSS), для сорта Юго-Восточная 2 (*Sr31*) – 80 % (80S), для сорта Саратовская 74 (без идентифицированных генов *Sr*) – 80 % (80S), Саратовская 70 (без идентифицированных генов *Sr*) – 40 % (40MSS).

Молекулярно-генетический анализ. Для ПЦР-анализа ДНК выделяли из пятидневных проростков пшеницы методом СТАВ с применением цетилтриметиламмоний-

бромиды (Murray, Thompson, 1980). Для идентификации генов устойчивости (*Sr2*, *Sr24*, *Sr25*, *Sr28*, *Sr31*, *Sr32*, *Sr36*, *Sr38*, *Sr39*, *Sr47* и *Sr57*) использовали ДНК-маркеры, рекомендованные для маркер-ориентированной селекции (MAS): *Sr2* – CAPS-маркер *csSr2* (Mago et al., 2011); *Sr24/Lr24* – STS-маркеры *Sr24#12* и *Sr24#50* (Mago et al., 2005); *Sr25/Lr19* – STS-маркер *Gb* (Prins et al., 2001); *Sr26* – STS-маркер *Sr26#43* (Mago et al., 2005); *Sr28* – DaRT-маркер *wPt-7004-PCR* и SSR-маркер *Xwmc332* (Rouse et al., 2012); *Sr31/Lr26* – STS-маркер *SCM9* (Weng et al., 2007); *Sr32* – STS-маркер *csSr32#2* (Mago et al., 2013); *Sr36* – SSR-маркер *Xstm773-2* (Tsilo et al., 2008); *Sr38/Lr37* – STS-маркер *VENTRIUP-LN2* (Helguera et al., 2003); *Sr39/Lr35* – STS-маркер *Sr39#22* (Mago et al., 2009); *Sr47* – *Xgwm501*, *Xgprw4043* (Faris et al., 2008; Klindworth et al., 2012); *Sr57/Lr34* – STS-маркер *csLV34* (Lagudah et al., 2006).

Аmplификацию осуществляли на амплификаторах C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Сингапур), разделение продуктов амплификации проводили в 2 % агарозных и 8 % полиакриламидных гелях, окрашенных бромистым этидием. Положительным контролем служили изогенные линии и сорта с известными генами *Sr*, негативным контролем – восприимчивый сорт Хакасская, контролем на контаминацию – ПЦР-смесь без добавления ДНК. В качестве маркера молекулярного веса использовали GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (Fementas GmbH, St. Leon-Rot, Германия). Визуализацию продуктов амплификации проводили с помощью геледокументирующей системы ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad). ПЦР ставили в двух повторностях.

Оценка показателей продуктивности зерна, физических и хлебопекарных свойств теста и хлеба у линий Л16, Л17 и сорта-стандарта Саратовская 76 выполнена в 2023 и 2024 гг. Экспериментальный материал рандомизированно высевали на делянках площадью 7 м² в трехкратной повторности на экспериментальном поле ФАНЦ Юго-Востока (г. Саратов). Норма посева – 400 зерен на 1 м².

Кроме фенологических наблюдений и прямой оценки урожайности зерна, осуществлялись исследования элементов продуктивности главного колоса: длина колоса, количество колосков и зерен, вес зерна с колоса, плотность колоса, озерненность колоска (как обобщенный показатель фертильности), которые определяли у 15 колосьев изучаемых линий и сорта-стандарта. Качество муки и хлеба оценивали по содержанию сырой клейковины, крепость которой определяли на приборе «Измеритель деформации клейковины – ИДК-3М» (ООО «ПЛАУН», Россия), а также по показателям альвеографа Шопена (Chopin Technologies, Франция) с выпечкой опытных образцов хлебцев. Содержание белка в зерне урожая 2023 и 2024 гг. определяли на анализаторе зерна Foss Infratec TM 1241 (Foss Analytical A/S).

Метеорологическая характеристика лет выращивания по ГТК (гидротермический коэффициент) Селянинова (www.agrometeo.online/articles/gtk.htm, дата обращения 28.01.2025) по месяцам вегетационного периода показала следующее: в 2023 г. ГТК за май составил 0,8, июнь – 1,1, июль – 0,6 и август – 0,4. В 2024 г. ГТК за апрель составил 0,3, май – 0,1, июнь – 0,8 и июль – 0,1. Из двух лет

исследований по метеоусловиям наиболее благоприятным был 2023 г. В оба года исследований наблюдались эпифитотии листовой ржавчины.

Полученные данные по линиям Л16 и Л17 и сорту-стандарту Саратовская 76 подвергли однофакторному дисперсионному анализу со множественными сравнениями по Дункану, а также провели анализ взаимодействия «генотип–среда» с использованием пакета селекционно-генетических программ Agros-2.09 (Мартынов, 1999).

Результаты

Цитогенетический анализ линий яровой мягкой пшеницы Л16 и Л17

Кариотипирование линий осуществляли методом FISH с использованием для идентификации хромосом комбинации зондов *pSc119.2* и *pAs1* (Schneider et al., 2003). Цитогенетический анализ линии Л16 показал отсутствие пары хромосом 3D (они определяются по характерным сигналам *pAs1*) (рис. 1, а) и выявил пару крупных хромосом с яркими сигналами *pSc119.2* на концах плеч, что характерно для хромосом ржи 3R. Хромосомное замещение 3R(3D) у линии Л16 было также подтверждено при проведении GISH с ДНК *S. cereale* в качестве зонда (см. рис. 1, а). Анализ линии Л17 никаких хромосомных перестроек не показал (см. рис. 1, б).

Цитологическая стабильность линий Л16 и Л17

Главный фактор, ограничивающий практическое применение отдаленных гибридов, – их нестабильность, ведущая к быстрой потере чужеродного генетического материала. В основе этой нестабильности лежат нарушения мейотического цикла гибридных растений, вызывающие формирование нефункциональных гамет (Орловская и др., 2015). Известно, что в геноме отдаленных гибридов и амфидиплоидов присутствуют системы генетического контроля мейоза разных родительских видов, которые не только самостоятельно действуют в гибридном геноме, но и взаимно влияют друг на друга (Naranjo et al., 1979; Lelley, Larter, 1980; Орловская и др., 2015). В связи с этим необходимо определять цитологическую стабильность как у отдаленных гибридов, так и у интрогрессивных линий. Так как линия Л16 характеризуется замещением 3R(3D), а хромосома 3D является носителем гена *Ph2* (McIntosh et al., 2013), есть основание ожидать у нее нарушения в мейотическом цикле. Кроме того, нами проведен сравнительный анализ стабильности мейоза у линий Л16 и Л17.

Для оценки стабильности мейоза используют интегральный показатель – мейотический индекс, который представляет собой процент нормальных тетрад к общему числу изученных клеток. Исследования показали у Л16 (3R(3D)) мейотический индекс – 95 %, в то время как у Л17 (3D3D) – 94 %, т. е. между линиями по этому показателю не было различий. При мейотическом индексе 90 % и выше растение считается цитологически стабильным, т. е. обе исследуемые линии являются стабильными. Однако у некоторых тетрад этих линий обнаружено 1–2 включения и найдены триады. В более ранних стадиях мейоза у обеих линий выявлены асинхронность, раннее расхож-

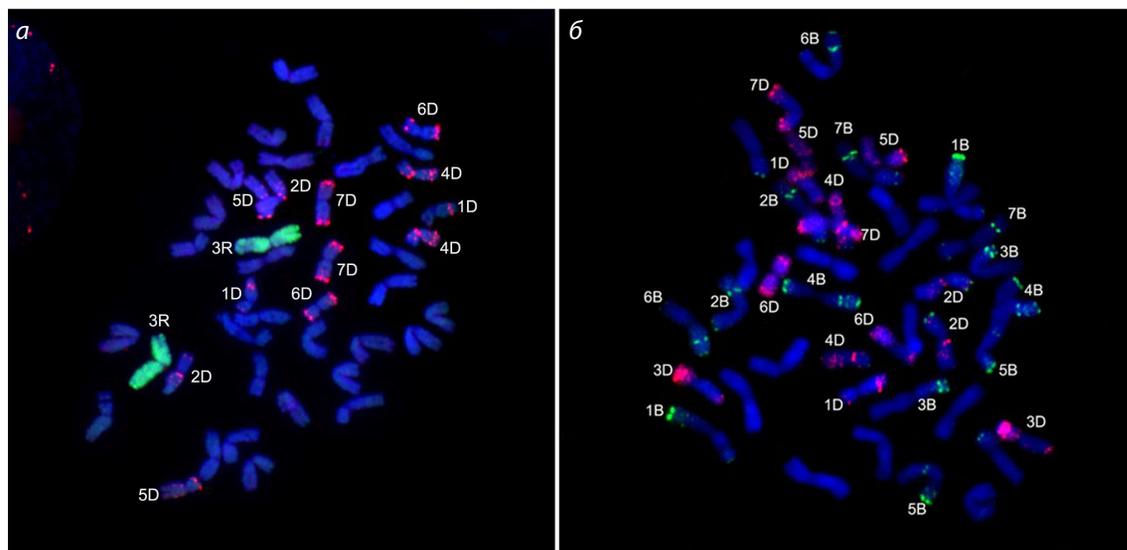


Рис. 1. Результаты *in situ* гибридизации с разными комбинациями проб на метафазных хромосомах линий яровой мягкой пшеницы Л16 (а) и Л17 (б).

Пробы: (а, б) рAs1 (красный сигнал); а – GISH с геномной ДНК *S. cereale* (зеленый сигнал); б – рSc119.2 (зеленый сигнал).

дение одного бивалента в метафазе 1, две отстающие хромосомы в анафазе 1 и две хромосомы, не включенные в ядра, в телофазе 1. В одноядерной пыльце у Л16 и Л17 обнаружена микропыльца – 1.5 и 2.1 % соответственно.

Фитопатологический анализ линии Л16 на устойчивость к возбудителям стеблевой и листовой ржавчин.

Идентификация генов устойчивости к стеблевой ржавчине с использованием молекулярных маркеров

Во время создания почти изогенных сибсов линия Л17 отбиралась как стабильно восприимчивая к возбудителям стеблевой и листовой ржавчин на всех стадиях роста растений (тип реакции ИТ = 33⁺) в условиях теплицы и поля. В связи с этим оценку на устойчивость к *P. graminis* f. *tritici* и *P. triticina* проводили на Л16 с замещением 3R(3D) и сорте-стандарте Саратовская 76 (табл. 1).

Необходимо отметить, что анализ вирулентности популяции *P. graminis* f. *tritici* с сорта Фаворит показал, что эффективны следующие гены и их комбинации: *Sr2compl*, *Sr13*, *Sr22*, *Sr26*, *Sr27*, *Sr31*, *Sr32*, *Sr33*, *Sr35*, *Sr39*,

Sr24+Sr31, *Sr36+Sr31*, *Sr26+Sr9g*, *Sr17+ Sr13*, *Sr33+ Sr5*. Популяция патогена с сорта Фаворит на линии с *Sr27* (ген, перенесенный от ржи посевной и локализованный в хромосоме 3R, широко присутствует в сортах тритикале (McIntosh et al., 1995)) давала тип реакции «2», а с популяцией с сортов Надира и Воевода – типы реакции «2⁺» и «1» соответственно.

Как видно из табл. 1, Л16 показала высокую устойчивость ко всем популяциям *P. graminis* f. *tritici*, включая расу Ug99. В условиях естественных эпифитотий *P. triticina* в 2023 и 2024 гг. Л16 проявила резистентность к местной саратовской популяции. При этом сорт-стандарт Саратовская 76 был восприимчив к популяциям как *P. graminis* f. *tritici* (исключение – популяции с сорта Надира ИТ = 0;), так и *P. triticina*.

Высокая устойчивость к обоим возбудителям ржавчин, ко всем популяциям патогенов из разных точек России и Кении делает резистентность к заболеваниям у Л16 привлекательной для дальнейшей селекционной работы. Необходимо отметить, что Л16 в фитопитомнике Нджоро

Таблица 1. Характеристика по устойчивости линии яровой мягкой пшеницы Л16 и сорта-стандарта Саратовская 76 к *P. graminis* f. *tritici* и *P. triticina* в поле (естественный инфекционный фон) и лаборатории (искусственное заражение)

Сорт, линия	Тип реакции на <i>P. graminis</i> f. <i>tritici</i>			Тип реакции на <i>P. triticina</i>		
	Популяции с сортов*			Ug99 (ТТКСК)**	Саратовская локальная популяция, поле***	
	Надира	Воевода	Фаворит		2023	2024
Саратовская 76	0;	3, 4	3	30MS	3	3
Л16	1	0;	0;	0	0;	0;

* Популяции *P. graminis* f. *tritici*, собранные с сортов яровой мягкой пшеницы Надира (Арский район, Татарстан), Воевода (Самойловский район, Саратовская область) и Фаворит (Аркадакский район, Саратовская область). Лабораторная оценка в стадии 3 листьев.

** Оценка на линейку патотипов расы Ug99 проводили в фитопитомнике Нджоро KALRO, Кения.

*** Оценка осуществлялась при естественных эпифитотиях *P. triticina* на экспериментальном поле ФАНЦ Юго-Востока, г. Саратов.

KALRO (Кения) показала также устойчивость к местной популяции *P. striiformis* f. sp. *tritici* West. – 5R, а сорт Саратовская 76 – 5M. Результаты идентификации генов *Sr* в анализируемой линии Л16 с использованием молекулярных маркеров для генов *Sr2*, *Sr24*, *Sr25*, *Sr28*, *Sr31*, *Sr32*, *Sr36*, *Sr38*, *Sr39*, *Sr47* и *Sr57* продемонстрировали их отсутствие.

Фенология и показатели продуктивности зерна, физических и хлебопекарных свойств теста и хлеба у линий Л16, Л17 и сорта-стандарта Саратовская 76

На рис. 2 приведены показатели периода «всходы–колошение», высоты растений, устойчивости к полеганию в вегетационные сезоны в 2023 и 2024 гг. у Л16, Л17 и сорта-стандарта. За вегетационные сезоны 2023 и 2024 гг. период «всходы–колошение» у линий сибсов Л16 и Л17 и сорта стандарта Саратовская 76 почти одинаков, и различия были незначимыми. Таким образом, замещение хромосомы 3D мягкой пшеницы на хромосому 3R от сорта ярового тритикале Satu почти не влияет на период «всходы–колошение». По высоте растений в 2023 г. линия Л16, сибс с замещением 3R(3D), была значимо ниже своей пары с нормальным составом 3D3D хромосом и

сорта-стандарта Саратовская 76, а в 2024 г. значимо ниже линии Л17, но находилась на уровне с сортом-стандартом.

Замещение хромосомы 3D на хромосому 3R привело к снижению высоты растения, что повлияло на оценку устойчивости к полеганию в вегетационный сезон 2023 г., которая была значимо выше у сибса с замещением 3R(3D) по сравнению с сибсовской парой и сортом-стандартом. В 2024 г. устойчивость к полеганию Л17 была значимо ниже Саратовской 76, а Л16 не отличалась ни от Л17, ни от сорта-стандарта. Однако Л16 с хромосомным замещением 3R(3D) по абсолютному значению устойчивости к полеганию превышала значение у линии Л17. Анализ взаимодействия «генотип–среда» между линиями Л16, Л17 и сортом Саратовская 76 по периоду «всходы–колошение», высоте растений и устойчивости к полеганию показал, что это взаимодействие незначимо. Сравнение линий Л16 и Л17 по продуктивности зерна и ее элементов у главного колоса позволило выявить влияние чужеродного замещения с хромосомой 3R на эти признаки (табл. 2). Установлено, что замещение 3R(3D) в оба года исследований понижало урожайность зерна по сравнению как с Л17 (3D3D), так и с сортом-стандартом Саратовская 76. Одним из факторов, который понизил продуктивность

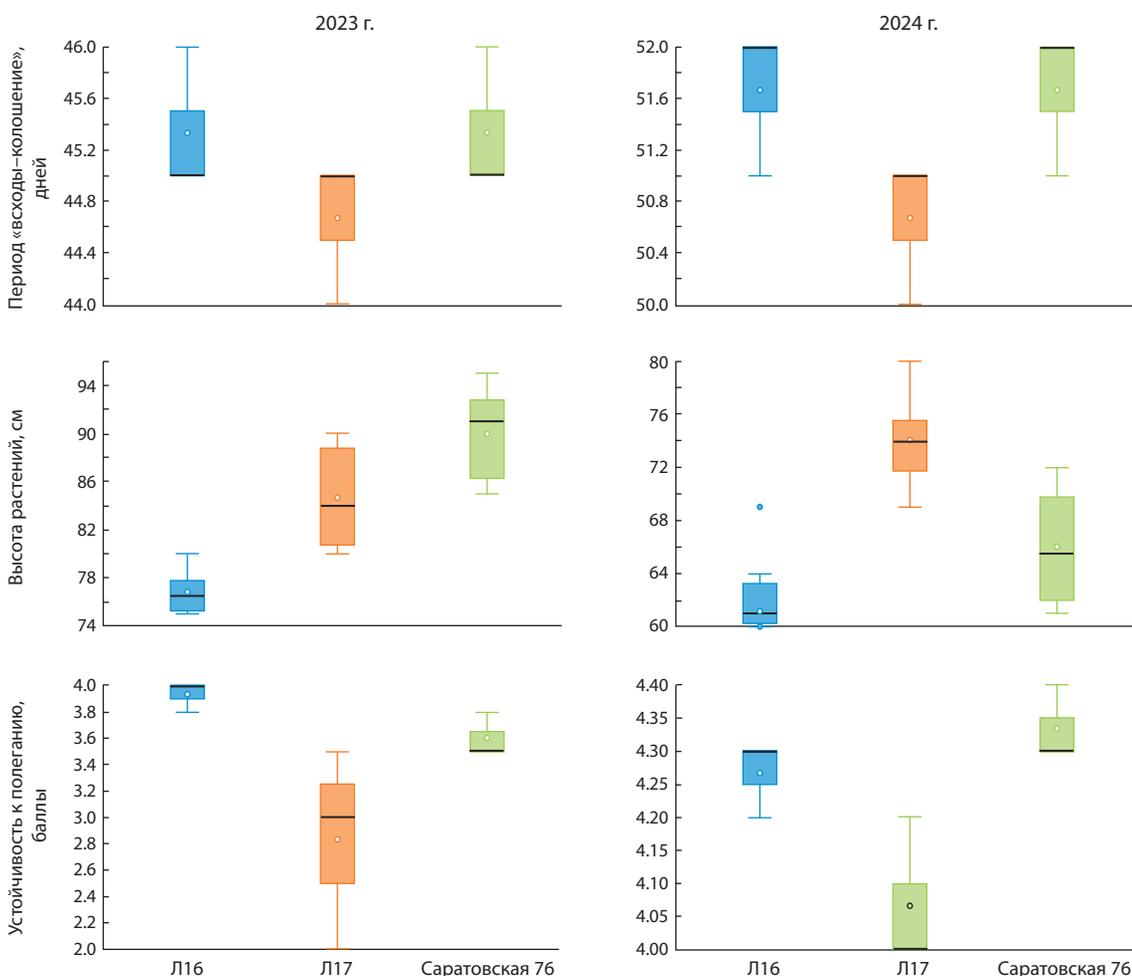


Рис. 2. Показатели периода «всходы–колошение», высоты растений, устойчивости к полеганию в вегетационные сезоны в 2023 и 2024 гг. у Л16, Л17 и сорта-стандарта Саратовская 76.

Таблица 2. Урожайность, масса 1000 зерен и элементы продуктивности главного колоса у линий яровой мягкой пшеницы Л16, Л17 и сорта Саратовская 76 за вегетационные сезоны 2023 и 2024 гг.

Сорт, линия	Элементы продуктивности главного колоса, в среднем за 2023–2024 гг.						Масса 1000 зерен, г			Урожайность зерна, т/га		
	Длина колоса, мм	Количество, шт. колосков	Количество, шт. зерен с колоса	Плотность колоса	Вес зерна с колоса, г	Озерненность колоска, шт.	2023 г.	2024 г.	Ср.	2023 г.	2024 г.	Ср.
Л16	67.8	17.3	42.4	2.4	1.3	2.5	32.7	29.6	31.2	2.078	1.698	1.888
Л17	92.8	16.5	39.4	1.7	1.5	2.4	40.0	38.0	39.0	2.569	2.565	2.567
НСР _{0,5} *	22.9	NS	NS	0.6	NS	NS	3.7	3.3	7.0	0.206	0.501	NS
С76	98.6	17.3	42.4	1.7	1.6	2.5	38.9	31.6	35.3	2.776	2.042	2.409
НСР _{0,5} **	23.5	NS***	NS	0.6	NS	NS	2.8	NS	3.5	0.622	0.300	NS

* Наименьшая существенная разница для 5 % уровня значимости между Л16 и Л17.

** Наименьшая существенная разница для 5 % уровня значимости между Л16 и Саратовской 76.

*** NS – различия отсутствуют.

Таблица 3. Показатели качества муки и хлеба у линий яровой мягкой пшеницы Л16, Л17 и сорта-стандарта Саратовская 76 в среднем за вегетационные сезоны 2023 и 2024 гг.

Сорт, линия	Белок в зерне, %	Клейковина		SDS, мл	Альвеограф*		Хлеб**			
		%	ИДК 3, ед. п.		P, мм	P/L	W, ед. а.	V, мл	пористость, балл	цвет мякиша
Л16	17.1	36.7	88	67	60	0.7	205	820	4.8	Белый
Л17	17.5	37.4	78	86	91	1.0	345	890	5.0	Белый
НСР _{0,5} **	NS*****	NS	8	13	20	NS	70	NS	NS	
С76	16.2	31.5	79	75	109	2.0	261	715	4.8	Белый
НСР _{0,5} ***	NS	NS	8	NS	25	NS	NS	100	NS	

* Показатели альвеографа: P – упругость теста, P/L – отношение упругости теста к растяжимости, W – сила муки; ** показатели оценки хлеба; V – объем хлеба; *** наименьшая существенная разница для 5 % уровня значимости между Л16 и Л17; **** наименьшая существенная разница для 5 % уровня значимости между Л16 и Саратовской 76; ***** NS – различия отсутствуют.

зерна, была более низкая масса 1000 зерен у Л16 в 2023 и 2024 гг. (см. табл. 2).

Анализ элементов продуктивности главного колоса показал, что замещение 3R(3D) уменьшает длину колоса, повысив при этом его плотность. Однако Л16 не отличалась от Л17 и сорта Саратовская 76 по количеству колосков, зерен и весу зерна с колоса. По озерненности колоска (обобщенный критерий фертильности) Л16 не отличалась ни от Л17, ни от сорта Саратовская 76. Анализ взаимодействия «генотип–среда» между линиями Л16, Л17 и сортом Саратовская 76 по всем показателям структуры продуктивности колоса, а также массы 1000 зерен и урожайности зерна продемонстрировал, что это взаимодействие незначимо.

По качеству муки и хлеба у изучаемых линий получены следующие результаты. По содержанию белка в зерне Л16 (3R(3D)) значимо не отличалась ни от своего сибса Л17 (3D3D), ни от сорта Саратовская 76. Схожим образом не обнаружилось значимые различия по содержанию клейковины. Однако клейковина у Л16 по показателям прибора ИДК-3М была более слабой по сравнению как с Л17, так и с Саратовской 76 (табл. 3).

По комплексному показателю SDS-седментации, характеризующему физические свойства теста, Л16 усту-

пила Л17, но незначимо различалась с сортом-стандартом Саратовская 76. По показателям альвеографа у Л16 значимо более низкие упругость теста и сила муки, но по сравнению с сортом-стандартом понижение силы муки незначимо (см. табл. 3). По объему хлеба Л16 имела большее значение, чем Саратовская 76, но незначимо отличалась от своего сибса Л17. По пористости все три образца достоверно не отличались друг от друга, но наивысший балл, 5.0, был у линии Л17. Замещение 3R(3D) не изменило цвет мякиша хлеба, Л16 (3R(3D)) имела белый мякиш, как Л17 (3D3D) и Саратовская 76.

Обсуждение

Как уже отмечалось выше, сорта тритикале привлекают селекционеров набором ценных для селекции мягкой пшеницы агрономических признаков, в том числе генов устойчивости к заболеваниям. Так, в тритикале выявлены гены устойчивости к возбудителю стеблевой ржавчины: *Sr27*, *SrSatu*, *SrBj*, *SrNin*, *SrLal*, *SrLa2* и *SrVen* (McIntosh et al., 1995; Adhikari, McIntosh, 1998). Причем гены *SrBj* и *SrVen* контролируют умеренную восприимчивость в стадии проростков в полевых условиях, а гены *SrLal*, *SrLa2* определяют устойчивость в стадии проростков как в полевых условиях, так и в условиях теплицы (Adhikari,

McIntosh, 1998). Гены *Sr27*, *SrSatu* контролируют устойчивость в течение всей вегетации растений (Singh, McIntosh, 1988). Несмотря на то что гены *Sr27* и *SrSatu* считают аллельными (Singh, McIntosh, 1988), они разные по эффективности к возбудителю стеблевой ржавчины. В настоящее время в саратовской популяции идет нарастание содержания вирулентных патотипов *P. graminis* f. *tritici* к гену *Sr27* (в 2016 г. – 10 %, в 2019 г. – 20 %, в 2020 г. – 90 %), в то время как не обнаруживаются патотипы, вирулентные к *SrSatu* (Конькова, 2021).

Результаты наших исследований гена *SrSatu* у Л16 подтверждают выводы о его эффективности. Более того, выявлена также эффективность против популяции *P. graminis* f. *tritici* с сорта Надира, собранной в Татарстане: IT = 1, в то время как у линии с *Sr27* IT = 2⁺. Результаты совпадают с данными испытания других линий яровой мягкой пшеницы, Л968 = Satu/S70//S74/3/S70/4/S70 и Л935 = Satu/S70//S70 с 3R(3D), от скрещиваний сорта тритикале Satu с сортами яровой мягкой пшеницы селекции ФАНЦ Юго-Востока линии показали тип реакции «0» на популяцию с сорта Надира (Баранова, неопубликованные данные) и оценку «-0» к расе Ug99 *P. graminis* f. *tritici* (Баранова и др., 2024). В наших исследованиях линия Л16 была устойчива также к саратовским популяциям *P. triticina* как во время выделения сибсов с 3R(3D) и 3D3D хромосомным составом, так и в полевых экспериментах в 2023 и 2024 гг.

Таким образом, гены *SrSatu/LrSatu* в хромосоме 3R у линии Л16 высокоэффективны против *P. graminis* f. *tritici* и *P. triticina* в популяциях из Нижневолжского и Средневолжского регионов, а также устойчивы к линейке патотипов Ug99 *P. graminis* f. *tritici*. Следовательно, при переносе хромосомы 3R от сорта тритикале Satu в генотипы яровой мягкой пшеницы линии Л16 не нарушилась экспрессия генов устойчивости *SrSatu/LrSatu*. Наши попытки идентификации генов *Sr* в анализируемой линии Л16 с использованием молекулярных маркеров для генов *Sr2*, *Sr24*, *Sr25*, *Sr28*, *Sr31*, *Sr32*, *Sr36*, *Sr38*, *Sr39*, *Sr47* и *Sr57* выявили их отсутствие. Было показано, что Л16 несет свой (*SrSatu*) неидентифицированный ген устойчивости. К сожалению, к настоящему времени нет ДНК-маркера для генов *Sr27* и *SrSatu* (McIntosh et al., 2013).

В наших исследованиях цитологической стабильности у линий Л16 и Л17 выявлен ряд нарушений во время прохождения фаз мейоза. Однако по мейотическим индексам у Л16 (3R(3D)) и Л17 (3D3D) – 95 и 94 % соответственно эти линии характеризуются как стабильные. Есть основания предполагать, что отсутствие гена *Ph2* у Л16 (нуллисомное состояние по хромосоме 3D) компенсировалось наличием хромосомы 3R ржи посевной и по стабильности фаз мейоза Л16 не отличалась от Л17.

К сожалению, в доступной нам литературе мы не нашли ни одного источника, где бы изучалось влияние хромосомы 3R от сорта тритикале Satu в генотипах яровой мягкой пшеницы на продуктивность зерна и качество муки, хлеба. Однако исследовано влияние хромосомы 3R от линии 86-741 (F₆ гексаплоидное тритикале Guangmai 74 (AABBRR)/Fan 6 (мягкая пшеница)). Ученые изучали 185 F₈ рекомбинантных инбредных линий от скрещивания сорта мягкой пшеницы Chuanmai 42 на линию 86-741.

Хромосома 3R идентифицировалась методами FISH и GISH (Wan et al., 2023). Обнаружено, что замещение 3R(3D) значительно уменьшает урожай зерна, массу 1000 зерен, количество колосьев на растение, вес зерна с колоса и нейтрально влияет на количество зерен с колоса (Wan et al., 2023).

В наших исследованиях также отмечено уменьшение массы 1000 зерен, урожайности зерна, но показаны нейтральное влияние на вес зерна с колоса, количество зерен с колоса, озерненность колоска и значимое повышение плотности колоса. Таким образом, есть некоторое расхождение по влиянию замещения 3R(3D) на вес зерна с колоса. Возможно, это вызывается различиями генотипа мягкой пшеницы, в котором изучалось это замещение. Кроме того, необходимо учитывать эффект нуллисомии по 3D. В норме 3D является носителем доминантного гена сферококкоидности *S-D1a* (McIntosh et al., 2013), соответственно, нуллисомное состояние этой хромосомы определяет рецессивное состояние гена *S-D1b*. Известно о плейотропном эффекте гена *S-D1b*, который уменьшает высоту растений, длину колоса, массу 1000 зерен, увеличивает плотность колоса (Sears, 1947, по: Salina et al., 2000). Все эти показатели мы отметили у линии Л16 (3R(3D)). Исходя из этого есть основание ожидать, что морфобиологические признаки у Л16 формируются при совместном влиянии рецессивного состояния гена *S-D1b* и прямого действия хромосомы 3R.

Отсутствие хромосомы 3D и наличие хромосомы 3R у Л16 повлияло на показатели качества муки и хлеба. В основном произошло ухудшение этих показателей по сравнению с Л17. Значимо понизились показатель SDS седиментации, упругость теста и сила муки. По остальным признакам – «содержание белка в зерне», «содержание и крепость клейковины» (по прибору ИДК-3М), «отношение упругости к длине теста», «объем хлеба» и «пористость» – отмечено незначимое понижение.

Заключение

Линия яровой мягкой пшеницы Л16 (3R(3D)) несет высокоэффективные гены устойчивости к возбудителям листовой и стеблевой ржавчин, привлекательные для селекции на иммунитет к патогенам мягкой пшеницы в РФ. Однако в целом по комплексу хозяйственно ценных признаков эта линия требует дальнейшей работы по ее улучшению. Это возможно при уменьшении количества чужеродного материала, т.е. за счет получения рекомбинаций или транслокаций между хромосомами мягкой пшеницы и хромосомой 3R, а также подбора генотипа мягкой пшеницы, который будет компенсировать отрицательное влияние хромосомы ржи на продуктивность зерна и качество муки и хлеба.

Список литературы / References

- Баранова О.А., Адонина И.Г., Сибикеев С.Н. Молекулярно-цитогенетическая характеристика новых интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы, устойчивых к стеблевой ржавчине. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(4):377-386. doi 10.18699/vjgb-24-43
- [Baranova O.A., Adonina I.G., Sibikeev S.N. Molecular cytogenetic characteristics of new spring bread wheat introgressive lines resis-

- tant to stem rust. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2024;28(4):377-386. doi 10.18699/vjgb-24-43]
- Дымченко А.М., Назарова Л.Н., Жемчужина А.И. Перспективные и районированные сорта озимой пшеницы с разной устойчивостью к бурой ржавчине. *Селекция и семеноводство.* 1990;5:16-18
- [Дымченко А.М., Назарова Л.Н., Жемчужина А.И. Promising and released varieties of winter wheat differing in resistance to brown rust. *Seleksiya i Semenovodstvo = Breeding and Seed Industry.* 1990;5:16-18 (in Russian)]
- Конькова Э.А. Характеристика вирулентности возбудителя стеблевой ржавчины пшеницы в условиях Саратовской области. *Аграрный научный журнал.* 2021;8:23-27. doi 10.28983/asj.y2021i8pp23-27
- [Kon'kova E.A. Characteristics of the virulence of the wheat stem rust pathogen in the conditions of the Saratov region. *Agrarnyy Nauchny Zhurnal = The Agrarian Scientific Journal.* 2021;8:23-27. doi 10.28983/asj.y2021i8pp23-27 (in Russian)]
- Мартынов С.П. Статистический и биометрико-генетический анализ в растениеводстве и селекции. Пакет программ AGROS 2.09. Тверь, 1999
- [Martynov S.P. Statistical and Biometric Genetic Analysis in Crop Production and Breeding. AGROS Software Package, version 2.09. Tver, 1999 (in Russian)]
- Орловская О.А., Леонова И.Н., Адонина И.Г., Салина Е.А., Хотылева Л.В., Шумный В.К. Молекулярно-цитогенетический анализ линий тритикале и пшеницы с интрогрессиями генетического материала видов трибы Triticeae. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2015;19(5):552-560. doi 10.18699/VJ15.072
- [Orlovskaya O.A., Leonova I.N., Adonina I.G., Salina E.A., Khotyleva L.V., Shumny V.K. Molecular-cytogenetic analysis of triticales and wheat lines with introgressions of the tribe Triticeae species genetic material. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2015;19(5):552-560. doi 10.18699/VJ15.072 (in Russian)]
- Сибикеев С.Н., Дружин А.Е. Пребридинговые исследования почти изогенных линий яровой мягкой пшеницы с комбинацией транслокаций от *Agropyron elongatum* (Host.) P.B. и *Aegilops ventricosa* Tausch. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2015;19(3):310-315. doi 10.18699/VJ15.040
- [Sibikeev S.N., Druzhin A.E. Prebreeding research of near-isogenic lines of spring bread wheat with a combination of translocations from *Agropyron elongatum* (Host.) P.B. and *Aegilops ventricosa* Tausch. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2015;19(3):310-315. doi 10.18699/VJ15.040 (in Russian)]
- Сибикеев С.Н., Крупнов В.А. Эволюция листовой ржавчины и защита от нее пшеницы в Поволжье. *Вестник Саратовского государственного университета им. Н.И. Вавилова.* 2007;S(Спецвыпуск):92-94
- [Sibikeev S.N., Krupnov V.A. Evolution of leaf rust and protection from it in the Volga region. *Vestnik Saratovskogo Gosuniversiteta im. N.I. Vavilova = The Bulletin Saratov State Agrarian University in Honor of N.I. Vavilov.* 2007;S:92-94 (in Russian)]
- Сибикеев С.Н., Дружин А.Е., Гуляева Е.И., Андреева Л.В. Анализ влияния 4AS.4AL-7S#2S транслокации на продуктивность и качество зерна яровой мягкой пшеницы. *Успехи современного естествознания.* 2019;8:34-38. doi 10.17513/use.37179
- [Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Gulyaeva E.I., Andreeva L.V. Analysing effects of 4AS.4AL-7S#2S translocations upon yields and grain quality of spring milling wheat. *Uspekhi Sovremennogo Estestvoznaniya = Advances in Current Natural Sciences.* 2019;8:34-38. doi 10.17513/use.37179 (in Russian)]
- Adhikari K.N. Genetic studies of stem rust resistance in oat and triticale: Phd thesis. The University of Sydney, 1996
- Adhikari K.N., McIntosh R.A. Inheritance of wheat stem rust resistance in triticale. *Plant Breed.* 1998;117(6):505-513. doi 10.1111/j.1439-0523.1998.tb02199.x
- Badaeva E.D., Ruban A.S., Aliyeva-Schnorr L., Municio C., Hesse S., Houben A. *In situ* hybridization to plant chromosomes. In: Liehr T. (Ed.) *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH).* Springer Protocols Handbooks. Springer, 2017;477-494. doi 10.1007/978-3-662-52959-1_49
- Baranova O., Solyanikova V., Kyrova E., Kon'kova E., Gaponov S., Sergeev V., Shevchenko S., ... Tarhov A., Vasilova N., Askhadullin D., Askhadullin D., Sibikeev S. Evaluation of resistance to stem rust and identification of *Sr* genes in Russian spring and winter wheat cultivars in the Volga region. *Agriculture.* 2023;13(3):635. doi 10.3390/agriculture13030635
- Bedbrook R.J., Jones J., O'Dell M., Thompson R.J., Flavell R.B. A molecular description of telomeric heterochromatin in secale species. *Cell.* 1980;19(2):545-560. doi 10.1016/0092-8674(80)90529-2
- Faris J.D., Xu S.S., Cai X., Friesen T.L., Jin Y. Molecular and cytogenetic characterization of a durum wheat – *Aegilops speltoides* chromosome translocation conferring resistance to stem rust. *Chromosome Res.* 2008;16(8):1097-1105. doi 10.1007/s10577-008-1261-3
- Helguera M., Khan I.A., Kolmer J., Lijavetzky D., Zhong-qi L., Dubcovsky J. PCR assays for the *Lr37-Yr17-Sr38* cluster of rust resistance genes and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines. *Crop Sci.* 2003;43(5):1839-1847. doi 10.2135/cropsci2003.1839
- Jin Y., Singh R.P., Ward R.W., Wanyera R., Kinyua M., Njau P., Fetch T., Pretorius Z.A., Yahuaoui A. Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic *Sr* gene lines to race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Dis.* 2007;91(9):1096-1099. doi 10.1094/PDIS-91-9-1096
- Klindworth D.L., Niu Z., Chao S., Friesen T.L., Jin Y., Faris J.D., Cai X., Xu S.S. Introgression and characterization of a goatgrass gene for a high level of resistance to Ug99 stem rust in tetraploid wheat. *G3 (Bethesda).* 2012;2(6):665-673. doi 10.1534/g3.112.002386
- Lagudah E.S., McFadden H., Singh R.P., Huerta-Espino J., Bariana H.S., Spielmeier W. Molecular genetic characterization of the *Lr34/Yr18* slow rusting resistance gene region in wheat. *Theor Appl Genet.* 2006;114(1):21-30. doi 10.1007/s00122-006-0406-z
- Lelley T., Larter E.N. Meiotic regulation in triticale: interaction of the rye genotype and specific wheat chromosomes on meiotic pairing in the hybrid. *Can J Genet Cytol.* 1980;22:1-6
- Mago R., Bariana H.S., Dundas I.S., Spielmeier W., Lawrence G.J., Pryor A.J., Ellis J.G. Development of PCR markers for the selection of wheat stem rust resistance genes *Sr24* and *Sr26* in diverse wheat germplasm. *Theor Appl Genet.* 2005;111(3):496-504. doi 10.1007/s00122-005-2039-z
- Mago R., Zhang P., Bariana H.S., Verlin D.C., Bansal U.K., Ellis J.G., Dundas I.S. Development of wheat lines carrying stem rust resistance gene *Sr39* with reduced *Aegilops speltoides* chromatin and simple PCR markers for marker assisted selection. *Theor Appl Genet.* 2009;119(8):1441-1450. doi 10.1007/s00122-009-1146-7
- Mago R., Simkova H., Brown-Guedira H.G., Dreisigacker S., Breen J., Jin Y., Singh R., Appels R., Lagudah E.S., Ellis J., Dolezel J., Spielmeier W. An accurate DNA marker assay for stem rust resistance gene *Sr2* in wheat. *Theor Appl Genet.* 2011;122(4):735-744. doi 10.1007/s00122-010-1482-7
- Mago R., Verlin D., Zhang P., Bansal U., Bariana H., Jin Y., Ellis J., Hoxha S., Dundas I. Development of wheat – *Aegilops speltoides* recombinants and simple PCR-based markers for *Sr32* and a new stem rust resistance gene on the 2S#1 chromosome. *Theor Appl Genet.* 2013;126(12):2943-2955. doi 10.1007/s00122-013-2184-8
- McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F. (Eds) *Wheat Rusts. An Atlas of Resistance Genes.* CSIRO Australia, 1995. Available: https://bgri.cornell.edu/wp-content/uploads/2021/01/wheat_rust_atlas_full.pdf
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.C. *Catalogue of Gene Symbols for Wheat.* 12th International Wheat Genetics Symposium. 8-13 September 2013. Yokohama, Japan, 2013. Available: <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/2013/GeneCatalogueIntroduction.pdf>

- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Xia X.C., Raupp W.J. Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 2018 Supplement. *Annu Wheat Newsl.* 2018;64:73-93
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Xia X.C., Raupp W.J. Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 2022 Supplement. *Annu Wheat Newsl.* 2022;68:68-81
- Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 1980;8(19):4321-4325. doi 10.1093/nar/8.19.4321
- Naranjo T., Lacadena J.R., Giraldez R. Interaction between wheat and rye genomes on homologous and homoeologous pairing. *Z. Pflanzenzuchtg.* 1979;82:289-305
- Peterson R.F., Campbell A.B., Hannah A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals. *Can J Res.* 1948;26(5):496-500. doi 10.1139/cjr48c-033
- Prins R., Groenewald J.Z., Marais G.F., Snape J.W., Koebner R.M.D. AFLP and STS tagging of *Lr19*, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat. *Theor Appl Genet.* 2001;103(4):618-624. doi 10.1007/PL00002918
- Rahmatov M., Rouse M.N., Steffenson B.J., Anderson S.C., Wanyera R., Pretorius Z.A., Houben A., Kumarse N., Bhavani S., Johanson E. Sources of stem rust resistance in wheat-alien introgression lines. *Plant Dis.* 2016;100(6):1101-1109. doi 10.1094/PDIS-12-15-1448-RE
- Rayburn A.L., Gill B.S. Isolation of a D-genome specific repeated DNA sequence from *Aegilops squarrosa*. *Plant Mol Biol Rep.* 1986; 4:104-109. doi 10.1007/BF02732107
- Rouse M.N., Nava I.C., Chao S., Anderson J.A., Jin Y. Identification of markers linked to the race Ug99 effective stem rust resistance gene *Sr28* in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet.* 2012; 125(5):877-885. doi 10.1007/s00122-012-1879-6
- Salina E., Borner A., Leonova I., Korzun V., Laikova L., Maystrenko O., Roder M.S. Microsatellite mapping of the induced sphaerococoid mutation genes in *Triticum aestivum*. *Theor Appl Genet.* 2000; 100:686-689. doi 10.1007/s001220051340
- Salina E.A., Lim Y.K., Badaeva E.D., Scherban A.B., Adonina I.G., Amosova A.V., Samatadze T.E., Vatolina T.Y., Zoshchuk S.A., Leitch A. Phylogenetic reconstruction of *Aegilops* section *Sitopsis* and the evolution of tandem repeats in the diploids and derived wheat polyploids. *Genome.* 2006;49(8):1023-1035. doi 10.1139/g06-050
- Schneider A., Linc G., Molnar-Lang M., Graner A. Fluorescence *in situ* hybridization polymorphism using two repetitive DNA clones in different cultivars of wheat. *Plant Breed.* 2003;122(5):396-400. doi 10.1046/j.1439-0523.2003.00891.x
- Schubert I., Shi F., Fuchs J., Endo T.R. An efficient screening for terminal deletions and translocations of barley chromosomes added to common wheat. *Plant J.* 1998;14(4):489-495. doi 10.1046/j.1365-3113X.1998.00125.x
- Singh S.J., McIntosh R.A. Allelism of two genes for stem rust resistance in triticale. *Euphytica.* 1988;38:185-189. doi 10.1007/BF00040190
- Stakman E.C., Stewart D.M., Loegering W.Q. Identification of Physiologic Races of *Puccinia graminis* var. *tritici*. Washington, DC, USA: United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service, 1962. Available: https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/50620500/Cerealrusts/Pgt/Stakman_code_Pgt.pdf
- Tsilo T.J., Jin Y., Anderson J.A. Diagnostic microsatellite markers for detection of stem rust resistance gene *Sr36* in diverse genetic backgrounds of wheat. *Crop Sci.* 2008;48(1):253-261. doi 10.2135/cropsci2007.04.0204
- Wan H., Yang M., Li J., Wang Q., Liu Z., Zhang J., Li S., Yang N., Yang W. Cytological and genetic effects of rye chromosomes 1RS and 3R on the wheat-breeding founder parent Chuanmai 42 from southwestern China. *Mol Breed.* 2023;43(5):40. doi 10.1007/s11032-023-01386-0
- Weng Y., Azhaguvel P., Devkota R.N., Rudd J.C. PCR-based markers for detection of different sources of 1AL.1RS and 1BL.1RS wheat-rye translocations in wheat background. *Plant Breed.* 2007;126(5): 482-486. doi 10.1111/j.1439-0523.2007.01331.x

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 30.01.2025. После доработки 10.04.2025. Принята к публикации 19.05.2025.

doi 10.18699/vjgb-25-86

Вариабельность минерального состава зерна твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) в различных экологических условиях

И.Н. Леонова , П.Н. Мальчиков ^{1, 2}, Н.А. Виниченко¹, В.В. Пискарев ^{1, 3}, М.Г. Мясникова ², В.А. Апарина ^{1, 3}, Т.В. Чахеева ²

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

² Самарский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Самарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. Н.М. Тулайкова, п. г. т. Безенчук, Самарская область, Россия

³ Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции – филиал Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, р. п. Краснообск, Новосибирская область, Россия

 leonova@bionet.nsc.ru

Аннотация. Минеральный состав зерна пшеницы играет ключевую роль в определении его питательной ценности. В данной работе проведена оценка коллекции из 133 сортов и селекционных линий яровой твердой пшеницы отечественного и иностранного происхождения по содержанию в зерне макроэлементов (Ca, Mg, K), микроэлементов (Cu, Mn, Zn, Fe, Na) и токсичных металлов (Pb, Cd, Cr) при выращивании в экологических условиях Самарской и Новосибирской областей. Результаты показали широкий размах варьирования концентрации всех элементов в зависимости от генотипических различий между образцами и региона выращивания. Значительное превышение концентрации Ca и Mg в 3.1 и 1.5 раза соответственно отмечено у сортообразцов, выращенных в Самарской области. Культивирование образцов в условиях Новосибирской области сопровождалось превышением содержания Zn, Pb и Cr в зерне более чем в два раза. Статистический анализ содержания минеральных элементов у образцов различного происхождения свидетельствует о том, что российские селекционные линии достоверно превышают отечественные сорта по содержанию Mg, но при этом уступают по концентрации K, Cu и Mn. Сортообразцы иностранной селекции отличались от российских сортов и линий повышенным содержанием K и тяжелых металлов Cd и Cr. Анализ корреляций, проведенный на основании средних значений показателей по двум регионам, указывает на наличие высокодостоверных ($p < 0.001$) положительных взаимосвязей между содержанием микроэлементов Fe/Mn ($r^2 = 0.69$), Fe/Zn ($r^2 = 0.49$) и Zn/Mn ($r^2 = 0.46$), что предполагает возможность проведения отбора генотипов по нескольким элементам одновременно. Многомерный статистический анализ разделил образцы на две группы, одна из которых включала российские сорта и селекционные линии, а также часть иностранных образцов. Отдельный кластер состоял из семи российских селекционных линий, расположенных дистантно от остальных образцов, что предполагает их различия на генетическом уровне. Сравнение этих линий по минеральному составу показало, что линии в среднем характеризуются более высокими концентрациями Mg, K, Zn и Fe. Данные по содержанию микро- и макроэлементов в изученных сортообразцах яровой твердой пшеницы могут быть использованы для генетических исследований и практической селекции для улучшения существующих сортов по минеральному составу.

Ключевые слова: твердая пшеница; макроэлементы; микроэлементы; тяжелые металлы

Для цитирования: Леонова И.Н., Мальчиков П.Н., Виниченко Н.А., Пискарев В.В., Мясникова М.Г., Апарина В.А., Чахеева Т.В. Вариабельность минерального состава зерна твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) в различных экологических условиях. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(6):789-797. doi 10.18699/vjgb-25-86

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 23-16-00041 (<https://rscf.ru/project/23-16-00041>).

Благодарности. Размножение селекционных линий российских оригинаторов проведено в Центре коллективного пользования репродукции растений ИЦИГ СО РАН при поддержке бюджетного проекта FWNR-2022-0017.

Variability of the mineral composition of durum wheat grain (*Triticum durum* Desf.) under different environmental conditions

I.N. Leonova , P.N. Malchikov ^{1, 2}, N.A. Vinichenko¹, V.V. Piskarev ^{1, 3}, M.G. Myasnikova ², V.A. Aparina ^{1, 3}, T.V. Chaheeva ²

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

² Samara Federal Research Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Samara Scientific Research Agriculture Institute named after N.M. Tulaykov, Bezenchuk, Samara region, Russia

³ Siberian Research Institute of Plant Production and Breeding – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia

 leonova@bionet.nsc.ru

Abstract. The composition of wheat grain plays a key role in determining its nutritional value. In this work, a collection of 133 durum wheat varieties and breeding lines was assessed for the content of macroelements (Ca, Mg, K), microelements (Cu, Mn, Zn, Fe, Na) and toxic metals (Pb, Cd, and Cr) in grain under the environmental conditions of Samara and Novosibirsk regions in 2023. The results showed a wide range of variations in the concentration of all elements depending on genotypic differences between the samples as well as the growing region. Ca and Mg contents in the varieties grown in Samara region showed a significant excess of 3.1- and 1.5-fold, respectively. Zn, Pb, and Cr content in the varieties cultivated in Novosibirsk turned out to be two times as high. Statistical analysis of element concentrations in the varieties of different origin indicates that Russian breeding lines significantly outperform Russian cultivars in Mg content, while being inferior in K, Cu, and Mn. Compared to Russian cultivars and breeding lines, foreign varieties demonstrated higher contents of K and heavy metals Cd and Cr. Correlation analysis using mean values of indicators for two environments showed highly significant ($p < 0.001$) positive relationships between the content of microelements Fe/Mn ($r^2 = 0.69$), Fe/Zn ($r^2 = 0.49$), and Zn/Mn ($r^2 = 0.46$), which suggests a feasibility of selecting genotypes for several elements at once. Multivariate statistics divided the durum wheat collection into two groups, one of them including Russian cultivars and breeding lines as well as some foreign genotypes. A separate cluster included seven Russian breeding lines placed at a distance from the other varieties, which suggested their potential differences at the genetic level. Comparing these lines with respect to mineral composition showed that they were, on average, characterized by higher Mg, K, Zn, and Fe contents. The data obtained in this study can be used for genetic research and breeding to improve the grain mineral composition of the modern durum wheat varieties.

Key words: durum wheat; macroelements; microelements; heavy metals

For citation: Leonova I.N., Malchikov P.N., Vinichenko N.A., Piskarev V.V., Myasnikova M.G., Aparina V.A., Chaheeva T.V. Variability of the mineral composition of durum wheat grain (*Triticum durum* Desf.) under different environmental conditions. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(6):789-797. doi 10.18699/vjgb-25-86

Введение

Минеральные микро- и макроэлементы имеют большое значение в поддержании жизнедеятельности организма человека и оказывают существенное влияние на его здоровье. Функциональная роль большинства минеральных элементов разнообразна и заключается в участии в различных ферментативных реакциях в качестве кофакторов, в окислительно-восстановительных реакциях при переносе электронов, связывании и транспортировке кислорода в тканях, во взаимодействии молекул с рецепторными структурами клеток и регуляции экспрессии генов (Sigel et al., 2013; Jomova et al., 2022; Islam et al., 2023).

Несмотря на важную роль минеральных веществ, для нормального функционирования организма необходимы оптимальные дозы, поскольку как избыток, так и недостаток отдельных минералов может приводить к различным физиологическим расстройствам. Дефицит макроэлементов, таких как кальций, магний, калий, вызывает нарушение работы мышечной системы, изменение гормонального статуса и приводит к появлению злокачественных опухолей (Zoroddu et al., 2019; Ali, 2023). Дефицит железа, входящего в состав белков из класса гемопротеинов, таких как гемоглобин и ферменты метаболизма эндогенных соединений и ксенобиотиков, – одна из причин анемии, сердечно-сосудистых заболеваний и расстройств иммунной системы (Camaschella, 2019; Dixit et al., 2020). Недостаток потребления цинка влечет за собой задержку роста и полового развития, снижение иммунитета и различные психические нарушения (Hambidge, 2000). К симптомам дефицита меди можно отнести различные поражения суставов, нарушение пигментации кожи и волос (Olivares, Uauy, 1996). С другой стороны, избыточное потребление цинка, железа и меди может приводить к фиброзу и циррозу печени, нейродегенеративным расстройствам, нарушению иммунных и когнитивных функций и тяжелым формам анемии (Wessling-Resnick, 2017; Schoofs et al., 2024).

Кроме микро- и макроэлементов, необходимых для жизнедеятельности в оптимальных концентрациях, человек подвергается воздействию ряда токсичных металлов (свинец, кадмий, ртуть, хром, алюминий), которые могут поступать в организм через пищевые продукты и оказывать негативный эффект. К основным механизмам токсического действия тяжелых металлов относят митохондриальный апоптоз, вмешательство в различные сигнальные пути и окислительный стресс, изменение регуляции активности генов за счет различных повреждений ДНК, что приводит к развитию хронических заболеваний и возникновению раковых опухолей (Kiran et al., 2022; Jomova et al., 2025).

Основные источники поступления в организм человека минеральных веществ – пищевые продукты. Для большинства населения земного шара продукты питания, производимые из мягкой и твердой пшеницы, являются главным поставщиком белка, витаминов и минеральных веществ. Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L., $2n = 42$, геном AABBDD) принадлежит к числу наиболее ценных продовольственных зерновых культур и занимает ведущие позиции в большинстве стран мира. Ежедневное потребление продуктов из мягкой пшеницы дает человеку до 20 % необходимых калорий и до 10–15 % железа и цинка (Tadesse et al., 2019; Aghalari et al., 2022).

Твердая пшеница (*Triticum durum* Desf., $2n = 28$, геном AABB), в отличие от мягкой, является единственным сырьем для изготовления макаронных изделий высокого качества, с янтарным цветом и превосходным вкусом. Зерно твердой пшеницы характеризуется более высоким содержанием белка; значительное число культивируемых сортов твердой пшеницы превышает сорта мягкой пшеницы по содержанию цинка, железа, кальция, магния и других минеральных веществ (Cakmak et al., 2010; Del Coco et al., 2019; Saini et al., 2023). К основным производителям и потребителям продукции и зерна твердой пшеницы относятся страны Средиземноморского бассейна: Италия,

Турция, Греция, Тунис, Франция, где сосредоточено более 50 % занятых площадей. Среди других регионов выращивания твердой пшеницы крупными производителями являются Канада, США, Мексика, Индия и Казахстан. Россия до середины XX в. была одним из крупных производителей твердой пшеницы и занимала первое место в мире по площадям посевов, которые достигали 20 млн га (Martínez-Moreno et al., 2022; Мальчиков, Мясникова, 2023). Значительное сокращение посевов и сбора зерна произошло в начале 1990-х годов после распада СССР; в настоящее время занимаемые твердой пшеницей площади оцениваются в ~ 0.5 млн га, что составляет не более 1.7 % от мировых посевов (Гончаров, Курашов, 2018).

В последние годы большое внимание уделяется улучшению минерального состава зерна пшеницы. В рамках селекционных программ по биообогащению зерна пшеницы были созданы образцы мягкой пшеницы с генетически обусловленным повышенным содержанием цинка и железа (Khokhar et al., 2018; Virk et al., 2021; Tanin et al., 2024). Работы по получению биообогащенных селекционных линий мягкой пшеницы и поиску доноров высокого содержания белка, минералов и антиоксидантов ведутся и в Российской Федерации (Morgounov et al., 2022; Potarova et al., 2023; Gordeeva et al., 2024). Были систематизированы данные по многолетним испытаниям стародавних, современных сортов, селекционных и интрогрессивных линий мягкой пшеницы по признакам качества зерна и минеральному составу, на основании которых выделены образцы с целевыми признаками для использования в селекционных схемах (Shepelev et al., 2022; Orlovskaya et al., 2023; Leonova et al., 2024; Shamanin et al., 2024). Что касается твердой пшеницы, то аналогичные работы в области изучения генетического разнообразия российских сортов и селекционных линий по минеральному составу зерна практически отсутствуют (Потоцкая и др., 2023; Соколова и др., 2023).

Цель настоящей работы состояла в изучении генетической вариабельности коллекции сортов и селекционных линий яровой твердой пшеницы по содержанию в зерне микро- (цинк, железо, медь, марганец) и макроэлементов (кальций, магний, калий) и токсичных металлов (свинец, кадмий, хром) в экологических условиях Самарской и Новосибирской областей.

Материалы и методы

Растительный материал и условия полевых испытаний. В работе использована коллекция из 133 образцов твердой пшеницы, которая включала 35 российских сортов, 68 российских селекционных линий, 29 сортообразцов иностранного происхождения и туранскую пшеницу Хорасан (Приложение, табл. S1)¹. Среди российских селекционных линий 39 образцов создано в Самарском НИИСХ, 29 образцов имели происхождение из других селекционных центров. Образцы выращивали в условиях Новосибирской и Самарской областей в 2023 г. Посев образцов в условиях Новосибирской области проводили на поле СибНИИРС – филиала ИЦиГ СО РАН (54°58'51.4"N, 82°58'37.1"E). Почвы опытного участка представлены в

основном черноземами выщелоченными, средней мощности. Содержание гумуса в верхнем слое почвы составляет 5.7–6.9 %. По содержанию подвижных фосфатов и калия почвы высокообеспеченные. Содержание на 100 г почвы: P₂O₅ – 42 мг, K₂O – 35 мг. Содержание общего азота в почве перед посевом 0.31 мг/кг. Посев проводили 15 мая вручную в борозды на глубину 5–7 см. Размер делянки 0.4 м², в двух повторениях.

Экспериментальные поля Самарского НИИСХ, филиала СамНИЦ РАН, расположены в п. г. т. Безенчук (52°05'85.5"N, 49°02'55.9"E). Основная часть почв представлена обыкновенными черноземами, средне- и тяжелосуглинистого механического состава. Содержание гумуса составляет в среднем 4.8 %, азота – 5.9 мг/кг, фосфора – 279 мг/кг, калия – 203 мг/кг. Сортообразцы были посеяны рендомизированным размещением на делянках площадью 7.4 м². В качестве стандарта на обоих полях использован сорт Безенчукская 210.

Сравнение климатических условий вегетационного периода в регионах со среднемноголетними значениями продемонстрировало, что в 2023 г. в Новосибирской области отмечены повышенные температуры воздуха в течение всего вегетационного периода в среднем и лишь во второй декаде мая и августа температуры были ниже среднемноголетних (–1.3 и –2.0 °C к среднемноголетнему значению) (табл. S2). Самое значительное превышение (+8.4 °C) среднемноголетних значений температуры отмечено в первой декаде июня, при этом осадков за данный период выпало лишь 27.8 % от среднемноголетнего. В целом первая половина вегетационного периода (май–июнь) характеризовалась острой недостаточностью осадков (14.9 и 47.5 %), тогда как в июле осадков было в пределах нормы (102.1 %), а в августе – значительно больше среднемноголетних значений (167.6 %). В Самарской области в целом в период вегетации имел место дефицит осадков на фоне умеренных температур. За вегетацию – от всходов до восковой спелости – количество осадков составило 89.3 мм. За весь период вегетации наиболее благоприятные условия для продукционного процесса твердой пшеницы сложились в первой и третьей декадах июня в периоды выхода растений в трубку и колошения соответственно.

Определение содержания микро- и макроэлементов и тяжелых металлов. Зерно образцов твердой пшеницы анализировали по содержанию восьми микро- и макроэлементов (цинк, железо, медь, марганец, натрий, кальций, магний, калий) и трех токсичных металлов (свинец, кадмий и хром). Для этого к навеске зерна массой 300 мг добавляли 1 мл перекиси водорода (60 %) и 5 мл концентрированной азотной кислоты. Минерализацию проб проводили в микроволновой печи в течение 40 мин. Далее объем пробы доводили до 50 мл деионизированной водой и для измерения количества элементов пробу разводили в 50 раз. Анализ содержания химических веществ проводили методом атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС) с атомизацией в пламени на приборе ContrAA 800 D (Analytik Jena, Германия). Анализ каждого образца выполнен в 2-кратной повторности.

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ выполняли с использованием пакета про-

¹ Табл. S1–S4 Приложения см. по адресу:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx27.xlsx>

грамм Statistica v. 10 (StatSoft, Inc., США). Статистическая достоверность различий между средними значениями признака оценивали с помощью критериев Манна–Уитни и *t*-критерия Стьюдента. Показатели признаков выражены в виде средних значений (*M*) и стандартного отклонения (\pm SD). Для оценки влияния генотипа и факторов внешней среды использовали двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA, Analysis of Variance). Взаимосвязи между параметрами содержания различных элементов оценивали с помощью корреляций Спирмана. Для анализа полученных результатов методом главных компонент (principle component analysis, PCA) и построения дендрограммы задействована программа PAST v. 4.03 (Hammer et al., 2001). Для построения дендрограммы применяли метод UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean); для оценки достоверности кластеризации использовали тест перестановки в 1000 итераций.

Результаты

Оценка содержания минеральных элементов в зерне при выращивании сортообразцов твердой пшеницы в условиях двух регионов (Самарская и Новосибирская области) показала значительный диапазон варьирования концентраций всех элементов в образцах и различия по концентрации в зависимости от региона выращивания (табл. 1; табл. S1). Наиболее существенные региональные различия отмечены для таких элементов, как Ca и Mg, содержание которых в Самарской области превышало содержание этих элементов в Новосибирской области в 3.1 и 1.5 раза соответственно. Для образцов, выращенных в условиях Новосибирской области, установлено превышение по содержанию Zn, Pb и Cr в 2.5, 2.3 и 2.2 раза соответственно. Все различия по концентрации элементов в образцах пшеницы между регионами были достоверны ($p < 0.0001$), за исключением содержания Na (см. табл. 1), концентрация которого была одинакова. Распределение содержания большинства минералов у образцов, выращенных на обоих полях, было приближенным к нормальному, исключение составляло распределение по концентрации свинца на поле в Самарской области, которое было значительно смещено в сторону более низких значений.

Анализ ANOVA, использованный для оценки эффектов генотипа и факторов внешней среды на фенотипическое проявление признаков, установил, что основное влияние на содержание Ca и Zn оказывали полевые условия, при этом для концентрации Ca отмечен низкий недостоверный вклад генотипа (табл. S3). Наоборот, на содержание Na в зерне в основном влияли генотипические различия. Достоверный вклад генотипа показан для концентрации таких элементов, как Mg, K, Cu, Fe и Cd, который существенно превышал влияние факторов внешней среды.

Поскольку изучаемая коллекция состояла из нескольких групп образцов различного происхождения, то интересно было выяснить, отличаются ли эти группы по концентрации веществ. Из табл. 2 видно, что российские селекционные линии достоверно превышают отечественные сорта по содержанию Mg, но при этом уступают сортам по содержанию K, Cu и Mn. Сортообразцы иностранной селекции отличались от российских сортов и линий повышенным содержанием калия. Концентрация токсиче-

Таблица 1. Содержание микро- и макроэлементов и токсичных металлов (мг/кг) в зерне образцов твердой пшеницы при выращивании в экологических условиях Самарской и Новосибирской областей в 2023 г.

Элемент	Самарская область	Новосибирская область
Макроэлементы (<i>M</i> \pm SD)		
Ca	920.4 \pm 170.7****	297.4 \pm 116.9
Mg	1327.0 \pm 178.2***	891.4 \pm 276.8
K	3977.6 \pm 402.9***	4356.7 \pm 577.9
Микроэлементы (<i>M</i> \pm SD)		
Cu	3.2 \pm 0.9*	3.7 \pm 1.1
Mn	37.1 \pm 7.9**	27.0 \pm 6.5
Zn	25.8 \pm 8.1****	64.0 \pm 12.7
Fe	47.2 \pm 6.0***	42.2 \pm 8.8
Na	27.2 \pm 6.3 ^{ns}	27.3 \pm 12.1
Токсичные металлы (<i>M</i> \pm SD)		
Pb	0.23 \pm 0.05***	0.52 \pm 0.02
Cd	0.05 \pm 0.004***	0.03 \pm 0.002
Cr	0.82 \pm 0.05***	1.79 \pm 0.11

Примечание. Данные представлены в формате: среднее значение (*M*) \pm стандартное отклонение (SD); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns (non significant) – различия недостоверны.

ских элементов Cd и Cr была достоверно выше, в среднем в 1.9 и 1.8 раза, у иностранных сортообразцов в сравнении с российскими. Не выявлено достоверных различий между группами по концентрации Zn и Fe.

Согласно усредненным данным по двум регионам наиболее высокими показателями содержания Ca (> 700 мг/кг) отличались российские сорта Памяти Чеховича, Жемчужина Сибири, Аннушка, Краснокутка 13 и российские селекционные линии Л73, Л75 и Л76, созданные в Алтайском НИИСХ. По содержанию в зерне Mg можно выделить селекционные линии Л21, Л23, Л24, Л25 и Л26 Самарского НИИСХ, концентрация этого элемента превышала 2000 мг/кг. Российские сорта Аннушка, Безенчукская степная, Вольнодонская и образцы иностранного происхождения Нуретно и Tamaroi отличались высоким содержанием цинка и железа (> 54 и 51 мг/кг соответственно). Высокие концентрации Cd, в ряде случаев превышающие предельно допустимые концентрации, выявлены у иностранных образцов Tessadur, Achille, Fuego и селекционных линий Л51, Л56 (см. табл. S1). Также нужно отметить высокий уровень содержания таких элементов, как Mg (1598.2 мг/кг), K (4536.5 мг/кг) и Zn (56.1 мг/кг) в зерне древней пшеницы Хорасан, что подтверждает данные, полученные другими авторами, и свидетельствует о потенциале этого вида для повышения питательной ценности современных сортов твердой пшеницы (Bordoni et al., 2017).

Корреляционный анализ Спирмана, проведенный на основании средних значений показателей по двум регионам, указывает на наличие высокодостоверных положитель-

Таблица 2. Концентрация микро- и макроэлементов и токсичных металлов в зерне сортов и селекционных линий российского и иностранного происхождения (Самарская и Новосибирская области, 2023 г.)

Элемент (мг/кг)	Российские		Иностранные сортообразцы ^В
	сорта	селекционные линии ^А	
Ca	625.1 ± 398.3	626.2 ± 315.9	548.3 ± 336.3
Mg	1178.9 ± 330.8 ^{***b}	1225.1 ± 644.5 ^{***b}	1017.6 ± 317.4
K	4222.4 ± 718.2 ^{*a}	4026.5 ± 382.2 ^{****b}	4428.4 ± 456.1
Cu	3.73 ± 0.9 ^{****a}	3.15 ± 0.9 ^{***b}	3.76 ± 1.2
Mn	34.1 ± 8.2 ^{*a}	30.5 ± 9.1	33.2 ± 8.1
Zn	48.8 ± 19.4	43.9 ± 23.2	42.5 ± 21.6
Fe	43.9 ± 8.4	44.9 ± 7.2	44.9 ± 8.9
Na	28.5 ± 10.1 ^{****b}	29.1 ± 13.2 ^{****b}	21.6 ± 5.5
Pb	0.49 ± 0.19 ^{****ab}	0.35 ± 0.11	0.29 ± 0.01
Cd	0.035 ± 0.008 ^{****b}	0.030 ± 0.002 ^{****b}	0.064 ± 0.005
Cr	1.0 ± 0.4 ^{****b}	1.2 ± 0.6 ^{****b}	1.9 ± 0.6

Примечание. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. Буквы (a, b) указывают на статистически значимую разницу показателей между группами образцов. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

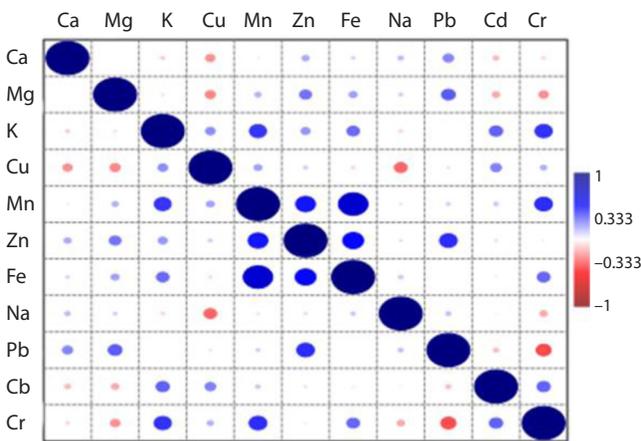


Рис. 1. Генотипические корреляции между концентрациями микро- и макроэлементов и токсичных металлов в зерне коллекции сортов и селекционных линий твердой пшеницы различного происхождения.

ных корреляций между содержанием Fe и Mn ($r^2 = 0.69$), Fe/Zn ($r^2 = 0.49$), Zn/Mn ($r^2 = 0.46$), Zn/Pb ($r^2 = 0.41$), Cr/K ($r^2 = 0.41$) (рис. 1, табл. S4). Низкие отрицательные связи отмечены между Cu/Ca, Cu/Mg, Cu/Na и Pb/Cr ($r^2 = -0.22$, -0.24 , -0.27 и -0.34 соответственно).

Результаты оценки содержания минеральных элементов в двух регионах были использованы для выявления возможной группировки образцов. Методом главных компонент (PCA) мы проанализировали взаимосвязь между концентрацией элементов в зерне и принадлежностью образцов к разным по происхождению группам: российские сорта, селекционные линии Самарского НИИСХ, селекционные линии других российских оригинаторов и иностранные сортообразцы (рис. 2).

В пространстве двух главных компонент, определяющих 64.7 и 18.7% генетической вариации соответственно, все изученные образцы разделяются на две группы. Боль-

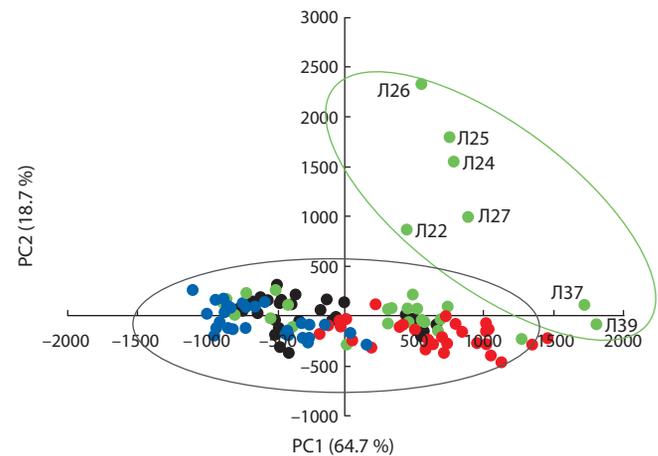


Рис. 2. Компонка образцов твердой пшеницы в пространстве двух главных компонент.

Образцы твердой пшеницы обозначены цветом: черным – российские сорта; синим – селекционные линии российских оригинаторов; зеленым – селекционные линии Самарского НИИСХ; красным – иностранные сортообразцы.

шинство образцов объединено в один большой кластер, при этом в левой части данного кластера группируются российские сорта твердой пшеницы, селекционные линии российских оригинаторов и частично линии Самарского НИИСХ. Сортообразцы иностранного происхождения находятся преимущественно в правой нижней части кластера. Семь линий, L22, L24, L25, L26, L27, L37 и L39, объединены в отдельную группу и достаточно далеко отстоят от остальных образцов, что может свидетельствовать о различиях на генетическом уровне. Сравнение этих линий по минеральному составу показало, что линии в среднем характеризуются более высокими концентрациями Mg, K, Zn и Fe (см. табл. S1).

Кластеризация образцов по методу UPGMA подтвердила наличие двух групп (рис. 3). Кластер 1 включает семь

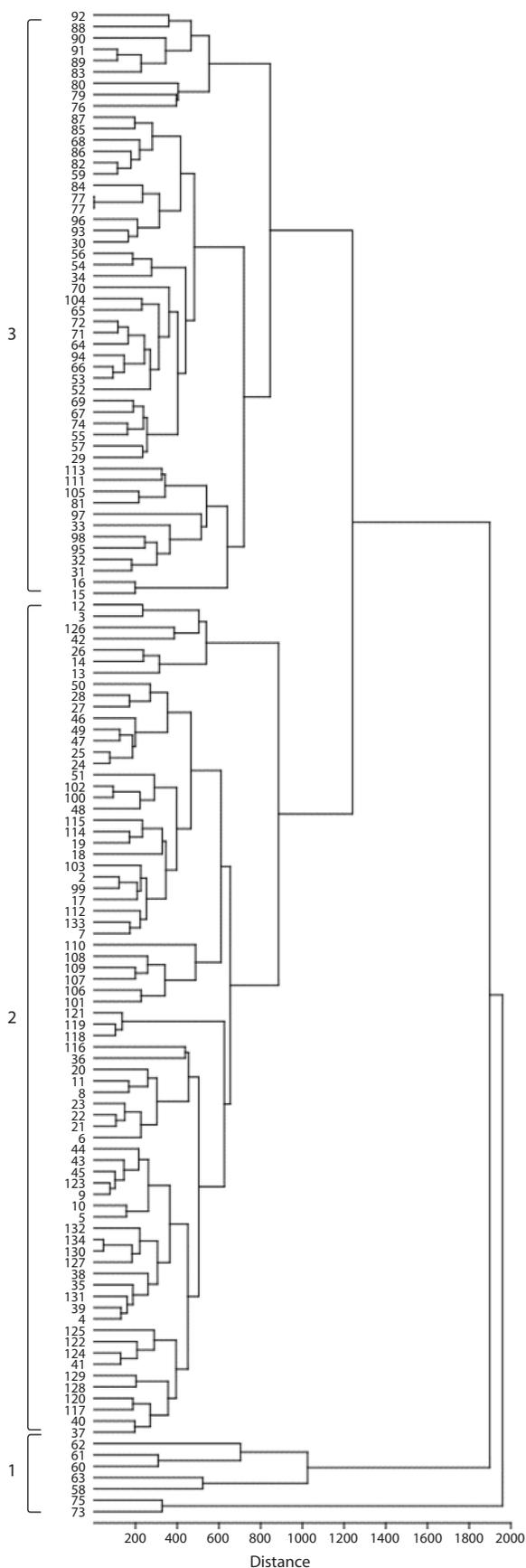


Рис. 3. Кластеризация образцов твердой пшеницы на основании результатов оценки концентрации 11 микро- и макроэлементов и токсичных металлов в зерне.

селекционных линий, Л22, Л24, Л25, Л26, Л27, Л37 и Л39, из Самарского НИИСХ и дистанционно отстоит от других образцов. Кластер 2 распадается на два субкластера (на рисунке обозначены как 2 и 3), один из которых включает в основном российские сорта и селекционные линии российских оригинаторов. Сортообразцы иностранной селекции группируются преимущественно в правой части субкластера 3.

Обсуждение

В данной работе мы исследовали концентрацию 11 микро- и макроэлементов и токсичных металлов в зерне коллекции образцов пшеницы, состоящей из российских и иностранных сортообразцов, выращенных в разных экологических условиях Самарской и Новосибирской областей. Для всех элементов показан высокий диапазон вариации, зависящий от влияния и генотипа, и условий внешней среды. Значительные региональные отличия выявлены нами по концентрации необходимых макро- и микроэлементов (Ca, K и Zn) и токсичных металлов (Pb, Cd и Cr) (см. табл. S1). Следует отметить, что размах варьирования K, Mg, Cu, Mn и Fe в обоих регионах был сравним с результатами И.В. Потоцкой с коллегами (2023), полученными при выращивании 20 российских и казахстанских сортов твердой пшеницы в Омской области. Исключение составляли параметры содержания Ca и Zn, концентрация которых была существенно выше для Ca и ниже для Zn на полях Омской области, в сравнении с Новосибирской областью.

Важным моментом является концентрация тяжелых металлов в зерне, поскольку, например, превышение в пищевых продуктах предельно допустимых концентраций (ПДК) таких необходимых для организма человека микроэлементов, как Zn и Cu, может приводить к токсическим эффектам. Для большинства образцов, выращенных в условиях Новосибирской области, концентрация цинка в зерне превышала ПДК (50 мг/кг), тогда как в образцах из Самарского региона его содержание было в пределах нормы (см. табл. S1). Возможно, что такие различия связаны с содержанием цинка в почве. Аналогично можно отметить и повышенный уровень свинца в зерне почти у половины сортообразцов, выращенных в обоих регионах.

По данным 30-летнего мониторинга минерального состава почвы в черноземах Западной Сибири не выявлено превышения ПДК подвижных форм тяжелых металлов Cu, Zn, Pb, Cd и Cr (Красницкий и др., 2024). Анализ почв в Самарской области также свидетельствует, что содержание подвижных форм свинца, никеля, хрома, меди и цинка на всех типах и подтипах почв разного состава и с разным содержанием гумуса не превышает ПДК (Обушченко, Гнеденко, 2014). Однако анализ токсичных металлов в почве полей, использованных для проведения эксперимента, не проводился, и данный вопрос требует дополнительного изучения.

Изменение концентрации тяжелых металлов в почве может быть связано с такими факторами, как система подготовки почвы, внесение органоминеральных удобрений, использование пестицидов и средств защиты растений, атмосферные осадки, различные антропогенные воздей-

ствия от промышленных предприятий, транспорта и др. В ряде работ показано, что систематическое внесение минеральных и органических удобрений способствует поступлению в почву тяжелых металлов и может влиять на минеральный состав зерна пшеницы и его концентрацию (Ryan et al., 2004; Pandino et al., 2020; Wysocka et al., 2025). Корневые и внекорневые обработки азотными удобрениями в различных концентрациях могут повышать поглощение и накопление Cd в зернах твердой пшеницы даже при низком уровне содержания Cd в почве (Özkutlu, 2024). Внесение органоминеральных удобрений под посевы ячменя в почвах Самарской области привело, например, к увеличению валового содержания тяжелых металлов (Cu, Cd, Pb, Zn) и их подвижности, а также повысило миграцию Pb в растения яровой пшеницы (Троц В.Б. и др., 2015; Троц Н.М., Бокова, 2024).

Загрязнение тяжелыми металлами может происходить в почвах, находящихся в зоне влияния промышленных предприятий (Просьянников, 2014). Механизмы переноса и накопления тяжелых металлов в системах «почва–растение» являются очень сложными, и интенсивность их накопления зависит как от типа токсичного элемента, так и от погодных условий и структуры почвы. Однако, несмотря на повышение концентраций тяжелых металлов в пахотных почвах, большинство исследователей утверждают, что это не сказывается на уровне накопления токсичных веществ в конечной сельскохозяйственной продукции (Протасова, 2005; Wang et al., 2017; Ugulu et al., 2021).

Данные, полученные для концентрации микро- и макроэлементов и тяжелых металлов, использованы для исследования группировки образцов в пространстве главных компонент и для построения филогенетического дерева. Результаты показали отсутствие четкого распределения на контрастные группы, за исключением небольшого числа линий, созданных в Самарском НИИСХ, и сортообразцов иностранной селекции (см. рис. 2 и 3). Российские линии, происходящие из разных селекционных центров, образуют единый кластер с сортами твердой пшеницы, внедренными в производство в разные годы, что может свидетельствовать о невысоком генетическом разнообразии как сортов, так и создаваемых линий. Современный мировой пул твердой пшеницы характеризуется умеренным генетическим разнообразием, что подтверждается результатами, полученными на широком наборе сортообразцов в разных странах (Zhao et al., 2009; Nakki et al., 2014; Носаоğlu et al., 2020; Naseri et al., 2024).

Генетическое разнообразие российских сортов яровой твердой пшеницы, созданных за период 1929–2004 гг., было оценено с использованием данных родословных. Анализ установил, что около 20 % пула русских исконных сортов, ранее использованных для гибридизации, утеряно (Martynov et al., 2005). Аналогичный вывод можно сделать и в отношении иностранных сортов твердой пшеницы, поскольку основным направлением селекции в течение длительного времени было создание высокоурожайных генотипов, дополнительно характеризующихся устойчивостью к болезням и полеганию (Hernandez-Espinosa et al., 2020; Хуниас et al., 2020). До настоящего времени комплексных исследований генетического пула яровой

твердой пшеницы российского происхождения по минеральному составу не проводилось, поэтому сделать вывод о превосходстве стародавних сортов пока не представляется возможным.

Поиски источников генетического разнообразия заставляют обращать внимание на вовлечение в гибридизацию сородичей пшеницы, которые могут быть использованы для повышения содержания в зерне необходимых микро- и макроэлементов. Тетраплоидные виды *T. dicocum*, *T. dicoccoides*, *T. timopheevii* и гибридные линии, полученные с их участием, отличаются значительно более высоким уровнем цинка и железа в зерне (Сакмак et al., 2010; Del Coco et al., 2019; Tekin et al., 2022; Leonova et al., 2024). Сведения о происхождении семи селекционных линий Самарского НИИСХ, выделившихся в отдельный кластер, свидетельствуют о том, что в процессе их создания были использованы тетраплоидные виды *T. dicocum* и *T. timopheevii*. Проведенный ранее микросателлитный анализ ранних поколений этих линий показал наличие чужеродных транслокаций от *T. timopheevii* в хромосоме 6В (Мальчиков и др., 2015). Однако для установления связи между наличием чужеродных вставок в геноме и их влиянием на содержание определенных элементов необходимы дополнительные исследования.

Заключение

Оценка содержания микро- и макроэлементов и токсичных металлов в зерне сортов яровой твердой пшеницы выявила значительное варьирование большинства элементов в зависимости от генотипа и внешней среды. Наличие достоверных положительных корреляций Fe/Mn, Fe/Zn и Zn/Mn позволяет вести отбор генотипов по нескольким микроэлементам одновременно. Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что российские сорта и селекционные линии отличаются умеренным генетическим разнообразием, однако размах варьирования признака позволяет отобрать образцы, которые могут быть использованы для улучшения минерального состава зерна. Показано, что содержание Cd в зерне у всех изученных образцов, за исключением пяти образцов иностранной коллекции, не превышает ПДК. Для установления у ряда изученных образцов причины высокого содержания Zn, Pb и Cr, превышающих ПДК, необходимы дополнительные сведения о концентрации этих металлов в почве экспериментальных участков.

Список литературы / References

- Гончаров С.В., Курашов М.Ю. Перспективы развития российского рынка твердой пшеницы. *Вестник Воронежского государственного аграрного университета*. 2018;2(57):66-75. doi 10.17238/issn2071-2243.2018.2.66
- [Goncharov S.V., Kurashov M.Yu. Prospects for the development of the Russian durum wheat market. *Vestnik Voronezhskogo Gosudarstvennogo Universiteta = Vestnik of Voronezh State Agrarian University*. 2018;2(57):66-75. doi 10.17238/issn2071-2243.2018.2.66 (in Russian)]
- Красницкий В.М., Бобренко И.А., Шмидт А.Г., Бобренко Е.Г. Мониторинг тяжелых металлов и мышьяка в черноземах и растениях юга Западной Сибири. *Плодородие*. 2024;6(141):99-103. doi 10.25680/S19948603.2024.141.23

- [Krasnitsky V.M., Bobrenko I.A., Schmidt A.G., Bobrenko E.G. Monitoring of heavy metals and arsenic in chernozems and plants of the south of Western Siberia. *Plodorodie*. 2024;6(141):99-103. doi 10.25680/S19948603.2024.141.23 (in Russian)]
- Мальчиков П.Н., Мясникова М.Г. Развитие селекции яровой твердой пшеницы в России (странах бывшего СССР), результаты и перспективы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023; 27(6):591-608. doi 10.18699/VJGB-23-71
- [Malchikov P.N., Myasnikova M.G. Development, results and prospects of the spring durum wheat breeding in Russia (post-Soviet states). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2023;27(6):591-608. doi 10.18699/VJGB-23-71]
- Мальчиков П.Н., Мясникова М.Г., Леонова И.Н., Салина Е.А. Интрогрессия устойчивости к мучнистой росе (*Blumeria graminis* DC. f. *tritici*) от *Triticum timopheevii* Zhuk. и *Triticum dicoccum* Shuebl. в геном *Triticum durum* Desf. *Зерновое хозяйство России*. 2015;2:63-67
- [Malchikov P.N., Maysnikova M.G., Leonova I.N., Salina E.A. Introgression of stability to powdery mildew (*Blumeria graminis* DC. f. *tritici*) from *Triticum timopheevii* Zhuk. and *Triticum dicoccum* Shuebl. in genome *Triticum durum* Desf. *Zernovoe Khozyajstvo Rossii = Grain Economy of Russia*. 2015;2:63-67 (in Russian)]
- Обущенко С.В., Гнеденко В.В. Мониторинг содержания микроэлементов и тяжелых металлов в почвах Самарской области. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2014;7:30-34
- [Obuschenko S.V., Gnedenko V.V. Monitoring of micronutrient and heavy metal content in soil of Samara region. *Mezhdunarodnyj Zhurnal Prikladnykh i Fundamentalnykh Issledovaniy = International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2014;7:30-34 (in Russian)]
- Потоцкая И.В., Кошкин М.Н., Шпигель А.Л., Шаманин В.П. Изменчивость содержания макро- и микроэлементов в зерне твердой пшеницы в условиях южной лесостепи Западной Сибири. *Вестник Омского ГАУ*. 2023;2(50):58-67
- [Pototskaya I.V., Koshkin M.N., Shpigel A.L., Shamanin V.P. Variability of the of macro- and microelements content in the grain of durum wheat under conditions of the southern forest-steppe of Western Siberia. *Vestnik Omskogo GAU = Vestnik of Omsk SAU*. 2023;2(50):58-67 (in Russian)]
- Просьянников В.И. Эколого-агрохимическая характеристика почв пашни юго-востока Западной Сибири по содержанию тяжелых металлов. *Плodorodie*. 2014;5:41-43
- [Prosyannikov V.I. Ecological-agrochemical characterization of arable soils in the south-eastern region of Western Siberia in terms of heavy metal contents. *Plodorodie*. 2014;5:41-43 (in Russian)]
- Протасова Н.А. Тяжелые металлы в черноземах и культурных растениях Воронежской области. *Агрохимия*. 2005;2:80-86
- [Protasova N.A. Heavy metals in chernozems and cultivated plants of the Voronezh region. *Agrokhimia*. 2005;2:80-86 (in Russian)]
- Сочалова Л.П., Апарина В.А., Бойко Н.И., Зуев Е.В., Морозова Е.В., Мусинов К.К., Виниченко Н.А., Леонова И.Н., Пискарев В.В. Изучение устойчивости к бурой ржавчине, урожайности и качества зерна у образцов коллекции мягкой пшеницы в экологических условиях Новосибирской области. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(8):988-999. doi 10.18699/VJGB-23-114
- [Sochalova L.P., Aparina V.A., Boyko N.I., Zuev E.V., Morozova E.V., Musinov K.K., Vinichenko N.A., Leonova I.N., Piskarev V.V. Studying a collection of common-wheat varieties for leaf rust resistance, crop yield and grain quality in the environmental conditions of Novosibirsk region. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2023;27(8):988-999. doi 10.18699/VJGB-23-114]
- Троц В.Б., Ахматов Д.А., Троц Н.М. Влияние минеральных удобрений на аккумуляцию тяжелых металлов в почве и фитомассе зерновых культур. *Зерновое хозяйство России*. 2015;1:95-104
- [Trots V.B., Akhmatov D.A., Trots N.M. Influence of fertilizers on accumulation of heavy metal in soil and phytomass of grain crops. *Zernovoe Khozyajstvo Rossii = Grain Econ Russ*. 2015;1:95-104 (in Russian)]
- Троц Н.М., Бокова А.А. Влияние органоминеральных удобрений на аккумуляцию тяжелых металлов в черноземных почвах в условиях Среднего Поволжья. *Известия Самарской государственной сельскохозяйственной академии*. 2024;9(1):81-88. doi 10.55170/1997-3225-2024-9-1-81-88
- [Trots N.M., Bokova A.A. Influence of organomineral fertilizers on the accumulation of heavy metals in chernozem soils under conditions of the Middle Volga region. *Bulletin of Samara State Agricultural Academy*. 2024;9(1):81-88. doi 10.55170/1997-3225-2024-9-1-81-88 (in Russian)]
- Aghalari Z., Dahms H.U., Sillanpää M. Evaluation of nutrients in bread: a systematic review. *J Heal Popul Nutr*. 2022;41(1):50. doi 10.1186/s41043-022-00329-3
- Ali A.A.H. Overview of the vital roles of macro minerals in the human body. *J Trace Elem Miner*. 2023;4:100076. doi 10.1016/j.jtemin.2023.100076
- Bordoni A., Danesi F., Di Nunzio M., Taccari A., Valli V. Ancient wheat and health: a legend or the reality? A review on KAMUT khorasan wheat. *Intern J Food Sci Nutrition*. 2017;68(3):278-286. doi 10.1080/09637486.2016.1247434
- Cakmak I., Pfeiffer W.H., McClafferty B. Biofortification of durum wheat with zinc and iron. *Cereal Chem*. 2010;87(1):10-20. doi 10.1094/CCHEM-87-1-0010
- Camaschella C. Iron deficiency. *Blood*. 2019;133(1):30-39. doi 10.1182/blood-2018-05-815944
- Del Coco L., Laddomada B., Migoni D., Mita G., Simeone R., Fanizzi F.P. Variability and site dependence of grain mineral contents in tetraploid wheats. *Sustainability*. 2019;11(3):736. doi 10.3390/su11030736
- Dixit S.P., Rajan L., Palaniswamy D., Mohankumar S.K. Importance of iron absorption in human health: an overview. *Curr Nutr Food Sci*. 2020;17(3):293-301. doi 10.2174/1573401316999200801021752
- Gordeeva E.I., Shamanin V.P., Khlestkina E.K., Shiova O.Y. On peculiarities of breeding purple-grained wheat based on varieties with anthocyanin pigmentation of coleoptiles and stems. *Agric Biol*. 2024; 59(3):507-524. doi 10.15389/agrobiology.2024.3.507eng
- Hakki E.E., Dograr N., Pandey A., Khan M.K., Hamurcu M., Kayis S.A., Gezgin S., Ölmez F., Akkaya M.S. Molecular and elemental characterization of selected Turkish durum wheat varieties. *Not Bot Horti Agrobot Cluj-Napoca*. 2014;42(2):431-439. doi 10.15835/nbha4229621
- Hambidge M. Human zinc deficiency. *J Nutr*. 2000;130(5):1344S-1349S. doi 10.1093/jn/130.5.1344S
- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron*. 2001;4(1):1-9
- Hernandez-Espinosa N., Laddomada B., Payne T., Huerta-Espino J., Govindan V., Ammar K., Ibbra M.I., Pasqualone A., Guzman C. Nutritional quality characterization of a set of durum wheat landraces from Iran and Mexico. *LWT*. 2020;124:109198. doi 10.1016/j.lwt.2020.109198
- Hocaoglu O., Akçura M., Kaplan M. Changes in the grain element contents of durum wheat varieties of Turkey registered between 1967–2010. *Commun Soil Sci Plant Anal*. 2020;51(4):431-439. doi 10.1080/00103624.2019.1709487
- Islam M.R., Akash S., Jony M.H., Alam M.N., Nowrin F.T., Rahman M.M., Rauf A., Thiruvengadam M. Exploring the potential function of trace elements in human health: a therapeutic perspective. *Mol Cell Biochem*. 2023;478(10):2141-2171. doi 10.1007/s11010-022-04638-3
- Jomova K., Makova M., Alomar S.Y., Alwasel S.H., Nepovimova E., Kuca K., Rhodes C.J., Valko M. Essential metals in health and disease. *Chem Biol Interact*. 2022;367:110173. doi 10.1016/j.cbi.2022.110173

- Jomova K., Alomar S.Y., Nepovimova E., Kuca K., Valko M. Heavy metals: toxicity and human health effects. *Arch Toxicol.* 2025;99: 153-209. doi 10.1007/s00204-024-03903-2
- Khokhar J.S., Sareen S., Tyagi B.S., Singh G., Wilson L., King I.P., Young S.D., Broadley M.R. Variation in grain Zn concentration, and the grain ionome, in field-grown Indian wheat. *PLoS One.* 2018; 13(1):e0192026. doi 10.1371/journal.pone.0192026
- Kiran, Bharti R., Sharma R. Effect of heavy metals: an overview. *Mater Today Proc.* 2022;51:880-885. doi 10.1016/j.matpr.2021.06.278
- Leonova I.N., Kiseleva A.A., Salina E.A. Identification of genomic regions conferring enhanced Zn and Fe concentration in wheat varieties and introgression lines derived from wild relatives. *Int J Mol Sci.* 2024;25(19):10556. doi 10.3390/ijms251910556
- Martínez-Moreno F., Ammar K., Solís I. Global changes in cultivated area and breeding activities of durum wheat from 1800 to date: a historical review. *Agronomy.* 2022;12(5):1135. doi 10.3390/agronomy12051135
- Martynov S.P., Dobrovorskaya T.V., Pukhalskiy V.A. Analysis of genetic diversity of spring durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars released in Russia in 1929–2004. *Russ J Genet.* 2005;41(10): 1113-1122. doi 10.1007/s11177-005-0208-4
- Morgounov A., Li H., Shepelev S., Ali M., Flis P., Koxsel H., Savin T., Shamanin V. Genetic characterization of spring wheat germplasm for macro-, microelements and trace metals. *Plants.* 2022;11(16): 2173. doi 10.3390/plants11162173
- Naseri R., Cheghamirza K., Mohammadi R., Zarei L., Beheshti A.A. Evaluation of grain quality and its relationship with agro-physiological traits in durum wheat. *Cereal Res Commun.* 2024;52(2):813-823. doi 10.1007/s42976-023-00430-1
- Olivares M., Uauy R. Copper as an essential nutrient. *Am J Clin Nutr.* 1996;63(5):791S-796S. doi 10.1093/ajcn/63.5.791
- Orlovskaya O.A., Vakula S.I., Khotyleva L.V., Kilchevsky A.V. Mineral composition of bread wheat lines with introgressions of alien genetic material. *Proc Appl Bot Genet Breed.* 2023;184(1):42-52. doi 10.30901/2227-8834-2023-1-42-52
- Özkutlu F. Effects of applying different N sources on Cd accumulation, mineral micronutrients, and grain yield of durum wheat. *J Soil Sci Plant Nutr.* 2024;24:4261-4268. doi 10.1007/s42729-024-01831-9
- Pandino G., Mattiolo E., Lombardo S., Lombardo G.M., Mauromicale G. Organic cropping system affects grain chemical composition, rheological and agronomic performance of durum wheat. *Agriculture.* 2020;10(2):46. doi 10.3390/agriculture10020046
- Potapova N.A., Timoshchuk A.N., Tiys E.S., Vinichenko N.A., Leonova I.N., Salina E.A., Tsepilov Y.A. Multivariate genome-wide association study of concentrations of seven elements in seeds reveals four new loci in Russian wheat lines. *Plants.* 2023;12(17):3019. doi 10.3390/plants12173019
- Ryan M.H., Derrick J.W., Dann P.R. Grain mineral concentrations and yield of wheat grown under organic and conventional management. *J Sci Food Agric.* 2004;84(3):207-216. doi 10.1002/jsfa.1634
- Saini P., Kaur H., Tyagi V., Saini P., Ahmed N., Dhaliwal H.S., Sheikh I. Nutritional value and end-use quality of durum wheat. *Cereal Res Commun.* 2023;51:283-294. doi 10.1007/s42976-022-00305-x
- Schoofs H., Schmit J., Rink L. Zinc toxicity: understanding the limits. *Molecules.* 2024;29(13):3130. doi 10.3390/molecules29133130
- Shamanin V.P., Pototskaya I.V., Chursin A.S., Shepelev S.S., Nardin D.S., Pozherukova V.E., Köksel H., Morgounov A.I. Breeding spring bread wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties with functional properties of grain for environmentally friendly growing in Western Siberia. *Agric Biol.* 2024;59(3):492-506. doi 10.15389/agrobiology.2024.3.492eng
- Shepelev S., Morgounov A., Flis P., Koxsel H., Li H., Savin T., Sharma R., Wang J., Shamanin V. Variation of macro- and microelements, and trace metals in spring wheat genetic resources in Siberia. *Plants.* 2022;11(2):149. doi 10.3390/plants11020149
- Sigel A., Sigel H., Sigel R. (Eds) Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases. *Metal Ions in Life Sciences.* Vol. 13. Springer, 2013. doi 10.1007/978-94-007-7500-8
- Tadesse W., Sanchez-Garcia M., Assefa S.G., Amri A., Bishaw Z., Ogbonnaya F.C., Baum M. Genetic gains in wheat breeding and its role in feeding the world. *Crop Breed Genet Genom.* 2019;1:e190005. doi 10.20900/cbagg20190005
- Tanin M.J., Saini D.K., Kumar P., Gudi S., Sharma H., Kaur J.P., Abassy O., Bromand F., Sharma A. Iron biofortification in wheat: past, present, and future. *Curr Plant Biol.* 2024;38:100328. doi 10.1016/j.cpb.2024.100328
- Tekin M., Emiralioğlu O., Yeken M.Z., Nadeem M.A., Çiftçi V., Baloch F.S. Wild relatives and their contributions to wheat breeding. In: *Ancient Wheats.* Springer International Publ., 2022;197-233. doi 10.1007/978-3-031-07285-7_9
- Ugulu I., Ahmad K., Khan Z.I., Munir M., Wajid K., Bashir H. Effects of organic and chemical fertilizers on the growth, heavy metal/metalloid accumulation, and human health risk of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environ Sci Pollut Res Int.* 2021;28(10):12533-12545. doi 10.1007/s11356-020-11271-4
- Virk P.S., Andersson M.S., Arcos J., Govindaraj M., Pfeiffer W.H. Transition from targeted breeding to mainstreaming of biofortification traits in crop improvement programs. *Front Plant Sci.* 2021;12: 703990. doi 10.3389/fpls.2021.703990
- Wang S., Wu W., Liu F., Liao R., Hu Y. Accumulation of heavy metals in soil-crop systems: a review for wheat and corn. *Environ Sci Pollut Res.* 2017;24(18):15209-15225. doi 10.1007/s11356-017-8909-5
- Wessling-Resnick M. Excess iron: considerations related to development and early growth. *Am J Clin Nutr.* 2017;106:1600-1605. doi 10.3945/ajcn.117.155879
- Wysocka K., Cacak-Pietrzak G., Sosulski T. Mineral concentration in spring wheat grain under organic, integrated, and conventional farming systems and their alterations during processing. *Plants.* 2025; 14(7):1003. doi 10.3390/plants14071003
- Xynias I.N., Mylonas I., Korpatis E.G., Ninou E., Tsballa A., Avdikos I.D., Mavromatis A.G. Durum wheat breeding in the Mediterranean region: current status and future prospects. *Agronomy.* 2020; 10(3):432. doi 10.3390/agronomy10030432
- Zhao F.J., Su Y.H., Dunham S.J., Rakszegi M., Bedo Z., McGrath S.P., Shewry P.R. Variation in mineral micronutrient concentrations in grain of wheat lines of diverse origin. *J Cereal Sci.* 2009;49(2):290-295. doi 10.1016/j.jcs.2008.11.007
- Zoroddu M.A., Aaseth J., Crisponi G., Medici S., Peana M., Nurchi V.M. The essential metals for humans: a brief overview. *J Inorg Biochem.* 2019;195:120-129. doi 10.1016/j.jinorgbio.2019.03.013

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 30.05.2025. После доработки 25.06.2025. Принята к публикации 30.06.2025.

doi 10.18699/vjgb-25-87

К генетической структуре и происхождению малого суслика *Spermophilus pygmaeus* (Pallas, 1778) на Северном Кавказе

Ф.А. Темботова , А.Х. Амшокова , М.С. Гудова  

Институт экологии горных территорий им. А.К. Темботова Российской академии наук, Нальчик, Россия

 mparieva@inbox.ru

Аннотация. Малый суслик *Spermophilus pygmaeus* (Pallas, 1778) – политипический вид, представляющий существенный интерес для изучения таксономического разнообразия, генетической структуры, потока генов и генетического разнообразия. Несмотря на длительную историю изучения, систематика представителей рода *Spermophilus* на Северном Кавказе остается слабо разработанной. Неразрешенным вопросом остаются и филогенетические отношения между «горными» и «равнинными» сусликами Северного Кавказа. Не менее важным аспектом работы является оценка генетического разнообразия малого суслика, поскольку вид считается неотъемлемым компонентом степных и пустынных экосистем, обеспечивая их важнейшие биоценотические функции. На основании анализа фрагмента гена *cyt b* мтДНК длиной 840 п. н. получены новые данные по генетической изменчивости *Spermophilus pygmaeus* восточной оконечности Западного Кавказа. В отличие от ранее проведенных работ, показавших обитание в горах Кавказа так называемого горного суслика, в настоящей работе на исследованных территориях на высоте 1400–1700 м над ур. моря выявлены две гаплогруппы *S. pygmaeus*, одна из которых близка к равнинным (восточно-кавказским), а вторая – к горным (центрально-кавказским) группировкам малого суслика. Генетическая дистанция между двумя гаплогруппами составила 1.54 %. Разный эволюционный возраст трех выявленных группировок *S. pygmaeus* на Северном Кавказе (A1, A2 и B), скорее всего, связан с многоэтапным заселением исследуемой территории малым сусликом. Данные молекулярного датирования позволяют предположить, что западная гаплогруппа проникла сплошной полосой на Центральный, Восточный Кавказ и восточную оконечность Западного Кавказа через Ставропольскую возвышенность и Прикаспийскую низменность менее 400 тыс. лет назад. В процессе первой волны расселения суслика с Русской равнины вид закрепился в восточной оконечности Западного Кавказа в районе с. Хасаут, а на Восточном Кавказе – на севере Ногайской степи (Сухокумск) и в южных окраинах Прикаспийской низменности (долина Кар-Кар 1). Более молодой возраст гаплогруппы A2 (менее 300 тыс. лет), также происходящей с Восточного Кавказа (Хумтоп, Зеленоморск, Львовский 13, Кар-Кар 2), вероятнее всего, обусловлен повторным заселением сусликом Прикаспийской низменности, регулярно затапливаемой водами Каспия в историческое время. Отсутствие сплошного пояса лесов на Центральном Кавказе, в частности в Кабардино-Балкарии, позволило позже, менее 200 тыс. лет назад, проникнуть *S. pygmaeus* в горы по трем ущельям: Черекскому, Баксанскому и Малкинскому. Более вероятно, что в субальпическом Западного Кавказа (Хурзука и Учкулана) вид проник уже с Центрального Кавказа, о чем свидетельствует один и тот же эволюционный возраст животных Западного (Учкулан, Хурзук) и Центрального Кавказа. Касательно таксономического статуса кавказского горного суслика считаем преждевременным делать какие-либо выводы, так как не все территории Кавказа были охвачены исследованиями.

Ключевые слова: *Spermophilus pygmaeus*; *cyt b*; генетическое разнообразие; Западный Кавказ

Для цитирования: Темботова Ф.А., Амшокова А.Х., Гудова М.С. К генетической структуре и происхождению малого суслика *Spermophilus pygmaeus* (Pallas, 1778) на Северном Кавказе. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(6):798-811. doi 10.18699/vjgb-25-87

Финансирование. Работа выполнена по программе государственного задания Института экологии горных территорий им. А.К. Темботова РАН (FMEU-2023-0001 «Разнообразие (генетическое, морфологическое, таксономическое) позвоночных Северного Кавказа, структура их размещения в регионе как основа долгосрочного мониторинга природных и антропогенных экосистем»).

On the genetic structure and origin of the little ground squirrel *Spermophilus pygmaeus* (Pallas, 1778) in the North Caucasus

Ф.А. Темботова , А.Х. Амшокова , М.С. Гудова  

Tembotov Institute of Ecology of Mountain Territories of the Russian Academy of Sciences, Nalchik, Russia

 mparieva@inbox.ru

Abstract. Little ground squirrel *Spermophilus pygmaeus* (Pallas, 1778) is a polytypic species of significant interest for the study of taxonomic diversity, genetic structure, gene flow and genetic diversity. Despite the long history of study, the taxonomy of representatives of the genus *Spermophilus* in the North Caucasus remains poorly developed. Among the

unresolved issues are the phylogenetic relationships between the “mountain” and “plain” ground squirrels of the North Caucasus. An equally important aspect of the work is the study of the genetic diversity of little ground squirrel, given that the species is considered an integral component of steppe and desert ecosystems, providing their most important biocenotic functions. Based on the analysis of the 840 bp mtDNA *cytochrome b* gene fragment, new data on the genetic variability of *S. pygmaeus* from the eastern extremity of the Western Caucasus were obtained. Unlike previous studies that showed the so-called mountain ground squirrel to inhabit the Caucasus Mountains, this work identified two haplogroups of *S. pygmaeus* in the studied areas at an altitude of 1,400–1,700 m above sea level, one of which is close to the lowland (East Caucasian) and the other to the mountain (Central Caucasian) groups of the little ground squirrel. The genetic distance between the two haplogroups was 1.54 %. The different evolutionary ages of the three identified groups of *S. pygmaeus* in the North Caucasus (A1, A2, and B) are most likely associated with the multi-stage settlement of the studied area by the little ground squirrel. The results of molecular dating suggest that the western haplogroup penetrated as a continuous strip into the Central, Eastern Caucasus and the eastern extremity of the Western Caucasus through the Stavropol Upland and the Caspian Lowland less than 400 thousand years ago. As a result of the first wave of dispersal of the ground squirrel from the Russian Plain, the species became established in the eastern extremity of the Western Caucasus in the area of the village of Khasaut, and in the Eastern Caucasus – in the north of the Nogai Steppe (Sukhokumsk) and in the southern outskirts of the Caspian Lowland (Kar-Kar 1 Valley). The younger age of haplogroup A2 (less than 300 thousand years), also originating from the Eastern Caucasus (Khumtop, Zelenomorsk, Lvovsky 13, Kar-Kar 2), is most likely due to the re-colonization of the Caspian lowland by the ground squirrel, which was regularly flooded by the Caspian Sea in historic times. The absence of a continuous forest belt in the Central Caucasus, in particular in the Kabardino-Balkarian Republic, allowed *S. pygmaeus* to penetrate into the mountains later, less than 200 thousand years ago, through three gorges: Cherek, Baksan and Malkinsky. It is more likely that the species penetrated into the subalps of the Western Caucasus (Khurzuk and Uchkulan) from the Central Caucasus, as evidenced by the same evolutionary age of animals of the Western (Uchkulan, Khurzuk) and Central Caucasus. Regarding the taxonomic status of the Caucasian mountain ground squirrel, we consider it premature to draw any conclusions, since not all areas of the Caucasus were covered by research.

Key words: *Spermophilus pygmaeus*; *cytochrome b* (*cyt b*); genetic diversity; Western Caucasus

For citation: Tembotova F.A., Amshokova A.Kh., Gudova M.S. On the genetic structure and origin of the little ground squirrel *Spermophilus pygmaeus* (Pallas, 1778) in the North Caucasus. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(6):798-811. doi 10.18699/vjgb-25-87

Введение

Малый суслик *Spermophilus pygmaeus* (Pallas, 1778) – политипический вид, представляющий существенный интерес для изучения таксономического разнообразия, генетической структуры, потока генов и генетического разнообразия. Несмотря на длительную историю исследований, систематика представителей рода *Spermophilus* на Северном Кавказе остается слабо разработанной. Горный суслик был впервые добыт на северном склоне Эльбруса в поясе субальпийских лугов и описан Э. Менетрие как самостоятельный вид (Menetries, 1832). В качестве самостоятельного вида горного суслика выделяли многие исследователи (Brandt, 1843; Свириденко, 1937; Виноградов, Аргиропуло, 1941; Млекопитающие..., 1963; Фауна СССР, 1965; Воронцов, Ляпунова, 1969; Громов, Баранова, 1981; Кораблев, 1983; Harrison et al., 1993; Hoffmann, 1993; Громов, Ербаева, 1995; Цвирка и др., 2003; Цвирка, Кораблев, 2014). По мнению других авторов, горный кавказский суслик является подвидом малого (Сагунин, 1907; Оболенский, 1927; Огнев, 1947; Верещагин, 1959; Орлов и др., 1969; Иванов, 1976; Ермаков и др., 2006; Никольский и др., 2007). И.Я. Павлинов и А.А. Лисовский (2012) выделяют *Spermophilus (pygmaeus) pygmaeus* (левобережный малый суслик относительно реки Волги), *Spermophilus (pygmaeus) planicola* (правобережный малый суслик) и *Spermophilus (pygmaeus) musicus* (кавказский (горный) малый суслик) как полувиды в надвиде *pygmaeus*. Данный вид давно привлекает внимание исследователей, однако работ, основанных на анализе участка гена *cyt b* малого суслика на обозначенной территории, очень мало (Harrison et al., 1993; Eрмаков et al., 2023; Темботова и др., 2024).

К числу неразрешенных вопросов, как справедливо отмечают О.А. Ермаков с соавторами (2018), относятся и филогенетические отношения между «горными» и «равнинными» сусликами Северного Кавказа. Также остаются не до конца выясненными вопросы, касающиеся эволюционной истории, закономерностей распространения равнинной и горной форм малого суслика. Решению вышеназванных вопросов препятствовала крайне неравномерная изученность территории с вовлечением в анализ незначительных по объему выборок.

Все популяции малого суслика, обитающие к западу от Волги до низовий Днепра, а также в Крыму и Предкавказье, были отнесены к сестринскому виду *S. musicus* Ménétries, 1832, поскольку он является старшим синонимом, применимым к западной линии *S. pygmaeus* sensu lato (Simonov et al., 2024). Согласно упомянутой работе, *S. musicus* – не только горный суслик, но и все малые суслики правобережья Волги. При этом встает вопрос, являются ли все правобережные малые суслики в генетическом плане однородными. Возникновение данного вопроса связано с результатами, полученными нами ранее на основании анализа фрагмента гена *cyt b* мтДНК сусликов Восточного и Центрального Кавказа (Темботова и др., 2024).

В ходе проведенного анализа было обнаружено, что на территории Восточного Кавказа обитают две генетически различающиеся группировки малого суслика. Кроме того, сравнение центрально-кавказских (горных) и восточно-кавказских (равнинных) группировок малого суслика выявило генетическую дистанцию, составляющую 1.34 %, и отсутствие идентичных гаплотипов у сравниваемых группировок, что в целом указывает на генетическую гетеро-

генность *S. pygmaeus* на рассматриваемых территориях. Такого же порядка дистанции (1.29–1.72 %) получены между горными малыми сусликами и популяциями сусликов с правого берега Волги. На первый взгляд, эти дистанции могут показаться незначительными, однако они достигают нижних пределов межвидовых различий, если сопоставлять с дистанциями, полученными для представителей рода *Spermophilus*: минимальная – 1.4 % (между видами *S. major* и *S. selevini* (= *S. brevicauda*)), максимальная – 10.7 % (между *S. dauricus* и *S. xanthoprimum*) (Simonov et al., 2024). Также не вполне ясно, все ли популяции так называемого кавказского горного суслика, населяющие горные территории Кавказа, генетически близки между собой и в равной степени отличаются от равнинных.

В большинстве работ для уточнения таксономического статуса кавказского горного суслика изучался материал преимущественно из Центрального Кавказа, в частности из окрестностей пос. Эльбрус (Harrison et al., 1993; Ермаков и др., 2006; Никольский и др., 2007; Фрисман и др., 2014; Цвирка, Кораблев, 2014), Баксана, ущелья Джилы-Су, урочища Шаджатмаз (Ermakov et al., 2023). Отсутствие как литературных сведений, полученных на основании анализа участка гена *cyt b* малого суслика Западного Кавказа, так и последовательностей, депонированных в базе Генбанк, определяет необходимость изучения выборок малого суслика с данной территории для определения статуса *S. pygmaeus*, населяющих горные районы.

К числу наиболее часто используемых генетических маркеров в филогеографических исследованиях позвоночных животных относится митохондриальная ДНК (Avisé, 2000; Лукашов, 2009; Холодова, 2009), что обусловлено такими свойствами, как наследование по материнской линии, отсутствие процесса рекомбинации, высокая скорость эволюции по сравнению с ядерными генами, большое количество копий и т. д. *Cyt b* зарекомендовал себя как информативный и успешно используется в териологических работах на уровнях от родового до внутривидового (Банникова, 2004; Абрамсон, 2007; Холодова, 2009). Кроме того, это ген, для которого доступно больше всего информации в генетических базах данных.

Второй, не менее важный аспект работы – изучение генетического разнообразия географических выборок малого суслика. Известно, что суслики являются неотъемлемым компонентом степных и пустынных экосистем, обеспечивая их важнейшие биоценологические функции, однако с давних времен они привлекают внимание в основном как вредители сельского хозяйства и переносчики различных заболеваний. С 1920-х годов борьба с сусликами как сельскохозяйственными вредителями была поднята на государственный уровень. Грандиозные по масштабу истребительные работы против малого суслика развернулись в аридных ландшафтах бывшего СССР, природных очагах чумы. В первой половине XX в. получила развитие концепция полной ликвидации очагов этой инфекции путем уничтожения грызунов – носителей возбудителя. На Северном Кавказе и в Северо-Западном Прикаспии рекомендовалось практически полное уничтожение малого суслика (Калабухов, 1933; Пастухов, 1959). Началось «оздоровление» природного очага в соответствии со спе-

циальной программой, которое приобрело беспрецедентные масштабы (цит. по: Шилова, 2011). В итоге сплошная очистка территории от сусликов, распашка степей, изменение интенсивности выпаса скота, развитие лесных полевых полос и искусственного орошения привели к уничтожению сусликов не только на Кавказе, но и во многих регионах России. По данным С.А. Шиловой (2011), глубокая депрессия численности правобережного малого суслика началась на юге России в конце прошлого века и продолжается до сих пор. В Кабардино-Балкарии сельскохозяйственное освоение равнинных и предгорных территорий вызвало почти полное исчезновение популяций малого суслика. В частности, предгорно-равнинные популяции малого суслика занесены в Красную книгу Кабардино-Балкарской Республики (2018) с присвоением статуса «находящийся на грани исчезновения».

Следует отметить, что трансформация местообитаний и их фрагментация в связи с деятельностью человека стали результатом сокращения пригодных для обитания малого суслика площадей, что привело к чрезвычайно высокой раздробленности популяций вида. При этом известно, что фрагментация и сокращение ареалов часто отражаются на генетической структуре популяций диких животных, затрудняя обмен генами между разными частями ареала, снижая эффективный размер популяции и способствуя возрастанию уровня инбридинга.

В связи с вышеизложенным целью исследования заключалась в изучении генетической структуры и генетического разнообразия *S. pygmaeus* восточной оконечности Западного Кавказа на основании анализа фрагмента гена *cyt b* мтДНК и сравнении результатов с ранее полученными (Ermakov et al., 2023; Темботова и др., 2024) для оценки таксономического разнообразия малого суслика на Северном Кавказе.

Материалы и методы

В работе использовались образцы тканей мышц малого суслика *S. pygmaeus* из разных географических пунктов восточной оконечности Западного Кавказа: Карачаево-Черкесская Республика – верховья р. Кубань, окрестности аулов Хурзук и Учкулан; урочище р. Хасаут притока р. Малка, окрестности с. Хасаут (рис. 1). Отлов зверьков проводили дугвыми капканами № 0. Капканы расставляли вокруг жилых нор сусликов (Карасева, Телицина, 1996).

В анализируемую выборку вошли 32 последовательности митохондриального гена *cyt b* *S. pygmaeus* из Карачаево-Черкесской Республики: окрестности с. Хасаут и аулов Хурзук и Учкулан (табл. 1). Кроме того, для проведения сравнительного анализа использовались гаплотипы малого суслика Северного Кавказа из ранее опубликованной нами работы (Темботова и др., 2024).

Остальные последовательности представителей рода *Spermophilus*, включая внешнюю группу, взяты из базы Genbank (ncbi.nlm.nih.gov): *S. pygmaeus* – OP588846–OP588904 (Ermakov et al., 2023), AF157907, AF157910 (Harrison et al., 1993); *S. musicus* – AF157900, AF157904 (Harrison et al., 1993); *Spermophilus taurensis* Gündüz et al., 2007 – KY938064, KY938069, KY938073 (Gür et al., 2017); *Spermophilus citellus* Linnaeus, 1766 – AM691632–AM691640; *Spermophilus xanthoprimum* Bennett, 1835 –

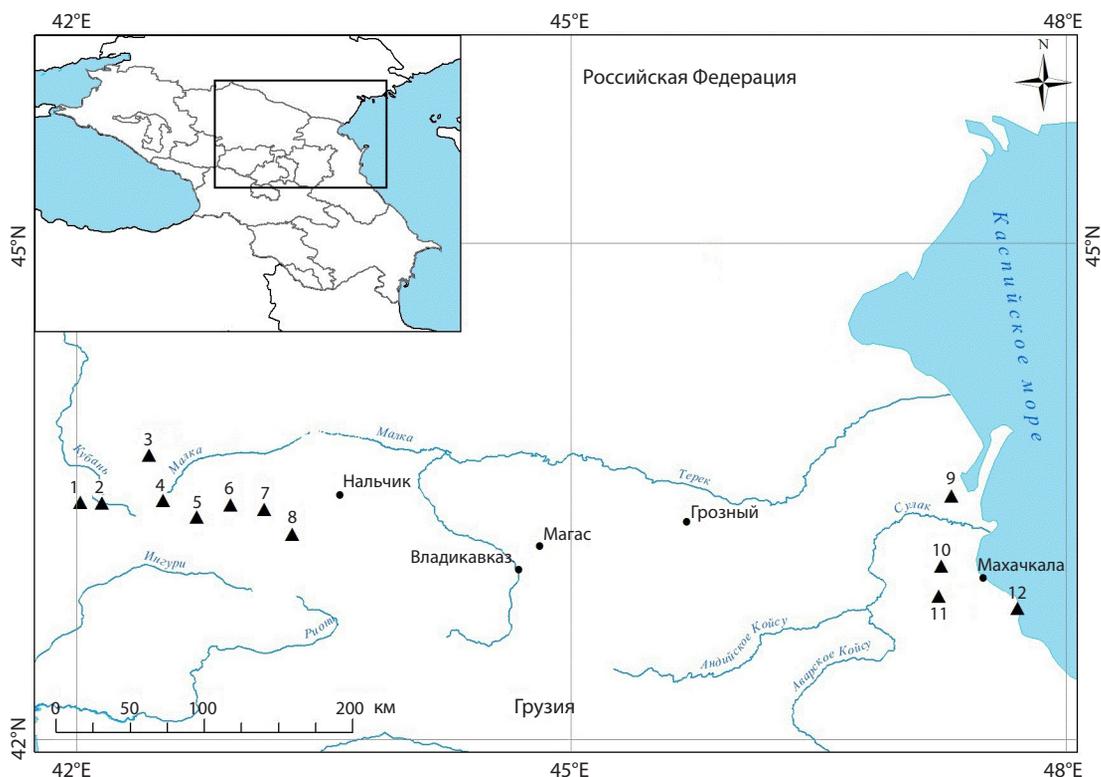


Рис. 1. Карта происхождения материала *Spermophilus pygmaeus* на Северном Кавказе.

Западный Кавказ (Карачаево-Черкесская Республика): 1 – Учкулан, 2 – Хурзук, 3 – Хасаут (новые данные); Центральный Кавказ (Кабардино-Балкарская Республика): 4 – Джилы-Су, 5 – Эльбрус, 6 – Тырнауз, 7 – Актопрак, 8 – Безенги; Восточный Кавказ (Республика Дагестан): 9 – Львовский, 10 – Хумтоп, 11 – Кар-Кар, 12 – Зеленоморск (Темботова и др., 2024).

AM691658–AM691663 (Gündüz et al., 2007) и AF157902, AF157909 (Орлов и др., 1969); *Marmota monax* Linnaeus, 1758 – AF157953 (Harrison et al., 1993).

Экстракцию ДНК осуществляли с помощью набора “Diatom™ DNA Prep100” (ООО «Лаборатория Изоген», Москва) в соответствии с протоколом производителя. Амплификацию фрагментов ДНК проводили с использованием набора MasterMix X5 («Диалат», Москва). Для полимеразной цепной реакции использовали праймеры: L14725 TGAAAAAYCATCGTTGT (Steppan et al., 1999), H15915 TCTTCATTTYWGGTTTACAAGAC (Harrison et al., 1993) при параметрах цикла ПЦР, рекомендованных в первой работе. Полученные ПЦР продукты очищали переосаждением в 0.15 М растворе ацетата натрия, в 90 % этаноле с последующей промывкой 70 % этанолом. Качество ПЦР продуктов оценивали методом электрофореза в 1.5 % агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Секвенирование нуклеотидных последовательностей проводилось в обоих направлениях в компании «Синтол» (Москва). Редактирование и выравнивание полученных последовательностей осуществляли с использованием программы BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999) по алгоритму Clustal W вручную.

Статистическую обработку данных, включая расчет числа полиморфных сайтов, количества гаплотипов, нуклеотидного и гаплотипического разнообразия, а также тестов на нейтральность Таджимы (Tajima, 1989) и Фу (Fu, 1996), выполняли в программе Arlequin v.3.5 (Excoffier,

Lischer, 2010). В этой же программе анализировали распределение наблюдаемых и ожидаемых значений парных нуклеотидных различий мтДНК в соответствии с моделями демографической (Rogers, Harpending, 1992) и пространственной экспансии (Ray et al., 2003). Взвешенные (net distance) межгрупповые генетические дистанции с использованием двухпараметрической модели Кимуры (K2P) (Kimura, 1980) рассчитывали в программе Mega 6.

Медианные сети гаплотипов были построены в программе Network 4.6.1 методом median-joining (Bandelt et al., 1999), далее их редактировали средствами стандартного пакета Paint.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей методом Байеса МСМС проводили в MrBayes v3.2.6. (Ronquist, Huelsenbeck, 2003).

Время расхождения оценивали в программе BEAST 1.10.4 (Suchard et al., 2018) с помощью следующих калибровок: 10.9 млн лет – для корневого узла расхождения *Marmota* и других видов *Spermophilus* (Yin et al., 2014), 5 млн лет – время дивергенции между *S. xanthoprimum* и *S. citellus* + *S. taurensis*, 2.5 млн лет – между *S. citellus* и *S. taurensis* (Gündüz et al., 2007). Данные анализировали с использованием некоррелированной логнормальной модели ослабленных молекулярных часов. Наиболее оптимальная модель нуклеотидных замен (HKY + I) была выбрана с помощью пакета программ MEGA 6. Длину марковских цепей (Markov Chain Monte Carlo, МСМС) устанавливали равной 100 млн поколений с отбором каж-

Таблица 1. Характеристика исследованного материала *S. pygmaeus* восточной оконечности Западного Кавказа (КЧР)

Номер в базе Генбанк (гаплотип)	Образцы	Место происхождения	Координаты	Идентичен гаплотипам из Генбанка		
PV539552 3730Has	3730Has 137Has 3734Has 138Has	Окрестности с. Хасаут	N 43.701667°, E 42.512304°, H = 1776 м над ур. м.			
PV539556 3727Has	3727Has					
PV539557 3733Has	3733Has					
PV539558 3729Has	3729Has					
PV539559 3728Has	3728Has					
PV539560 141Has	141Has					
PV539561 135Has	135Has					
PV539579 3707Hurz PV539581 3653Hurz	3707Hurz 3710Hurz 3653Hurz	Окрестности аула Хурзук	N 43.415534°, E 42.162560°, H = 1484 м над ур. м.			
PV539562 3709Hurz	3709Hurz 3706Hurz 3652Hurz 3651Hurz 3656Hurz 3650Hurz 3654Hurz 3659Hurz					
	3713Uchk 3712Uchk 3715Uchk 3711Uchk 3716Uchk 3714Uchk 3661Uchk 3663Uchk 3665Uchk			Окрестности аула Уччулан	N 43.455450°, E 42.090520°, H = 1367 м над ур. м.	
PV539582 3660Uchk	3660Uchk					
PV539583 3705Uchk	3705Uchk					
			AF157904, OP588865–OP588868, OP588903, OP588904			

дого тысячного состояния и значением burn-in 10 %. Сходимость параметров оценивали на основе достижения ESS (effective sample size) значений >200 с использованием программного обеспечения Tracer 1.7 (Rambaut et al., 2018). Время расхождения узлов дендрограммы *Spermophilus* рассчитано для шести вариантов нуклеотидных замен за миллион лет: 0.5, 0.9, 1.2, 2.4, 3.2 и 6.7 %.

Результаты

На основании анализа образцов тканей малого суслика восточной оконечности Западного Кавказа были получены 32 нуклеотидные последовательности фрагмента гена *cyt b* длиной 840 п. н. Все они загружены в базу данных GenBank под номерами PV539552–PV539583. Анализируемые последовательности содержали 24 вариабельных сайта, из которых 14 были парсимониально-информативными.

Результаты филогенетического анализа показали такую же топологию дерева (рис. 2), как и в предыдущих исследованиях, выполненных на данной группе и выявивших разделение *S. pygmaeus* на западную и восточную группы (Ermakov et al., 2023).

Ранее нами было показано обособленное положение центрально-кавказских (горных) и восточно-кавказских (равнинных) выборок на филогенетическом дереве (Темботова и др., 2024). Анализируемые в настоящей работе новые гаплотипы из Карачаево-Черкесской Республики распались на две гаплогруппы. Так, митотипы двух выборок (Уччулан и Хурзук) из трех анализируемых попали в гаплогруппу В, образованную гаплотипами центрально-кавказских зверьков. В отличие от других горных выборок, малые суслики из окрестности с. Хасаут оказываются ближе к равнинным гаплотипам и формируют вместе с ними одну гаплогруппу А1.

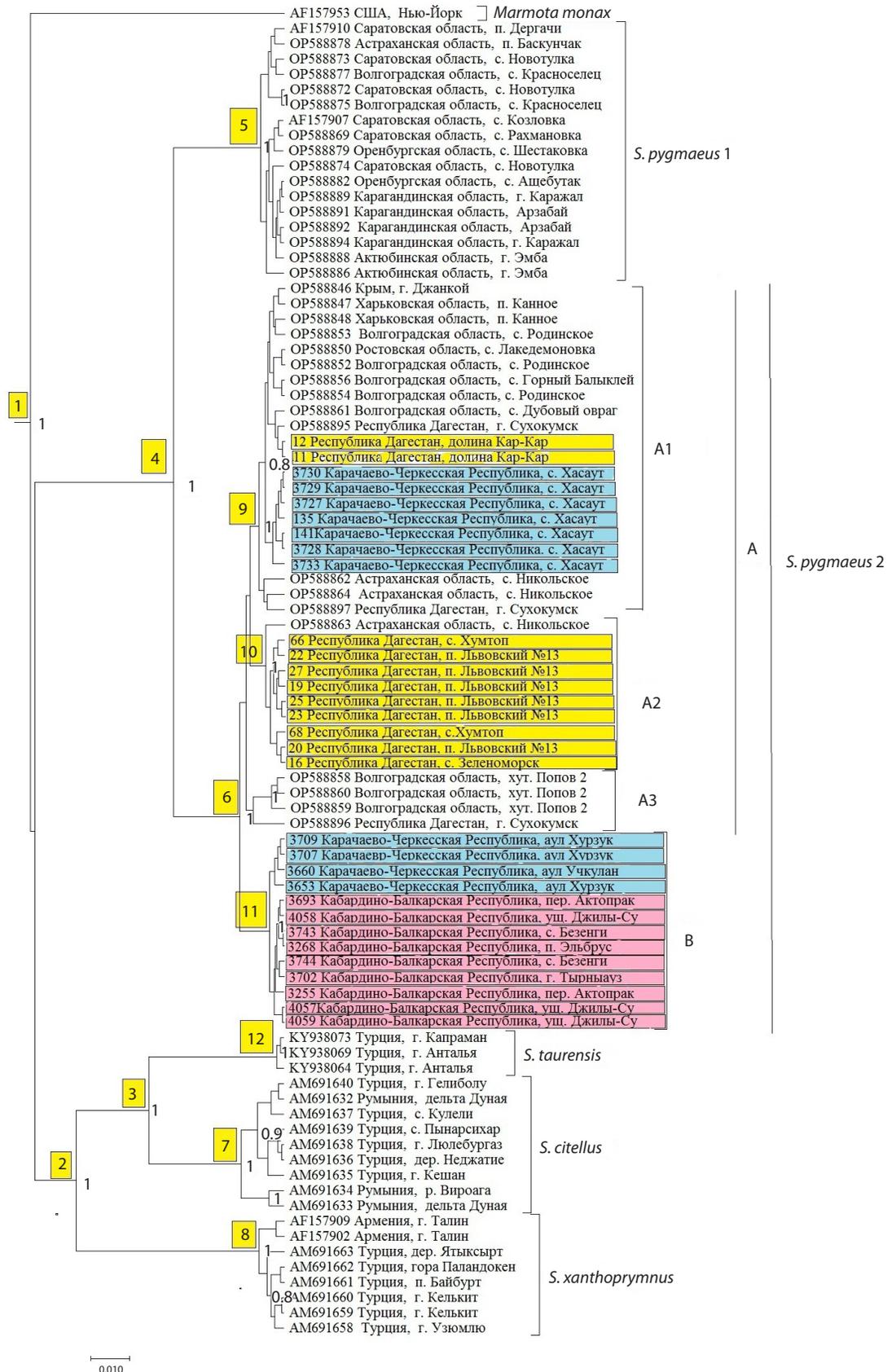


Рис. 2. Байесовское филогенетическое дерево представителей рода *Spermophilus*, основанное на анализе гена *cyt b* мтДНК (840 п. н.), по (Темботова и др., 2024), с дополнениями.

Числа в узлах ветвления – значения апостериорных вероятностей (больше 0.70), числа в квадратах – номера узлов. Желтым цветом выделены гаплотипы малого суслика Республики Дагестан, голубым – Карачаево-Черкесской Республики, розовым – Кабардино-Балкарской Республики.

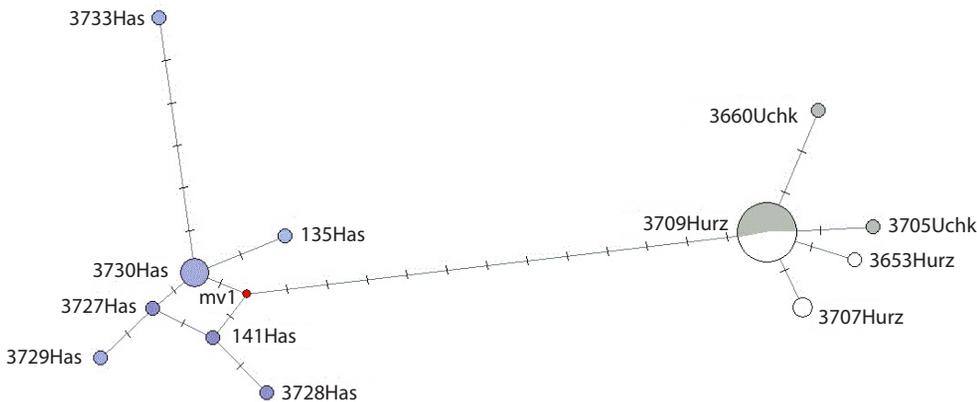


Рис. 3. Медианная сеть гаплотипов мтДНК *S. pygmaeus*, построенная на основе анализа участка *cyt b* (алгоритм median-joining, Network 4.6.1).

Величина круга пропорциональна количеству идентичных гаплотипов. Гаплотипы, выявленные на территории Карачаево-Черкесской Республики: Hurz (окрестности аула Хурзук), выделены белым цветом, Uchk (окр. аула Учкулан) – серым, Has (окр. с. Хасаут) – сиреневым. Число поперечных штрихов на ветвях соответствует числу нуклеотидных замен, маркировкой "mv" обозначены гипотетические гаплотипы.

Медианная сеть гаплотипов также демонстрирует существующее распределение обнаруженных на территории Карачаево-Черкесской Республики гаплотипов на две основные гаплогруппы (рис. 3). Отдельную компактную гаплогруппу формируют митотипы из окрестности с. Хасаут. Во вторую гаплогруппу вошли митотипы малого суслика из Учкулана и Хурзука. Генетическая дистанция между двумя гаплогруппами составила 1.54 %.

Полученные 32 последовательности из Карачаево-Черкесской Республики сформировали 12 гаплотипов, из которых девять были уникальными, а три описаны у 2–17 особей. Максимальное количество уникальных гаплотипов (60 %) отмечается в выборке из окрестностей с. Хасаут (см. табл. 1, рис. 3). Наиболее часто встречающийся митотип 3709Hurz отмечен у восьми особей из окрестностей аула Хурзук и девяти особей из окрестностей аула Учкулан. Для 22 исследованных особей из Учкулана и Хурзука описано всего пять гаплотипов, в том числе три уникальных. Возможно, утрата гаплотипов связана с общим снижением численности.

Для уточнения кластеризации анализируемых гаплотипов была построена дополнительная медианная сеть (рис. 4) с включением в анализ ранее полученных нами (Темботова и др., 2024) и О.А. Ермаковым с коллегами (Ermakov et al., 2023) последовательностей малого суслика.

Анализ медианной сети демонстрирует разделение гаплотипов малого суслика на две группы: равнинную (А), которая в свою очередь подразделяется на три гаплогруппы (А1, А2, А3), и горную (В). Как было показано ранее, выборка из окрестностей с. Хасаут кластеризуется вместе с митотипами из гаплогруппы А1. Сюда же попали и гаплотипы 11Kar и 12Kar из Восточного Кавказа (Республика Дагестан, долина Кар-Кар 1). Генетическая дистанция между зверьками из долины Кар-Кар 1 и окрестностей с. Хасаут составила всего 0.36 %. Гаплотипы зверьков из Учкулана и Хурзука вместе с центрально-кавказскими выборками (с. Безенги, Актопракский перевал, окрест-

ности г. Тырнауз, ущелье Ирикчат, урочище Джилы-Су) сформировали отдельную гаплогруппу В. Наиболее часто встречающийся гаплотип 3709Hurz из Карачаево-Черкесии отличается от гаплотипа 3743Bez, описанного у 39 особей из разных географических точек Центрального и Западного Кавказа, всего лишь на одну замену. Кроме того, важно отметить, что гаплотип 3705Uch оказался идентичным центрально-кавказскому гаплотипу 3743Bez. Гаплогруппа А2 образована гаплотипами только восточно-кавказских животных.

Анализ генетической изменчивости показал, что для выборок малого суслика из окрестностей аулов Учкулан и Хурзук характерны низкие значения гаплотипического (h) и нуклеотидного (π) разнообразия (табл. 2). В выборке из окрестностей с. Хасаут, напротив, наблюдаются относительно высокие значения нуклеотидного и гаплотипического разнообразия: 0.0028 и 0.867 соответственно. Учитывая, что данная выборка кластеризуется отдельно от остальных выборок из Карачаево-Черкесии, мы рассчитали параметры генетической изменчивости популяций только для двух объединенных выборок – Учкулан и Хурзук. В итоге для совокупной выборки (n = 22) гаплотипическое разнообразие составило 0.407 ± 0.128 , нуклеотидное – 0.0006 ± 0.0006 .

Значения тестов Таджимы (Tajima's D) и Фу (Fu's Fs) во всех трех выборках были отрицательными (см. табл. 2), а достоверными – в выборках Учкулан и Хасаут и в объединенной выборке (Учкулан+Хурзук).

Из трех отмеченных гаплогрупп малого суслика (А1, А2 и В) в большей степени генетически обособленными оказываются А1 и В, между которыми генетическая дистанция составила 1.46 %. Почти такая же дистанция (1.41 %) получена между гаплогруппами А2 и В. И наконец, минимальное значение (0.74 %) получено при сравнении группировок А1 и А2. Касательно генетических дистанций между тремя исследуемыми выборками из Карачаево-Черкесской Республики следует отметить, что при сравнении малого суслика из Учкулана и Хурзу-

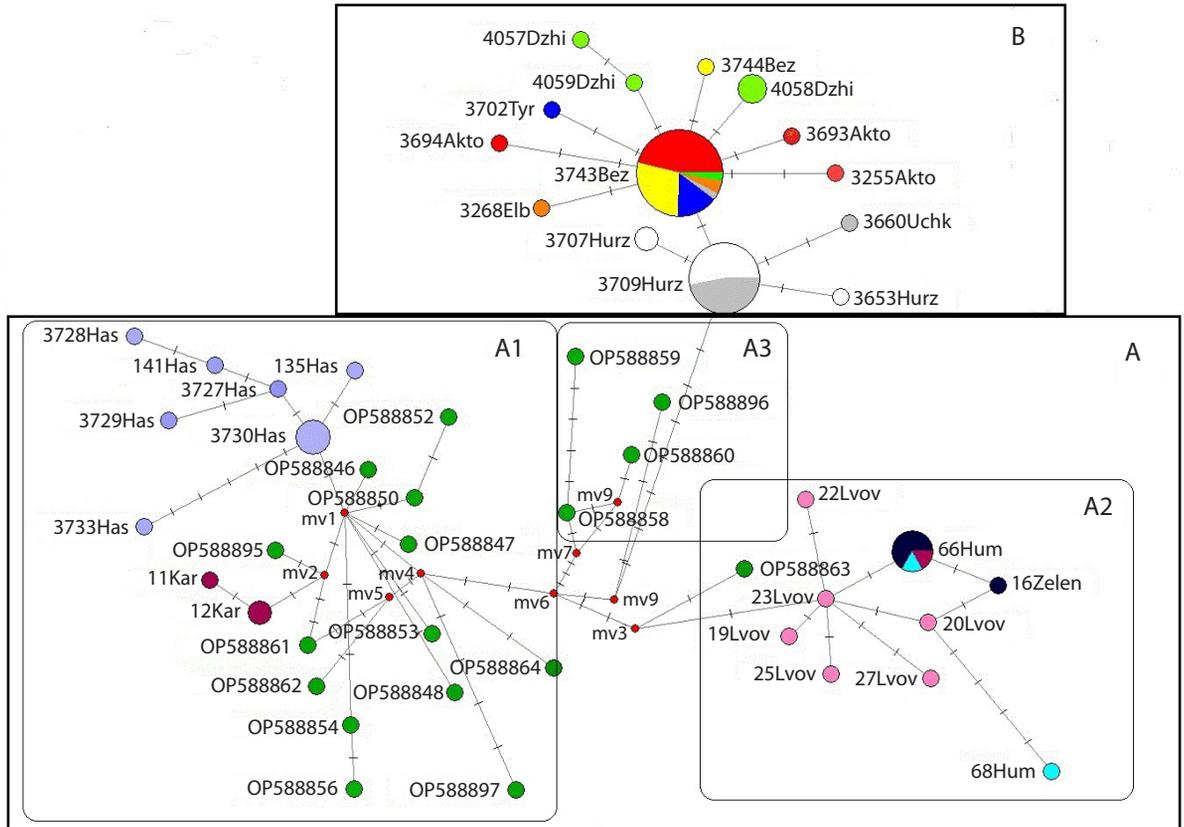


Рис. 4. Медианная сеть гаплотипов мтДНК *S. pugnatus*, построенная на основе анализа участка *cyt b* (алгоритм median-joining, Network 4.6.1).

Величина круга пропорциональна количеству идентичных гаплотипов. *Выявленные гаплотипы:* на территории Республики Дагестан: Kar (долина Кар-Кар) – коричневый цвет, Zelen (окр. с. Зеленоморск) – черный, Hum (окр. с. Хумтоп) – голубой, Lvov (окр. пос. Львовский 13) – розовый; на территории Кабардино-Балкарской Республики: Tyr (окр. г. Тырныауз) – синий цвет, Bez (окр. с. Безенги) – желтый, Akto (Актопракский перевал) – красный, Elb (окр. пос. Эльбрус) – оранжевый, Dzhi (урочище Джилы-Су) – салатовый; на территории Карачаево-Черкесской Республики: Hurz (окр. аула Хурзук) – белый цвет, Uchk (окр. аула Уччулан) – серый, Has (окр. с. Хасаут) – сиреневый. Число поперечных штрихов на ветвях соответствует числу нуклеотидных замен, маркировкой “mv” обозначены гипотетические гаплотипы.

Таблица 2. Показатели гаплотипического (h) и нуклеотидного (π) разнообразия и значения тестов Таджимы и Фу для *S. pugnatus* из Карачаево-Черкесской Республики

Географические группировки (размер выборки)	N	π ± S.E.	h ± S.E.	Tajima's D	Fu's F
Хасаут (n = 10)	7	0.0028 ± 0.0019	0.867 ± 0.107	-1.765	-2.756
Хурзук (n = 11)	3	0.0006 ± 0.0006	0.473 ± 0.162	-0.778	-0.659
Уччулан (n = 11)	3	0.0004 ± 0.0005	0.346 ± 0.172	-1.430	-1.246
Для <i>Spermophilus</i> без Хасаута (n = 22)	5	0.0006 ± 0.0006	0.407 ± 0.128	-1.667	-2.662

Примечание. N – число гаплотипов; S.E. – стандартная ошибка. Статистически достоверные значения тестов выделены полужирным шрифтом.

ка ее значение равнялось нулю. А выборка из Хасаута в равной степени отличалась от группировок *S. pugnatus* из Уччулана и Хурзука с дистанцией 1.53 %.

Генетические дистанции между географическими выборками *S. pugnatus* Северного Кавказа приведены в табл. 3. Как видно, выборка из окрестностей с. Хасаут отличается от остальных центрально-кавказских выборок (Актопрак, Безенги, Ирикчат, Тырныауз, Джилы-Су) с дистанциями 1.5–1.7 %, тогда как от восточно-кавказских – с дистанциями 0.4–1.0 %. При сравнении двух за-

падно-кавказских выборок (Уччулан, Хурзук) с центрально-кавказскими эти значения составили всего 0–0.2 %, а при аналогичном сравнении с восточно-кавказскими выборками минимальная дистанция была равна 1.2 %, а максимальная – 1.7 %.

Анализ распределения частот парных нуклеотидных различий между гаплотипами (рис. 5) проведен также для двух выборок: из окрестностей с. Хасаут и для объединенной выборки Уччулан+Хурзук. В объединенной выборке отмечается унимодальный характер распределения,

Таблица 3. Генетические дистанции между географическими выборками *S. pygmaeus* Северного Кавказа (участок гена *cyt b* мтДНК)

Выборка	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. Перевал Актопрак		0.004	0.000	0.000	0.001	0.001	0.000	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000
2. Окр. с. Хасаут	0.015		0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003	0.002	0.003	0.004
3. Окр. с. Безенги	0.000	0.017		0.000	0.001	0.001	0.000	0.004	0.004	0.004	0.005	0.004	0.000
4. Окр. пос. Эльбрус	0.000	0.017	0.000		0.001	0.001	0.000	0.004	0.004	0.004	0.005	0.004	0.000
5. Окр. аула Хурзук	0.001	0.015	0.001	0.001		0.000	0.001	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.001
6. Окр. аула Учкулан	0.001	0.015	0.001	0.001	0.000		0.001	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.001
7. Ущ. Джилы-Су	0.000	0.017	0.000	0.000	0.002	0.001		0.004	0.004	0.004	0.005	0.004	0.000
8. Окр. пос. Хумтоп	0.012	0.009	0.013	0.013	0.012	0.012	0.014		0.000	0.000	0.004	0.000	0.004
9. Окр. пос. Львовский 13	0.014	0.008	0.015	0.015	0.014	0.014	0.015	0.000		0.001	0.004	0.001	0.004
10. Окр. с. Зеленоморск	0.015	0.010	0.017	0.017	0.015	0.015	0.017	0.000	0.001		0.004	0.000	0.004
11. Долина Кар-Кар 1	0.017	0.004	0.018	0.018	0.017	0.017	0.019	0.010	0.010	0.011		0.004	0.005
12. Долина Кар-Кар 2	0.016	0.010	0.017	0.017	0.016	0.016	0.017	0.000	0.001	0.000	0.011		0.004
13. Окр. г. Тырнауз	0.000	0.017	0.000	0.000	0.001	0.001	0.000	0.013	0.015	0.017	0.018	0.017	

Примечание. Под диагональю приведены значения межгрупповых дистанций, над диагональю – соответствующие значения стандартной ошибки.

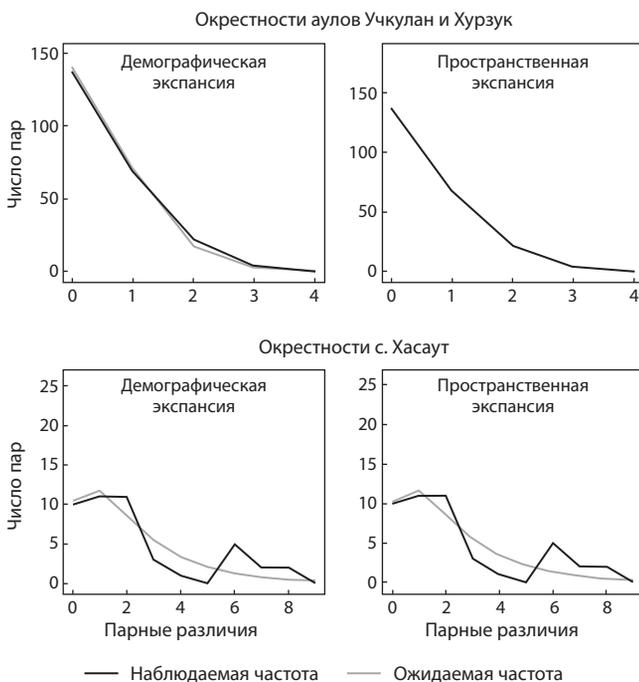


Рис. 5. Гистограммы распределения парных различий (mismatch distribution) *S. pygmaeus* окрестностей аулов Учкулан+Хурзук и окрестностей с. Хасаут (демографическая экспансия и пространственная экспансия).

близкий к ожиданиям для растущей популяции, что может указывать на недавнюю демографическую экспансию или пространственное расширение (менее 200 тыс. лет назад) после падения численности. Анализ распределения числа нуклеотидных замен в выборке из окрестностей с. Хасаут

выявил мультимодальность, что, вероятно, говорит о наличии двух и более субпопуляций.

Как отмечено ранее (Темботова и др., 2024), результаты молекулярного датирования были получены на основании трех калибровочных точек: 10.9 млн лет – для корневого узла расхождения *Marmota* и других видов *Spermophilus* (Yin et al., 2014); 5 млн лет – время дивергенции между *S. xanthoprimum* и *S. citellus* + *S. taurensis*; 2.5 млн лет – между *S. citellus* и *S. taurensis* (Gündüz et al., 2007). Включение в анализ дополнительных выборок из Карачаево-Черкесии не повлияло существенно на эти результаты, и возраст многих узлов остался практически прежним (табл. 4).

Что касается выборок из Карачаево-Черкесской Республики, эволюционный возраст группировки малого суслика из Хасаута вместе с некоторыми гаплотипами из Дагестана (11, 12, долина Кар-Кар, OP588895, OP588897, Сухокумск), а также Крыма, Харьковской, Волгоградской, Ростовской, Астраханской областей составил 369 тыс. лет (95 % HPD: 0.217–0.538 млн лет) (узел 9) для модели, рассчитанной для частоты мутаций 0.5 % за миллион лет. Остальные гаплотипы зверьков из Карачаево-Черкесии (Учкулан, Хурзук) попали в кластер В, сформированный митотипами центрально-кавказских зверьков. Возраст данного кластера составил 182 тыс. лет (95 % HPD: 0.080–0.300 млн лет) (узел 11).

Обсуждение

На основании полученных 32 последовательностей было описано 12 гаплотипов, распредившихся по двум гаплогруппам (А и В). Филогенетический анализ показал, что обнаруженные гаплотипы вошли в состав описанных нами ранее горной (центрально-кавказской) и равнинной (восточно-кавказской) группировок. Как видно из медиан-

Таблица 4. Время расхождения (млн лет) таксонов и отдельных кластеров *Spermophilus* с шестью вариантами скоростей эволюции

Номер узла на дереве	Скорость эволюции					
	0.5 %	0.9 %	1.2 %	2.4 %	3.1 %	6.7 %
1. <i>Marmota</i> / <i>Spermophilus</i>	8.479	7.625	7.351	6.491	6.244	5.532
2. <i>S. xanthoprimum</i> / <i>S. taurensis</i> + <i>S. citellus</i>	4.708	4.270	4.135	3.676	3.536	3.254
3. <i>S. taurensis</i> / <i>S. citellus</i>	2.624	2.410	2.340	2.109	2.037	1.829
4. <i>S. pygmaeus</i> 1 («восточная») / <i>S. pygmaeus</i> 2 («западная») группы	2.287	2.014	1.923	1.638	1.545	1.224
5. <i>S. pygmaeus</i> 1 («восточная» группа)	0.349	0.309	0.295	0.252	0.240	0.194
6. <i>S. pygmaeus</i> 2 («западная» группа)	0.735	0.646	0.617	0.526	0.498	0.400
7. <i>S. citellus</i>	0.740	0.657	0.629	0.546	0.516	0.421
8. <i>S. xanthoprimum</i>	0.415	0.366	0.351	0.302	0.286	0.234
9. <i>S. pygmaeus</i> (гаплогруппа А1)	0.369	0.325	0.310	0.266	0.252	0.203
10. <i>S. pygmaeus</i> (гаплогруппа А2)	0.262	0.230	0.221	0.189	0.179	0.146
11. <i>S. pygmaeus</i> (гаплогруппа В)	0.182	0.161	0.155	0.133	0.127	0.103
12. <i>S. taurensis</i>	0.108	0.096	0.092	0.081	0.077	0.063

ной сети гаплотипов, выборка из окрестностей с. Хасаут обособлена от других горных западно- и центрально-кавказских выборок и наиболее близка к восточно-кавказским равнинным выборкам малого суслика. Генетические дистанции, полученные при сравнении трех выборок из Карачаево-Черкесской Республики, подтверждают генетическую обособленность выборки из окрестностей с. Хасаут. Данная выборка отличается от двух других (Учкулан, Хурзук) с дистанцией 1.54 %. Таким образом, результаты проведенного исследования позволяют заключить, что на рассматриваемых территориях (Учкулан, Хурзук, Хасаут) вид *S. pygmaeus* не является гомогенным и представлен двумя генетически различающимися группировками малого суслика. При этом одна из группировок ближе к восточно-кавказским (равнинным), а другая – к центрально-кавказским (горным) выборкам. Селение Хасаут находится на левом берегу одноименной реки, чуть ниже впадения в нее р. Бермамыт, в 6 км от вершины Большой Бермамыт. Согласно данным А.И. Дятлова с коллегами (1980), в окрестностях горы Бермамыт горные малые суслики в нескольких местах (пять поселений) проникли севернее Скалистого хребта, чего не отмечается в другой части ареала. Это единственное место в зоне разрыва, где реки не образуют преград между популяциями в горах и на равнинах.

Из трех изученных группировок *S. pygmaeus* из Карачаево-Черкесии низкими значениями показателей гаплотипического ($h = 0.346-0.473$) и нуклеотидного ($\pi = 0.0004-0.0006$) разнообразия характеризуются выборки Учкулан и Хурзук (см. табл. 2). Аналогичные данные были получены ранее и для центрально-кавказских выборок (Кабардино-Балкарская Республика) малого суслика, происходящих с высоты 1200–1500 м над ур. моря (Темботова и др., 2024).

Низкое генетическое разнообразие в эльбрусской выборке было выявлено также в работе (Ermakov et al., 2023): гаплотипическое разнообразие – 0.333 ± 0.215 , нуклеотидное – 0.03 %. Для сравнения отметим, что у группировок

малого суслика с западной и восточной линии значения показателя гаплотипического разнообразия варьировали от 0.859 до 0.964, а уровень нуклеотидного разнообразия π изменялся от 0.17 до 0.76 %, что в шесть раз и более выше, чем в эльбрусской выборке (Ermakov et al., 2023). Таким образом, результаты как настоящего, так и предыдущего исследования показывают, что для большинства горных выборок малого суслика Западного и Центрального Кавказа (за исключением высокогорного ущелья Джилы-Су) характерен низкий уровень генетического разнообразия (Темботова и др., 2024). Низкие значения h и π могут быть следствием серьезного падения численности в течение длительного времени (эффект «бутылочного горлышка») (Холодова, 2006; Абрамсон, 2007). Не исключено, что горные популяции малого суслика неоднократно испытывали снижение численности. Низкое генетическое разнообразие может приводить к снижению адаптивных возможностей отдельных особей и популяций и увеличивать риск их исчезновения (Gitzendanner, Soltis, 2000; Willi et al., 2006). В выборке из окрестностей с. Хасаут выявлены относительно высокие значения отмеченных показателей. Так, гаплотипическое разнообразие было почти в два, а нуклеотидное в пять раз и более выше, чем в остальных двух выборках (Учкулан, Хурзук) малого суслика. По уровню генетического разнообразия выборка из окрестностей с. Хасаут оказывается ближе к ранее изученным равнинным выборкам из южной окраины Прикаспийской низменности Восточного Кавказа, нежели к горным. Подобное соотношение показателей генетического разнообразия (высокие h и π) характерно не только для популяций, имеющих высокую численность на протяжении длительного времени, но и для сформировавшихся в результате объединения прежде изолированных и генетически неоднородных группировок (Rogers, Harpending, 1992).

Достоверно отрицательные значения теста Таджимы, наблюдаемые практически во всех выборках *S. pygmaeus*,

могут свидетельствовать о недавней популяционной экспансии после снижения численности (эффект «бутылочного горлышка»).

Гистограммы показывают (см. рис. 5), что в выборке из окрестностей с. Хасаут распределение нуклеотидных различий носит мультимодальный характер, что не соответствует ожидаемому распределению. Расхождения между ожидаемым и наблюдаемым распределением говорят о высокой гетерогенности выборки. В объединенной выборке (Учкулан и Хурзук) две кривые показывают хорошее совпадение и имеют унимодальный характер распределения (см. рис. 5).

Возраст так называемой равнинной группировки (гаплогруппа А1), в которую вошли митотипы малого суслика из Хасаута, составил менее 400 тыс. лет. Возраст клады А2, представленной сусликами Восточного Кавказа, – менее 300 тыс. лет. Группа малых сусликов Западного (Учкулан, Хурзук) и Центрального Кавказа, образующих кладу В, является филогенетически более молодой. Ее возраст менее 200 тыс. лет. Вычисленный возраст не противоречит данным и мнению других авторов, считавших, что предки современных горных сусликов в разное время проникали в высокогорье из равнинных районов (Цвирка, Кораблев, 2014). Учитывая высказывания многих ученых (Свириденко, 1927; Иофф, 1936; Варшавский, 1963) о том, что в новой истории ареала малого суслика приходится иметь дело не с первичным, а по существу с повторным расселением данного грызуна, можно предположить, что разный эволюционный возраст трех выявленных гаплогрупп *S. pygmaeus* связан с многоэтапным расселением малого суслика по исследуемой территории.

Данные молекулярного датирования позволяют предполагать, что западная гаплогруппа малого суслика проникла сплошной полосой на Центральный, Восточный Кавказ и восточную оконечность Западного Кавказа через Ставропольскую возвышенность и Прикаспийскую низменность менее 400 тыс. лет назад.

Возможно, в результате первого этапа заселения малый суслик закрепился на восточной оконечности Западного Кавказа в районе Хасаута, а также на равнине и в предгорьях Кабардино-Балкарии, где до 1990 г. существовали стабильные популяции суслика (Темботов и др., 1969; Темботова, Кононенко, 2017), которые с конца XX в. не регистрируются в Кабардино-Балкарской Республике. Менее 200 тыс. лет назад в ходе расселения вид поднялся в горы на высоту 2000 м над ур. моря и выше по Баксанскому, Малкинскому и Черекскому ущельям. Видимо, по субальпийскому поясу он проник и на пограничные территории Карачаево-Черкесии, о чем свидетельствует один и тот же эволюционный возраст животных Западного (Учкулан, Хурзук) и Центрального Кавказа.

На Восточном Кавказе в процессе первой волны расселения суслика с Русской равнины вид закрепился на севере Ногайской степи (Сухокумск) и южных окраинах Прикаспийской низменности (долина Кар-Кар). Очевидно, что проникновение в южные районы Прикаспийской низменности малого суслика происходило через всю Прикаспийскую низменность, исходя из чего можно ожидать, что митотипы вида на всей ее территории будут одного эволюционного возраста. Однако Каспий в геологическое

время очень долго менял очертания, низменность регулярно затопливалась, а затем освобождалась от воды, поэтому стабильной популяции здесь не существовало. Из изложенного следует предположение, что Прикаспийская низменность в районах Хумтопа, Львовского и Зеленоморска уже повторно была заселена сусликом спустя 100 тыс. лет и более вероятно, что заселение шло с Русской равнины.

Заключение

На Северный Кавказ суслик проник из западной части обширного ареала, охватывающего равнину Восточной Европы, северного Крыма, Предкавказья и северных частей Средней Азии (Верещагин, 1959). Возраст западной гаплогруппы составляет около 800 тыс. лет. Распространение в северные части Средней Азии и на Северный Кавказ происходило, скорее всего, параллельно, так как возраст восточной гаплогруппы *S. pygmaeus* 1 и самый старший возраст гаплогрупп, появившихся на Северном Кавказе, имеют близкие значения: в пределах 350–400 тыс. лет для *S. pygmaeus* 1 и гаплогруппы А1 (см. рис. 2). При этом на Северный Кавказ суслик заселялся сплошной полосой на Центральный, Восточный Кавказ и восточную оконечность Западного Кавказа через Ставропольскую возвышенность и Прикаспийскую низменность.

В результате первой волны заселения малый суслик закрепился на Западном Кавказе в районе Хасаута, а на Центральном Кавказе – на равнине и в предгорьях Кабардино-Балкарии, где до 1990 г. существовали стабильные популяции суслика (Темботов и др., 1969; Темботова, Кононенко, 2017), которые с конца XX в. не регистрируются. Отсутствие сплошного пояса лесов на Центральном Кавказе, в частности в Кабардино-Балкарии, позволило позже, менее 200 тыс. лет назад, проникнуть *S. pygmaeus* в горы по трем ущельям: Черекскому, Баксанскому и Малкинскому. Более вероятно, что в субальпийку Западного Кавказа (Хурзука и Учкулана) вид расселялся уже с Центрального Кавказа.

Популяция в Хасауте, по-видимому, является генетическим изолятом, что подтверждается генетическими дистанциями (в пределах 1.54–1.69 %) (см. табл. 3) с животными из соседних районов Карачаево-Черкесии (Учкулан, Хурзук) и Кабардино-Балкарии (Безенги, Актюпрак, Джилы-Су, Ирикчат, Тырныауз), однако необходимы дальнейшие исследования.

Первая волна расселения суслика на Восточном Кавказе (в Дагестане) сохранилась до наших дней на севере Ногайской степи в районе Сухокумска и на юге Прикаспийской низменности в долине Кар-Кар 1, что подтверждает эволюционный возраст гаплогруппы А1. Более молодой возраст гаплогруппы А2 (менее 300 тыс. лет), также происходящей с Восточного Кавказа (Хумтоп, Зеленоморск, Львовский 13, Кар-Кар 2), возможно, обусловлен повторным заселением Прикаспийской низменности, регулярно затопливаемой водами Каспия в историческое время. Об этом свидетельствует и генетическая дистанция (0.76–1.1 %, см. табл. 3) между животными из долины Кар-Кар 1 и центральных районов Прикаспийской низменности (Хумтоп, Зеленоморск, Львовский 13). Это дает основание считать, что заселение, видимо, шло с Русской равнины и между популяциями существует слабый поток генов,

что, вероятно, связано как с малой подвижностью вида, сезонными перемещениями его молодняка на небольшие расстояния, не превышающие 5 км (Наумов, 2010), так и с низкой численностью.

Касательно таксономического статуса кавказского горного суслика, считаем преждевременным делать какие-либо выводы, поскольку не все территории Кавказа были охвачены исследованиями. Тем не менее результаты, полученные как в настоящей работе, так и ранее (Темботова и др., 2024), позволяют предположить, что генетические дистанции (1.33–1.67 %) между равнинными и горными выборками малого суслика Северного Кавказа соответствуют только уровню внутривидовых различий, согласно градации, приводимой для рода *Spermophilus* по (Baker, Brandley, 2006). Здесь можно согласиться с мнением Н.Н. Воронцова и Е.А. Ляпуновой (1969), сделанным на основании кариологического анализа, что *S. musicus* является дериватом *S. pygmaeus*. Согласно данным (Цвирка, Кораблев, 2014), значительные преобразования кариотипа горного суслика происходили уже после заселения им горных районов. С течением времени возникшие признаки закрепились и привели к устойчивой изоляции горного кавказского суслика от равнинных популяций малого. Наблюдаемая нами у вида *S. pygmaeus* в условиях Северного Кавказа генетическая дифференциация и структурированность, возможно, обусловлены также географической изоляцией равнинных и горных популяций, вызвавшей возникновение локальных адаптаций к условиям обитания в результате сокращения численности и фрагментации ареала, что наблюдается и в настоящее время.

Список литературы / References

- Абрамсон Н.И. Филогеография: итоги, проблемы, перспективы. *Информационный вестник ВООиС*. 2007;11(2):307-331 [Abramson N.I. Phylogeography: results, issues and perspectives. *Informatsionny Vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders*. 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 Obshchey Biologii = Journal of General Biology*. 2004;65(4):278-305 (in Russian)]
- Варшавский С.Н. Возраст поселений малого суслика в различных ландшафтных зонах в связи с расселением и историей ареала вида. *Бюллетень МОИП. Отделение биологическое*. 1963;68(5):3-14 [Varshavskii S.N. The age of little souslik settlements in different landscape zones in connection with the dissemination and history of the species range. *Byulleten MOIP = Bulletin of Moscow Society of Naturalists. Biological Series*. 1963;68(5):3-14 (in Russian)]
- Верещагин Н.К. Млекопитающие Кавказа. История формирования фауны. М.; Л.: Академия наук СССР, 1959 [Vereshchagin N.K. The Mammals of the Caucasus. A History of the Evolution of the Fauna. Moscow; Leningrad, 1959 (in Russian)]
- Виноградов Б.С., Аргиропуло А.И. Определитель грызунов. Фауна СССР. Млекопитающие. М.: Наука, 1941 [Vinogradov B.S., Argiropulo A.I. Guide to Rodents. Fauna of the USSR. Mammals. Moscow: Nauka Publ., 1941 (in Russian)]
- Воронцов Н.Н., Ляпунова Е.А. Хромосомы сусликов Палеарктики (*Citellus*, Marmotinae, Sciuridae, Rodentia). В: Млекопитающие: эволюция, кариология, фаунистика, систематика. Новосибирск, 1969;41-47 [Vorontsov N.N., Lyapunova E.A. Chromosomes of Palaearctic ground squirrels (*Citellus*, Marmotinae, Sciuridae, Rodentia). In: Mammals: Evolution, Karyology, Faunistics, Systematics. Novosibirsk, 1969;41-47 (in Russian)]
- Громов И.М., Баранова Г.И. Каталог млекопитающих СССР (плиоцен–современность). Л.: Наука, 1981 [Gromov I.M., Baranova G.I. Catalogue of Mammals of the USSR (Pliocene–Recent). Leningrad: Nauka Publ., 1981 (in Russian)]
- Громов И.М., Ербаева М.А. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Зайцеобразные и грызуны. СПб., 1995 [Gromov I.M., Erbaeva M.A. Mammals of the Fauna of Russia and Adjacent Territories. Hares and Rodents. St. Petersburg, 1995 (in Russian)]
- Дятлов А.И., Петров П.А., Голубев П.Д., Труфанов Г.В. О структуре ареала малых сусликов (*Citellus pygmaeus* Pall., 1778) в Приэльбрусье. *Экология*. 1980;5:77-83 [Dyatlov A.I., Petrov P.A., Golubev P.D., Trufanov G.V. On the structure of the range of small gophers (*Citellus pygmaeus* Pall., 1778) in the Elbrus region. *Ekologiya = Ecology*. 1980;5:77-83 (in Russian)]
- Ермаков О.А., Титов С.В., Савинецкий А.Б., Сурин В.Л., Зборовский С.С., Ляпунова Е.А., Брандлер О.В., Формозов Н.А. Молекулярно-генетические и палеоэкологические аргументы в пользу конспецифичности малого (*Spermophilus pygmaeus*) и горного (*S. musicus*) сусликов. *Зоологический журнал*. 2006;85(12):1474-1483 [Ermakov O.A., Titov S.V., Savinetskii A.B., Surin V.L., Zborovskiy S.S., Lyapunova E.A., Brandler O.V., Formozov N.A. Molecular-genetic and paleoecological arguments for conspecificity of little (*Spermophilus pygmaeus*) and Caucasian mountain (*S. musicus*) ground squirrels. *Zoologicheskij Zhurnal = Zoological Journal (Moscow)*. 2006;85(12):1474-1483 (in Russian)]
- Ермаков О.А., Симонов Е.П., Сурин В.Л., Титов С.В. Внутривидовой полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК и филогеография малого суслика (*Spermophilus pygmaeus*, Sciuridae, Rodentia). *Генетика*. 2018;54(11):1316-1326. doi 10.1134/S0016675818110048 [Ermakov O.A., Simonov E.P., Surin V.L., Titov S.V. Intraspecific polymorphism of the mitochondrial DNA control region and phylogeography of little ground squirrel (*Spermophilus pygmaeus*, Sciuridae, Rodentia). *Russ J Genet*. 2018;54(11):1332-1341. doi 10.1134/S1022795418110042]
- Иванов И.В. Малый суслик Северного Кавказа. В: Фауна, экология и охрана животных Северного Кавказа. Вып. 3. Нальчик, 1976; 36-88 [Ivanov I.V. Small ground squirrel of the North Caucasus. In: Fauna, Ecology and Protection of Animals of the North Caucasus. Iss. 3. Nalchik, 1976;36-88 (in Russian)]
- Июфф И.Г. О географическом распространении сусликовых блох в связи с историей расселения сусликов. В: Паразитологический сборник Зоологического института АН СССР. Л.: АН СССР, 1936;6:313-361 [Ioff I.G. On the geographical distribution of gopher fleas in connection with the history of settlement of gophers. In: Parasitological Collection of the Zoological Institute of the USSR Academy of Sciences. Leningrad: AN USSR Publ., 1936;6:313-361 (in Russian)]
- Калабухов Н.И. Плотность заселения сусликами чумных районов Северо-Кавказского края и возможность сплошной очистки от сусликов. *Труды по защите растений*. 1933;4(2):65-86 [Kalabukhov N.I. Ground squirrel population density in plague regions of the North Caucasus region and the possibility of total extermination of ground squirrels. *Works on Plant Protection*. 1933;4(2):65-86 (in Russian)]
- Карасева Е.В., Телицина А.Ю. Методы изучения грызунов в полевых условиях. М.: Наука, 1996 [Karaseva E.V., Telitsina A.Yu. The Methods of Studying Rodents in the Wild Nature. Moscow: Nauka Publ., 1996 (in Russian)]

- Кораблев В.П. Цитогенетические различия между горным и малым сусликами. В: Популяционная изменчивость вида и проблемы охраны генофонда млекопитающих. М., 1983;91-92 [Korablev V.P. Cytogenetic differences between the mountain and little ground squirrels. In: Population Variability of Species and Problems of Protecting the Gene Pool of Mammals. Moscow, 1983; 91-92 (in Russian)]
- Красная книга Кабардино-Балкарской Республики. Нальчик: Печатный двор, 2018 [Red Book of the Kabardino-Balkarian Republic. Nalchik: Pechatnyi Dvor Publ., 2018 (in Russian)]
- Лукашов В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. М.: Бином, 2009 [Lukashov V.V. Molecular Evolution and Phylogenetic Analysis. Moscow: Binom Publ., 2009 (in Russian)]
- Млекопитающие фауны СССР. М.; Л.: Наука, 1963 [Mammalian Fauna of the USSR. Moscow; Leningrad: Nauka Publ., 1963 (in Russian)]
- Наумов Н.П. Механизмы взаимодействия популяций (на примере некоторых млекопитающих и птиц). *Русский орнитологический журнал*. 2010;19(576):1003-1024 [Naumov N.P. Mechanisms of interaction of populations (some mammals and birds taken as an example). *Russian Journal of Ornithology*. 2010;19(576):1003-1024 (in Russian)]
- Никольский А.А., Ермаков О.В., Титов С.В. Географическая изменчивость малого суслика (*Spermophilus pygmaeus*): биоакустический анализ. *Зоологический журнал*. 2007;86(11):1379-1388 [Nikol'skii A.A., Ermakov O.V., Titov S.V. Geographical variability of the little ground squirrel (*Spermophilus pygmaeus*): a bioacoustic analysis. *Zoologicheskij Zhurnal = Zoological Journal (Moscow)*. 2007;86(11):1379-1388 (in Russian)]
- Оболенский С.И. Предварительный обзор палеарктических сусликов (q.q. *Citellus* и *Spermophilopsis*). *Доклады АН СССР*. 1927; 188-193 [Obolenskii S.I. A preliminary review of the palaeartic sousliks (*Citellus* and *Spermophilopsis*). *Doklady Akademii Nauk SSSR = Proceeding of the USSR Academy of Sciences*. 1927;188-193 (in Russian)]
- Огнев С.И. Род *Citellus* Окен. Звери СССР и прилежащих стран. Т. 5. М.; Л.: АН СССР, 1947;11-215 [Ognev S.I. Genus *Citellus* Oken. Animals of the USSR and Adjacent Countries. Vol. 5. Moscow; Leningrad, 1947;11-215 (in Russian)]
- Орлов В.Н., Родова М.А., Котенкова Е.В. Хромосомная дифференциация сусликов подрода *Citellus*. В: Млекопитающие: эволюция, кариология, фаунистика, систематика. Новосибирск, 1969; 48-49 [Orlov V.N., Rodova M.A., Kotenkova E.V. Chromosome differentiation of the ground squirrels subgenus *Citellus*. In: Mammals: Evolution, Karyology, Taxonomy, Fauna. Novosibirsk, 1969;48-49 (in Russian)]
- Павлинов И.Я., Лисовский А.А. Млекопитающие России: систематико-географический справочник. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2012 [Pavlinov I.Ya., Lisovsky A.A. The Mammals of Russia: A Taxonomic and Geographic Reference. Moscow: KMK Scientific Press Ltd, 2012 (in Russian)]
- Пастухов Б.Н. Эпизоотологическое состояние природных очагов чумы СССР в 1954–1956 годах и анализ проведенных мероприятий. В: Природная очаговость и эпидемиология особо опасных инфекций. Саратов, 1959;5-17 [Pastukhov B.N. Epizootological state of natural plague foci in the USSR in 1954–1956 and analysis of the measures taken. In: Natural Foci and Epidemiology of Especially Dangerous Infections. Saratov, 1959;5-17 (in Russian)]
- Сатунин К.А. Млекопитающие северо-восточного Предкавказья по сбору экспедиции Кавказского музея летом 1906 г. *Известия Кавказского музея*. 1907;3(2-3):94-142 [Satunin K.A. Mammals of northeastern Ciscaucasia according to the collection of the expedition of the Caucasian Museum in the summer of 1906. *Izvestiya Kavkazskogo Muzeya = Proceedings of the Caucasian Museum*. 1907;3(2-3):94-142 (in Russian)]
- Свириденко П.А. Распространение сусликов в Северо-Кавказском крае и некоторые соображения о происхождении фауны предкавказских и калмыцких степей. *Известия Северо-Кавказской краевой станции защиты растений*. 1927;3:123-171 [Sviridenko P.A. Prevalence of ground squirrels in the North Caucasus region and some considerations on the origin of the fauna of Ciscaucasian and Kalmyk steppes. *Izvestiya Severo-Kavkazskoy Krayevoy Stantsii Zashchity Rasteniy = Proceedings of the North-Caucasian Plant Protection Unit*. 1927;3:123-171 (in Russian)]
- Свириденко П.А. Суслик большого Кавказа *Citellus musicus* Menet. и происхождение горной степи. *Зоологический журнал*. 1937; 16(3):448-482 [Sviridenko P.A. The greater Caucasus ground squirrel *Citellus musicus* Menet. and the origin of the mountain steppe. *Zoologicheskij Zhurnal = Zoological Journal (Moscow)*. 1937;16(3):448-482 (in Russian)]
- Темботов А.К., Иванов В.Г., Иванов И.В., Темботова Э.Ж. О распространении и географической изменчивости малого суслика Северного Кавказа. *Бюллетень МОИП. Отделение биологическое*. 1969;74(5):28-41 [Tembotov A.K., Ivanov V.G., Ivanov I.V., Tembotova E.Zh. On the distribution and geographical variability of the little ground squirrel of the Northern Caucasus. *Byulleten MOIP = Bulletin of Moscow Society of Naturalists. Biological Series*. 1969;74(5):28-41 (in Russian)]
- Темботова Ф.А., Кононенко Е.П. Млекопитающие степных экосистем под угрозой исчезновения на Северном Кавказе. *Известия Самарского научного центра РАН*. 2017;19(5/2):253-259 [Tembotova F.A., Kononenko E.P. Mammals of steppe ecosystems under threat of extinction in the North Caucasus. *Izvestiya Samar-skogo Nauchnogo Tsentra RAN = Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. 2017;19(5/2):253-259 (in Russian)]
- Темботова Ф.А., Гудова М.С., Амшокова А.Х., Халидов А.Х. Генетическое разнообразие *Spermophilus pygmaeus* Pallas, 1779 (Sciuridae, Rodentia) на Северном Кавказе. *Генетика*. 2024; 60(7):62-74. doi 10.31857/S0016675824070056 [Tembotova F.A., Gudova M.S., Amshokova A.Kh., Khalidov A.Kh. Genetic diversity of the little ground squirrel *Spermophilus pygmaeus* Pallas, 1779 (Sciuridae, Rodentia) in the Northern Caucasus. *Russ J Genet*. 2024;60(7):908-919. doi 10.1134/S1022795424700340]
- Фауна СССР. Млекопитающие. Т. 3, вып. 2. Наземные белычьи (Marmotinae). М.; Л.: Наука, 1965 [Fauna of the USSR. Mammals. Vol. 3. Ground Squirrels (Marmotinae). Moscow; Leningrad: Nauka Publ., 1965 (in Russian)]
- Фрисман Л.В., Кораблев В.П., Цвирка М.В., Брандлер О.В., Ляпунова Е.А. Экспедиционные маршруты девяностых – вклад в исследование генетической дифференциации сусликов Палеарктики. *Зоологический журнал*. 2014;93(7):939-950. doi 10.7868/S0044513414070071 [Frisman L.V., Korablev V.P., Tsvirka M.V., Brandler O.V., Lyapunova E.A. Expeditions of the 1990s as a contribution to research of genetic differentiation of Palaeartic ground squirrels. *Zoologicheskij Zhurnal = Zoological Journal (Moscow)*. 2014;93(7):939-950. doi 10.7868/S0044513414070071 (in Russian)]
- Холодова М.В. Использование современной и древней ДНК для изучения динамики экосистем. В: Динамика современных экосистем в голоцене. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2006;261-266 [Kholodova M.V. Use of modern and ancient DNA for studying ecosystem dynamics. In: Dynamics of Modern Ecosystems in the Holocene. Moscow: Sci. Publ. House KMK, 2006;261-266 (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]
- Цвирка М.В., Кораблев В.П. К вопросу о хромосомном видообразовании на примере малого (*Spermophilus pygmaeus* (Pallas 1832)) и горного кавказского (*Spermophilus musicus* (Menetries 1832)) сусликов (Rodentia, Sciuridae). *Зоологический журнал*. 2014; 93(7):917-925. doi 10.7868/S0044513414070150
[Tsvirka M.V., Korablev V.P. A case of chromosomal speciation in little suslik (*Spermophilus pygmaeus* (Pallas 1832)) and Caucasian mountain suslik (*Spermophilus musicus* (Menetries 1832)) (Rodentia, Sciuridae). *Zoologičeskij Zhurnal = Zoological Journal (Moscow)*. 2014;93(7):917-925. doi 10.7868/S0044513414070150 (in Russian)]
- Цвирка М.В., Кораблев В.П., Челомина Г.Н. Генетическая дифференциация близких видов сусликов *Spermophilus musicus*, *S. pygmaeus*, *S. suslicus* (Rodentia, Sciuridae). В: Систематика, филогения и палеонтология мелких млекопитающих. СПб., 2003; 228-230
[Tsvirka M.V., Korablev V.P., Chelomina G.N. Genetic differentiation of closely related ground squirrel species *Spermophilus musicus*, *S. pygmaeus*, and *S. suslicus* (Rodentia, Sciuridae). In: Systematics, Phylogeny and Paleontology of Small Mammals. St. Petersburg, 2003;228-230 (in Russian)]
- Шилова С.А. Вопросы контроля численности и охраны сусликов России (род *Spermophilus*). *Аридные экосистемы*. 2011;17(4): 104-112
[Shilova S.A. Abundance control and conservation of sousliks in Russia (g. *Spermophilus*). *Arid Ecosyst*. 2011;1(4):267-272. doi 10.1134/S2079096111040147]
- Avise J.C. Phylogeography: the history and formation of species. Cambridge, Mass: Harvard Univ. Press, 2000. doi 10.2307/j.ctv1nzfj7
- Baker R.J., Brandley R.D. Speciation in mammals and the genetic species concept. *J Mammalogy*. 2006;87(4):643-662. doi 10.1644/06-MAMM-F-038R2.1
- Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol*. 1999;16(1):37-48. doi 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036
- Brandt I.F. Observations sur les differentes especes de sousliks de Russie, suivies de remarques sur l'arrangement et la distribution géographique du genre *Spermophilus*, anse que sur la classification de la famille des ecrevilles (Sciurina) en general. *Bulletin Scientifique l'Academie Imperiale des Sciences de Saint-Petersbourg*. 1843;2:357-381
- Ermakov O.A., Brandler O.V., Ivanov A.Yu., Ivanova A.D., Kesyana A.A., Khalidov A.Kh., Lotiev K.Yu., Lukonina S.A., Tsapko V., Titov S.V. Riverine barriers and geographic variation in little ground squirrel (*Spermophilus pygmaeus*, Sciuridae, Rodentia) based on mitochondrial cytochrome *b* gene sequences. *Russ J Theor Biol*. 2023;22(1):24-31. doi 10.15298/rusjtheriol.22.1.03
- Excoffier L., Lischer H. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resources*. 2010;10(3):564-567. doi 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
- Fu Y. New statistical test of neutrality for DNA sample from a population. *Genetics*. 1996;143(1):557-570. doi 10.1093/genetics/143.1.557
- Gitzendanner M.A., Soltis P.S. Patterns of genetic variation in rare and widespread congeners. *Am J Bot*. 2000;87(6):783-792. doi 10.2307/2656886
- Gündüz İ., Jaarola M., Tez C., Yeniurt C., Polly P.D., Searle J.B. Multigenic and morphometric differentiation of ground squirrels (*Spermophilus*, Scuridae, Rodentia) in Turkey, with a description of a new species. *Mol Phylogenet Evol*. 2007;43(3):916-935. doi 10.1016/j.ympev.2007.02.021
- Gür H., Perkaş U., Gür M.K. Do climate-driven altitudinal range shifts explain the intraspecific diversification of a narrow ranging montane mammal, Taurus ground squirrels? *Mamm Res*. 2017;63(2):197-211. doi 10.1007/s13364-017-0347-8
- Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*. 1999;41:95-98
- Harrison R.G., Bogdanowicz S.M., Hoffmann R.S., Yensen E., Sherman P.W. Phylogeny and evolutionary history of the ground squirrels (Rodentia: Marmotinae). *J Mamm Evol*. 1993;10(3):249-276. doi 10.1023/B:JOMM.0000015105.96065.f0
- Hoffmann R.S. Order Lagomorpha. In: Mammal Species of the World. Washington-London: Smithsonian Institution Press, 1993;807-827
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980;16(2):111-120. doi 10.1007/BF01731581
- Menetries E. Catalogue raisonne des objets de zoologie recueillis dans un voyage au Caucase et jusqu'aux frontieres actuelles de la perse Entrepris par ordre de S.M. Lempereur. St. Petersburg: Academie Impériale des Sciences, 1832
- Rambaut A., Drummond A.J., Xie D., Baele G., Suchard M.A. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst Biol*. 2018;67(5):901-904. doi 10.1093/sysbio/syy032
- Ray N., Currat M., Excoffier L. Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Mol Biol Evol*. 2003;20(1):76-86. doi 10.1093/molbev/msg009
- Rogers A.R., Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol*. 1992;9(3): 552-569. doi 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040727
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 2003;19(12):1572-1574. doi 10.1093/bioinformatics/btg180
- Simonov E., Lopatina N.V., Titov S.V., Ivanova A.D., Brandler O.V., Surin V.L., Matrosova V.A., Dvilis A.E., Oreshkova N.V., Kapustina S.Yu., Golenishchev F.N., Ermakov O.A. Traditional multi-taxon phylogeny fails to fully resolve Palearctic ground squirrels (*Spermophilus*) relationships but reveals a new species endemic to West Siberia. *Mol Phylogenet Evol*. 2024;195:108057. doi 10.2139/ssrn.4609201
- Steppan S.J., Akhverdyan M.R., Lyapunova E.A., Fraser D.G., Vorontsov N.N., Hoffmann R.S., Braun M.J. Molecular phylogeny of the marmots (Rodentia: Sciuridae): tests of evolutionary and biogeographic hypotheses. *Syst Biol*. 1999;48(4):715-734. doi 10.1080/106351599259988
- Suchard M.A., Lemey P., Baele G., Ayres D.L., Drummond A.J., Rambaut A. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol*. 2018;4(1):vey016. doi 10.1093/ve/vey016
- Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 1989;123(3):585-595. doi 10.1093/genetics/123.3.585
- Willi Y., Van Buskirk J., Hoffmann A.A. Limits to the adaptive potential of small populations. *Annu Rev Ecol Syst*. 2006;37(1): 433-458. doi 10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110145
- Yin Y., Jiang W., Zhang Z., Li Y., Twenke B., Turghan M., Yang W., Liu B. The divergence of small mammals in Xinjiang, China, as revealed by phylogenetic analyses of COI and *Cytb*. *Anim Biol*. 2014; 64(2):163-176. doi 10.1163/15707563-00002435

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.03.2025. После доработки 06.05.2025. Принята к публикации 12.05.2025.

doi 10.18699/vjgb-25-88

Метаболические эффекты трегалозы у мышей линии C57BL/6 с ожирением, вызванным диетой с высоким содержанием углеводов и жиров

А.Б. Пупышев , Н.М. Бажан , А.Ю. Казанцева², Т.В. Яковлева , В.М. Беличенко¹,
Н.В. Гончарова¹, Т.А. Короленко¹, М.А. Тихонова 

¹ Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия

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

 pupyshevab@neuronm.ru

Аннотация. Показано, что способность трегалозы улучшать метаболические показатели у животных с экспериментальным ожирением зависит от модели ожирения. У мышей линии db/db она снижает вес тела, уровни инсулина, глюкозы и холестерина в крови. У мышей с ожирением, вызванным потреблением высокожировой диеты, она не влияет на вес тела, но снижает уровень инсулина в крови, компенсаторно усиливая экспрессию генов инсулиновой сигнализации. Нами предпринято исследование действия трегалозы на вес и метаболические показатели у мышей линии C57BL/6 с избыточным весом, вызванным диетой с повышенным содержанием жиров и углеводов – «диетой кафетерия». Диета кафетерия включала свободный доступ на протяжении 18 недель к воде, стандартному корму, жирной пище (салу) и углеводам (сдобному печенью). Все мыши были случайно разделены на четыре группы, содержащиеся в разных условиях в течение 4 недель: 1) питье воды; 2) питье 3 % трегалозы; 3) диета кафетерия и питье воды; 4) диета кафетерия и питье 3 % трегалозы. Исследовали изменения массы тела, потребление корма, жидкости, пищевых калорий, биохимические показатели крови (уровень глюкозы, триглицеридов, холестерина, ЛПВП, АЛТ, креатинина), экспрессию генов углеводного обмена (*Slc2a2*, *Insr*) и аутофагии (*Atg8*, *Becn1*, *Park2*) в печени. Модель ожирения с помощью диеты кафетерия сопровождалась признаками метаболического синдрома, поскольку у этих мышей были повышены: масса тела (на 25 %), количество потребленных калорий (на 20 %), уровни в крови глюкозы (на 35 %), холестерина (на 66 %), триглицеридов (на 23 %). На контрольных мышей трегалоза действовала слабо, вызывая лишь снижение потребления стандартного корма и повышение потребления пищевых калорий на величину калорийности самой трегалозы. У мышей с ожирением трегалоза повышала общее число потребленных калорий и потребление печенья, но существенно не влияла на массу тела, метаболические показатели крови и экспрессию в печени генов, регулирующих транспорт глюкозы (*Slc2a2*), чувствительность к инсулину (*Insr*) и процессы аутофагии (*Atg8*, *Becn1*, *Park2*). Поскольку диета кафетерия является наиболее адекватной моделью формирования ожирения у людей, полученные нами результаты ставят под сомнение возможность использования трегалозы для коррекции моделируемого ожирения у людей.

Ключевые слова: мыши C57BL/6; углеводножировая диета; диета кафетерия; ожирение; трегалоза; аутофагия; ПЦР; глюкоза; триглицериды; холестерин

Для цитирования: Пупышев А.Б., Бажан Н.М., Казанцева А.Ю., Яковлева Т.В., Беличенко В.М., Гончарова Н.В., Короленко Т.А., Тихонова М.А. Метаболические эффекты трегалозы у мышей линии C57BL/6 с ожирением, вызванным диетой с высоким содержанием углеводов и жиров. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(6):812-818. doi 10.18699/vjgb-25-88

Финансирование. Работа поддержана средствами федерального бюджета НИИИМ по теме № 122042700001-9 и бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН № FWNR-2022-0021.

Metabolic effects of trehalose in mice of the C57BL/6 strain with obesity induced by a high carbohydrate-fat diet

А.В. Pupyshev , Н.М. Bazhan , А.Ю. Kazantseva², Т.В. Yakovleva , В.М. Belichenko¹,
N.V. Goncharova¹, Т.А. Korolenko¹, М.А. Tikhonova 

¹ Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia

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

 pupyshevab@neuronm.ru

Abstract. The ability of trehalose to improve metabolic parameters in mice with experimental obesity has been shown to depend on the type of obesity model. In db/db mice, it reduced body weight, insulin, blood glucose, and cholesterol levels. In mice with obesity induced by high-fat dietary intake, it had no effect on body weight but reduced blood insulin levels with compensatory upregulation of insulin signaling gene expression. We studied the

effect of trehalose on overweight and metabolic parameters in C57BL/6 inbred mice with obesity induced by a high carbohydrate-fat diet, the "cafeteria diet". The cafeteria diet consisted of free access to water, standard chow, fatty foods (lard), and carbohydrates (biscuits) for 18 weeks. All mice were then randomly divided into four groups for four weeks of treatment: (1) water drinking, (2) drinking 3 % trehalose, (3) cafeteria diet and drinking water, (4) cafeteria diet and drinking 3 % trehalose. Alterations in body mass, food intake, fluid intake, dietary calories, blood biochemical parameters (glucose, triglyceride, cholesterol, HDL, ALT, creatinine levels), expression of carbohydrate metabolism (*Slc2a2*, *Insr*) and autophagy (*Atg8*, *Becn1*, *Park2*) genes in the liver were studied. The cafeteria diet obesity model was accompanied by some signs of metabolic syndrome as it induced an increase in body weight (by 25 %), calorie intake (by 25 %), blood levels of glucose (by 35 %), cholesterol (by 66 %), and triglycerides (by 23 %) in mice. Trehalose had little effect on control mice, causing a decrease in standard food intake and an increase in dietary caloric intake by the number of calories from trehalose itself. In obese mice, trehalose increased total caloric intake and biscuit consumption but had no substantial effect on body weight gain, blood metabolic parameters, or expression of liver genes regulating glucose transport (*Slc2a2*), insulin sensitivity (*Insr*), and autophagy processes (*Atg8*, *Becn1*, *Park2*). Since the cafeteria diet is the most adequate model of alimentary obesity development in humans, our results question the use of trehalose to correct the dietary type of obesity in humans.

Key words: C57BL/6 mice; carbohydrate-fat diet; cafeteria diet; obesity; trehalose; autophagy; qPCR; glucose; triglycerides; cholesterol

For citation: Pupyshv A.B., Bazhan N.M., Kazantseva A.Yu., Yakovleva T.V., Belichenko V.M., Goncharova N.V., Korolenko T.A., Tikhonova M.A. Metabolic effects of trehalose in mice of the C57BL/6 strain with obesity induced by a high carbohydrate-fat diet. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(6):812-818. doi 10.18699/vjgb-25-88

Введение

Трегалоза (ТР) обладает множественными терапевтическими свойствами, главными из которых, по-видимому, являются шапероноподобное действие и активация аутофагии, особенно важная для нейропротекции (Hosseinpour-Moghaddam et al., 2018; Pupyshv et al., 2022b). Другие полезные свойства включают позитивное влияние на клеточный метаболизм, углеводный и липидный обмен (Arai et al., 2019; Yaribeygi et al., 2019; Kobayashi et al., 2021), при этом известно, что диабет, ожирение и нейродегенерация тесно связаны между собой (Pugazhenth et al., 2017). Полагают, торможение нейродегенерации трегалозой осуществляется посредством активации mTOR-независимой аутофагии (Sarkar, 2013; Tamargo-Gómez, Mariño, 2018).

Вместе с тем ТР существенным образом влияет на углеводный обмен, так как может снижать уровень глюкозы в крови и резистентность к инсулину (Zhang et al., 2018; Zhang, DeBosch, 2019; Korolenko et al., 2021). Она позитивно влияет на жировой обмен: снижает уровень триглицеридов в печени и крови (Stachowicz et al., 2019; Zhang, DeBosch, 2019; Korolenko et al., 2021) и в конечном счете препятствует развитию стеатоза, зависящему от активности аутофагии (Zhang et al., 2018; Ren et al., 2019; Su et al., 2025). Нормализующее действие на липидный обмен ТР оказывает частично посредством влияния на освобождение адипонектина, способствующего сжиганию жиров (Arai et al., 2013; Mizote et al., 2016), на снижение секреции желудочного ингибирующего полипептида GIP, способствующего ожирению (Yoshizane et al., 2017), на экспрессию липоксигеназы ALOXE3 и аргиназы 2, повышающих энергопотребление (Higgins et al., 2018; Zhang et al., 2019).

На модели ожирения, вызванного высокожировой диетой (HFD), ТР снижает гипертрофию брыжеечного и пахового жира и прирост бурого жира (Arai et al., 2019), что сопровождается повышением термогенеза как у мышей линии C57BL/6, так и у генетической модели диабетического ожирения мышей линии ob/ob (Zhang et al., 2018). При этом в последнем случае результат зависел от актив-

ности медиаторов AMPK, TFEB и белка UCP1, но не от аутофагии (Zhang et al., 2018; Rusmini et al., 2019). В целом данные по влиянию ТР на избыточный вес организма достаточно противоречивы (Arai et al., 2010, 2019; Liu et al., 2013; Sahebkar et al., 2019; Korolenko et al., 2021). У одних авторов для мышей, содержащихся на высокожировой диете, 8-недельное потребление 2 % ТР вызывало лишь тенденцию снижения массы общего висцерального жира (не более 5 %) и существенно не влияло на вес мышцей (Arai et al., 2013; Liu et al., 2013). Согласно другим данным (Korolenko et al., 2021), у мышей линии db/db (моногенная модель диабетического ожирения) трехнедельное скормливание 2 % ТР вызывало заметное снижение веса (более 10 %) и оказывало общее терапевтическое действие, в частности снижало уровни холестерина, триглицеридов и глюкозы плазмы крови.

Остается неясным, в какой мере жиропонижающий эффект ТР зависит от характера диеты или от мутаций, вызывающих ожирение. В своей работе мы принимали во внимание, что у мышей развитие алиментарных форм ожирения может быть вызвано потреблением как высокожировой пищи (HFD), так и комбинированного корма с повышенным содержанием и жиров, и углеводов (углеводножировая диета, «диета кафетерия», ДКаф), что чаще встречается в человеческой популяции.

В связи с этим нами была поставлена задача на мышах линии C57BL/6 с ожирением, обусловленным содержанием животных на углеводножировой диете (ДКаф), оценить влияние алиментарного потребления ТР на основные метаболические показатели (вес тела, потребление пищи, калорий и воды). Исследовали также биохимический и липидный спектр плазмы крови и аутофагию, оцениваемую по экспрессии генов аутофагии в печени.

Материалы и методы

Моделирование ожирения. Все манипуляции с животными, проведенные в ходе исследования, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекоменда-

ям независимой биоэтической комиссии ИЦиГ СО РАН (протокол № 76 от 07.04.2021). Эксперименты проводились на самцах мышей линии C57BL/6 конвенционального вивария Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск.

Животных в возрасте трех месяцев рассаживали по одному в клетку при световом режиме 12 ч свет : 12 ч темнота, температуре 22–24 °С и свободном доступе к воде и гранулированному корму (ЗАО «Ассортимент-Агро»). Через 2 недели животных либо оставляли на стандартном корме ($n = 22$), либо переводили на диету с высоким содержанием жиров и углеводов (ДКаф) ($n = 19$), состоящую из несоленого свиного сала, сдобного печенья и стандартного гранулированного корма для лабораторных животных в свободном доступе. В течение 18 недель ДКаф вызывает развитие ожирения у данных мышей (Makarova et al., 2013). Она наиболее приближена по составу к ежедневному рациону современного человека, кроме того, позволяет оценить потребление различных компонентов диеты.

Спустя 18 недель после содержания на ДКаф животных делили на четыре группы (рис. 1): 1) потребление стандартного корма и воды ($n = 11$); 2) потребление стандартного корма и 3 % раствора ТР (Pupyshv et al., 2024) ($n = 11$); 3) содержание на ДКаф и воде ($n = 9$); 4) содержание на ДКаф и 3 % растворе ТР ($n = 10$). В ходе всего эксперимента у мышей еженедельно оценивали массу тела, три раза в неделю – потребление пищи.

Биохимия крови. Через 4 недели потребления трегалозы животных выводили из эксперимента, брали кровь и пробы печени. Забор крови, подготовка и хранение сыворотки крови выполнялись как описано ранее (Goncharova et al., 2016). В сыворотке крови с помощью биохимического анализатора AU 680 (Beckman Coulter, США) определяли метаболические показатели АЛТ, креатинин, глюкозу, триглицериды, холестерин, липопротеины высокой плотности (ЛПВП).

Анализ экспрессии генов. Методом ПЦР в реальном времени оценивали относительный уровень экспрессии генов печени, участвующих в регуляции углеводного обмена (*Insr*, кодирующего рецептор инсулина; *Slc2a2*, кодирующего транспортер глюкозы 2-го типа GLUT2) и активности аутофагии (*Atg8*, кодирующего белок аутофагии LC3-II; *Becn1*, кодирующего белок Beclin 1; *Park2*, кодирующего белок Parkin), а также референсных генов *Hprt1*, *B2m*, *Ppia*.

Тотальную РНК выделяли из образцов печени с помощью набора ExtractRNA («Евроген», Москва, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Синтез кДНК первой нити проводили с набором реактивов MMLV RT kit («Евроген») в соответствии с протоколом производителя (<https://evrogen.ru/products/cdna/synthesis/mmlv>). Полученные образцы кДНК анализировали с помощью qPCR на термоциклере LightCycler-480 II (Roche, Швейцария) с использованием набора реагентов BioMaster HS-qPCR SYBR Blue (2×) («Биолабмикс», Новосибирск, Россия), с добавлением прямых (F) и обратных (R) праймеров (по 150 нМ каждый). Использовали праймеры для целевых генов *Atg8* (FW: 5'-AAA GAG TGG AAG ATG TCC GGC-3' и REV: 5'-ACC AGG AAC TTG GTC TTG TCC-3'), *Becn1* (FW: 5'-GAA CTC ACA GCT CCA TTA CTT A-3' и REV: 5'-ATC TTC GAG AGA CAC CAT CC-3'), *Insr* (FW: 5'-ATC CTC GAA GGT GAG AAG AC-3' и REV: 5'-TGATAC CAG AGC ATA GGA GC-3'), *Park2* (FW: 5'-GGT CCA GTT AAA CCC ACC TAC-3' и REV: 5'-TTAAGA CAT CGT CCC AGC AAG-3'), *Slc2a2* (FW: 5'-GGCTAATTCAGGACTGGTT-3' и REV: 5'-TTTCTTTGCCCTGACTTCCT-3') и генов сравнения *B2m* (FW: 5'-GTC TTT CTA TAT CCT GGC TCA-3' и REV: 5'-ATG CTT GAT CAC ATG TCT CG-3'), *Hprt1* (FW: 5'-TAC CTA ATC ATT ATG CCG AGG A-3' и REV: 5'-GGT CAG CAA AGA ACT TAT AGC C-3'), *Ppia* (FW: 5'-AAA GTT CCA AAG ACA GCA GAAA-3' и REV: 5'-GCC AGG ACC TGT ATG CTT TAG-3'). Относительную концентрацию тестируемой кДНК определяли с использованием программного обеспечения LightCycler 480 (выпуск 1.5.1) и калибровочных кривых.

Статистическая обработка. Данные анализировали в программе STATISTICA 10.0 (StatSoft, TIBCO Software Inc., Пало-Альто, Калифорния, США). Применяли дискриминантный анализ. Результаты выражали как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Для сравнения выборочных средних использовали двусторонний критерий Стьюдента (*t*-test). Статистически значимый уровень различий определяли как $p < 0.05$ (двусторонний).

Результаты

Моделирование диабетического ожирения

До начала потребления 3 % раствора ТР (18 недель содержания на ДКаф) мыши из 1-й и 2-й групп сравнения, так же как и животные с ожирением из 3-й и 4-й групп, не

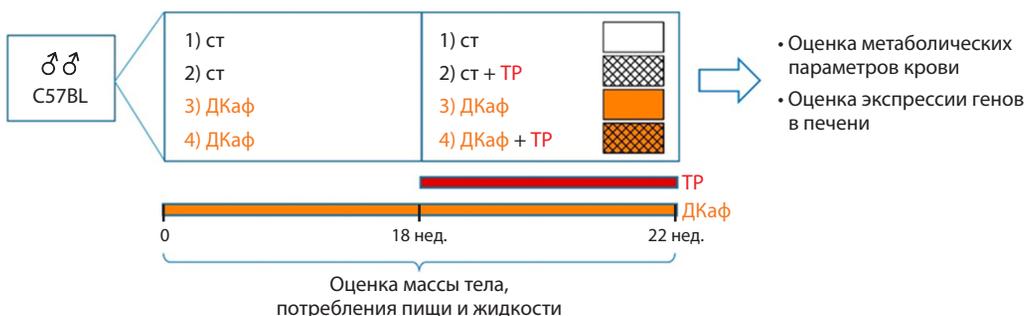


Рис. 1. Схема эксперимента.

Здесь и далее: ст (Ст) – стандартная лабораторная диета; ДКаф – диета кафетерия; ТР – трегалоза.

Масса тела, потребление воды, общее потребление энергии и компонентов диеты мышами четырех групп сравнения

Показатель	Группа 1 Ст (n = 11)	Группа 2 Ст + TP (n = 11)	Группа 3 ДКаф (n = 9)	Группа 4 ДКаф + TP (n = 10)
Масса тела, г	27.2 ± 0.4	27.3 ± 0.3	33.4 ± 1.0	33.6 ± 1.3
Калорийность питания, ккал	13.4 ± 0.4	13.3 ± 0.5	15.8 ± 0.3	15.9 ± 0.2
Стандартный корм, г	4.5 ± 0.1	4.4 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.1
Сало, г	–	–	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1
Печень, г	–	–	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1
Вода, мл	5.6 ± 0.2	5.1 ± 0.3	3.3 ± 0.1	3.4 ± 0.1

Примечание. Мыши 1-й и 2-й групп содержались на стандартной диете (Ст), мыши 3-й и 4-й групп содержались на диете кафетерия (ДКаф) в течение 18 недель до начала потребления 2-й и 4-й группами 3 % раствора трегалозы (ТР). В скобках указано число животных. Потребление компонент приведено в расчете на 1 день. Результаты выражены как М ± m.

различались по массе тела, потреблению пищи и вкусовым предпочтениям (рис. 2, см. таблицу).

У мышей, содержавшихся на ДКаф в течение 18 недель, формировалась избыточная масса тела (ожирение): масса тела возрастала на 25 % ($p < 0.001$), потребление энергии калорий – на 20 % ($p < 0.001$), а потребление воды, напротив, было снижено на 40 % по сравнению с мышами контрольной группы ($p < 0.001$) (см. рис. 2).

У животных, содержавшихся на ДКаф, показатель формирования гипергликемии – уровень глюкозы в крови – увеличился на 35 % (см. ниже). Это отличается от эффекта ДКаф в других исследованиях, где уровень глюкозы в крови возрастал более существенно (Pafafati et al., 2015), или у генетических моделей ожирения мышей ob/ob и db/db (Pelletier et al., 2020; Korolenko et al., 2021). В нашем эксперименте рост избыточного веса не сопровождался формированием высокой гипергликемии.

Влияние ТР на показатели метаболизма у мышей, содержащихся на сбалансированной диете

Потребление 3 % раствора ТР в течение 4 недель у контрольных мышей не влияло на массу тела животных (рис. 3). Такие мыши съедали меньше корма ($p < 0.05$), при этом у них наблюдали тенденцию роста потребления жидкости на 10 % (рис. 4). С учетом калорийности ТР в питье суммарное потребление килокалорий у контроль-

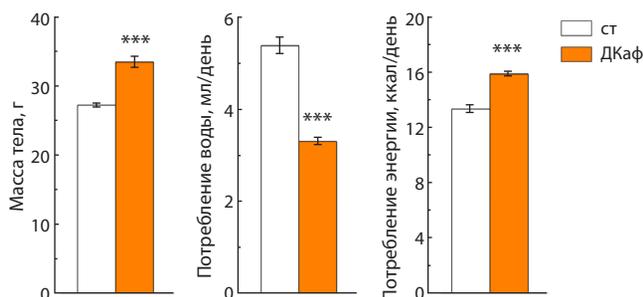


Рис. 2. Масса тела, потребление воды, общее потребление энергии мышами, содержащимися на стандартной диете (n = 22) и диете кафетерия (n = 19) в течение 18 недель до начала предоставления им 3 % раствора трегалозы.

*** $p < 0.001$ по сравнению с группой, потреблявшей стандартный корм и воду.

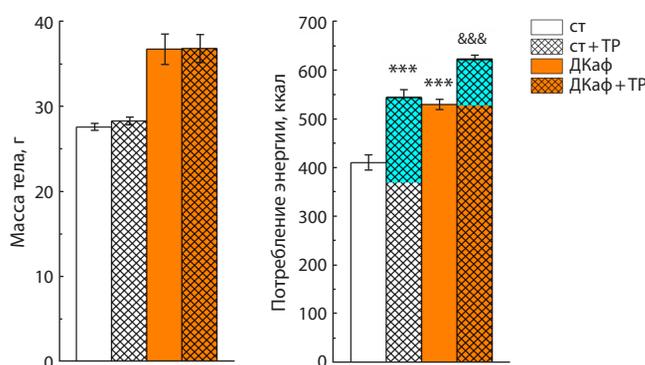


Рис. 3. Масса тела и суммарное потребление энергии у мышей, содержащихся на стандартной диете и диете кафетерия, за 4 недели, в течение которых животные потребляли воду или 3 % раствор трегалозы.

Голубым цветом показано количество килокалорий, полученных с питьем 3 % раствора трегалозы.

*** $p < 0.001$ по сравнению с группой, потреблявшей стандартный корм и воду; &&& $p < 0.001$ по сравнению с группой, потреблявшей ДКаф и воду (t-test).

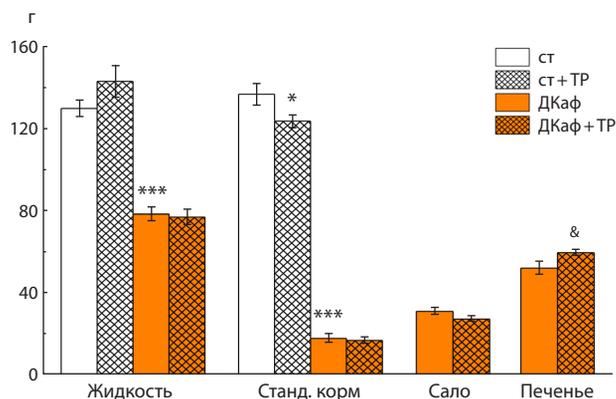


Рис. 4. Суммарное потребление жидкости и различных компонентов корма мышами, содержащимися на стандартной диете и диете кафетерия, за 4 недели, в течение которых животные потребляли воду или 3 % раствор трегалозы.

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ по сравнению с группой, потреблявшей стандартный корм и воду; & $p < 0.05$ по сравнению с группой, потреблявшей ДКаф и воду (t-test).

ных мышей, пьющих 3 % раствор ТР, было более чем на 30 % выше, чем у контрольных животных, содержавшихся на воде ($p < 0.001$) (см. рис. 3).

Влияние ТР на показатели метаболизма у мышей, содержавшихся на диете кафетерия

Вопреки нашим ожиданиям, масса тела мышей, содержавшихся на ДКаф, под действием ТР не изменялась (см. рис. 3). На потребление мышами стандартного корма, жидкости или сала ТР также оказывала слабый эффект, но повышала потребление углеводной компоненты, сложного печенья (см. рис. 4). На фоне неизменной массы тела у таких животных ТР достоверно, на 18 %, увеличивала количество потребляемых калорий (с учетом калорийности самой ТР) (см. рис. 3).

В отношении метаболических показателей крови ТР не вызывала существенных изменений у мышей, содержавшихся на ДКаф, и контрольной группы мышей, кроме заметной тенденции ($p < 0.07$) роста уровня глюкозы в крови (рис. 5). Само содержание мышей на ДКаф в определенной мере влияло на общий метаболизм, повышая уровень глюкозы ($p < 0.01$), триглицеридов ($p < 0.05$) и особенно холестерина крови ($p < 0.001$), т. е. регистрировалось изменение углеводного и липидного обмена.

Влияние ТР на транскрипцию генов углеводного обмена и аутофагии у мышей, содержавшихся на диете кафетерия

Ни содержание мышей на ДКаф, ни потребление ТР не влияло на экспрессию в печени генов, регулирующих захват глюкозы из крови (*Slc2a2*, *Insr*) или связанных с активностью аутофагии (*Atg8*, *Becn1*, *Park2*) (рис. 6).

Обсуждение

Содержание мышей на ДКаф в течение 18 недель сопровождалось ростом потребления калорий (на 20 %) и, как следствие, формированием избыточной массы тела (на 25 %), позволявшим исследовать нормализующий эффект ТР, выявленный в более ранних работах на мышах db/db (Korolenko et al., 2021). Трегалоза, являясь энергетическим субстратом (Sato et al., 1999), повышала потребление энергии калорий как у контрольных мышей, так и у мышей, получавших ДКаф. Важно, что в обеих группах рост потребления калорий, связанный в основном с приемом ТР, не приводил к увеличению массы тела (см. рис. 3). То есть применение ТР стимулирует расходование энергии калорий без влияния на массу тела. В определенной мере это соответствует данным литературы, которые показывают способность ТР при продолжительном приеме стимулировать расходование калорий в процессах термогенеза и сжигания бурого жира у мышей линии C57BL/6 как на стандартной, так и на высокожировой диете (Arai et al., 2013, 2019) и у мышей ob/ob с диабетическим ожирением (Zhang et al., 2018).

Другой вариант реагирования состоит в том, что алиментарно принимаемая ТР способна вызывать в основном клеточное голодание, сопровождающееся активацией цитопротективной аутофагии (DeBosch et al., 2016; Mayer et al., 2016; Zhang, DeBosch, 2019). Механизм связывают с ингибированием трансмембранного транспортера глюкозы GLUT8, вызывавшим в клетках печени энергетическую недостаточность, ведущую к активации аденозин-монофосфат-зависимой киназы АМПК и ее плеiotропному метаболическому эффекту, включающему торможение биосинтеза, энергопотребления и активацию аутофагии.

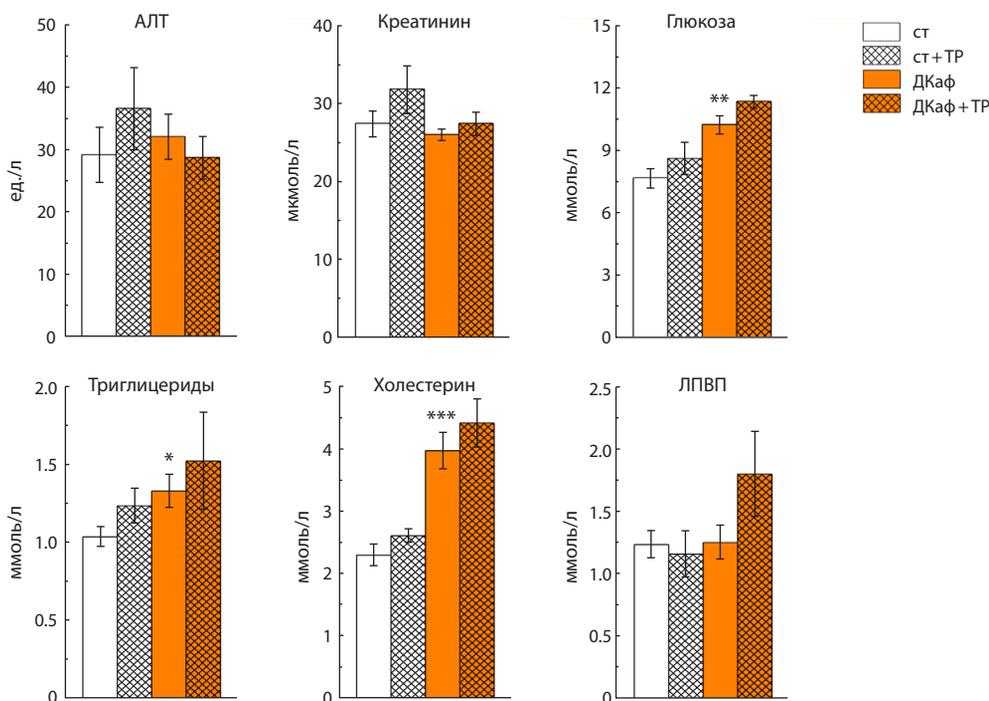


Рис. 5. Биохимические параметры крови у мышей, содержащихся на стандартной диете и диете кафетерия и получавших в течение 4 недель воду или 3 % раствор трегалозы.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с группой, потреблявшей стандартный корм и воду.

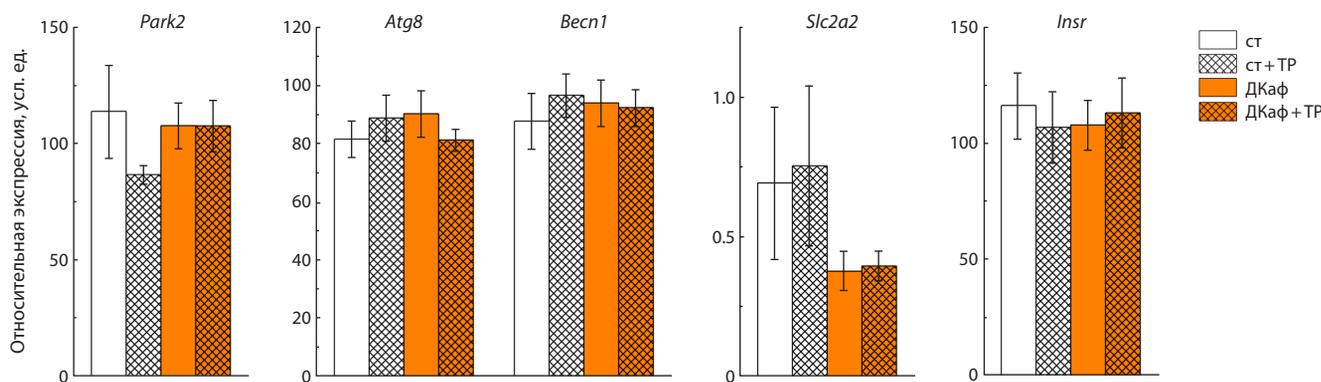


Рис. 6. Уровень мРНК генов аутофагии (*Park2*, *Atg8*, *Becn1*) и углеводного обмена (*Slc2a2*, *Insr*) в печени у мышей, содержащихся на стандартной диете и диете кафетерия и получавших в течение 4 недель воду или 3 % раствор трегалозы.

По-видимому, в наших условиях ТР теряет свою способность моделировать эффект голодания (Zhang, DeBosch, 2019), приводящий к активации аутофагии. Ослабление регуляторных свойств ТР здесь согласуется с отсутствием ее влияния на транскрипцию генов аутофагии, реагирующих на ТР повышением в других наших исследованиях (Pupyshev et al., 2022a). Причина ослабления регуляторных свойств ТР у мышей линии C57BL/6 пока остается неясной. Скорее всего, подобное переключение эффекта ТР не зависит от диеты, поскольку результат действия ТР был практически одинаковым как у контрольных, так и у мышей, содержащихся на ДКаф. Возможно, в данном случае (3 % трегалоза, 28 сут) происходит какое-то ускользание трегалозы от количественного энергетического расщепления, описанного ранее (Sato et al., 1999), и тогда противоречие между ростом потребляемых калорий и отсутствием привеса сглаживается.

Потеря регуляторных свойств ТР у мышей в настоящем исследовании не согласуется с эффектами ТР, выявленными на мышках db/db с диабетическим ожирением (Korolenko et al., 2021). На этих мышках трегалоза действовала снижением более чем на 10 % массы тела, уровня глюкозы крови и общим восстановительным эффектом по снижению уровня холестерина и триглицеридов крови. Однако в исследовании на кроликах (Sahebkar et al., 2019), как и в нашем эксперименте, также выявлено слабое влияние ТР на спектр липидов крови.

При наличии сходства нашей модели ожирения у мышей на ДКаф с типичным формированием ожирения у человека полученные результаты ставят под сомнение возможность использования трегалозы для коррекции этого самого популярного вида ожирения у людей. В то же время наши результаты не отвергают возможность лечения трегалозой пациентов с выраженным ожирением, поскольку подобное лечение было удачным для мышей с примерно 50 % избыточной массой тела (Korolenko et al., 2021).

Заключение

Основываясь на известном эффекте ТР по имитации голодания (индукции аутофагии) и снижения избыточной массы тела у мышей db/db, проведено исследование ее действия на мышью C57BL/6, содержащихся на углеводно-жировой диете (ДКаф), свойственной для формирова-

ния ожирения у человека. У контрольной группы и мышей с 25 % ожирением нашли, что под действием ТР (3 % раствор в питье, 28 сут) существенно возросло количество потребленных калорий, но этот рост энергопотребления не сопровождался увеличением массы тела мышей. Рост потребления калорий, по-видимому, расходовался на повышение процессов термогенеза и сжигание бурого жира (Arai et al., 2013, 2019). Трегалоза вызывала лишь тенденцию увеличения значений метаболических показателей крови (уровней глюкозы, холестерина, триглицеридов, ЛПВП) и слабо влияла на экспрессию генов, регулирующих углеводный обмен (*Slc2a2*, *Insr*), и генов аутофагии (*Atg8*, *Becn1*, *Park2*). В настоящем исследовании ТР не проявила способности к ослаблению диабета и ожирения, вызванных диетой кафетерия, у мышей, содержащихся на ДКаф, и не показала полезных свойств для возможной коррекции распространенного диетогенного ожирения у человека.

Список литературы / References

- Arai C., Arai N., Mizote A., Kohno K., Iwaki K., Hanaya T., Arai S., Ushio S., Fukuda S. Trehalose prevents adipocyte hypertrophy and mitigates insulin resistance. *Nutr Res.* 2010;30(12):840-848. doi 10.1016/j.nutres.2010.10.009
- Arai C., Miyake M., Matsumoto Y., Mizote A., Yoshizane C., Hanaya Y., Koide K., Yamada M., Hanaya T., Arai S., Fukuda S. Trehalose prevents adipocyte hypertrophy and mitigates insulin resistance in mice with established obesity. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2013;59(5):393-401. doi 10.3177/jnsv.59.393
- Arai C., Arai N., Arai S., Yoshizane C., Miyata S., Mizote A., Suyama A., Endo S., Ariyasu T., Mitsuzumi H., Ushio S. Continuous intake of trehalose induces white adipose tissue browning and enhances energy metabolism. *Nutr Metab.* 2019;16:45. doi 10.1186/s12986-019-0373-4
- DeBosch B.J., Heitmeier M.R., Mayer A.L., Higgins C.B., Crowley J.R., Kraft T.E., Chi M., Newberry E.P., Chen Z., Finck B.N., Davidson N.O., Yarasheski K.E., Hruz P.W., Moley K.H. Trehalose inhibits solute carrier 2A (SLC2A) proteins to induce autophagy and prevent hepatic steatosis. *Sci Signal.* 2016;9(416):ra21. doi 10.1126/scisignal.aac5472
- Goncharova N.V., Pupyshev A.B., Filyushina E.E., Loktev K.V., Korolenko E.Ts., Lushnikova E.L., Molodykh O.P., Korolenko T.A., Churin B.V. Depression of macrophages modifies serum lipid profile in hyperlipidemia. *Bull Exp Biol Med.* 2016;160(5):617-621. doi 10.1007/s10517-016-3231-7

- Higgins C.B., Zhang Y., Mayer A.L., Fujiwara H., Stothard A.I., Graham M.J., Swarts B.M., DeBosch B.J. Hepatocyte ALOXE3 is induced during adaptive fasting and enhances insulin sensitivity by activating hepatic PPAR γ . *JCI Insight*. 2018;3(16):e120794. doi 10.1172/jci.insight.120794
- Hosseinpour-Moghaddam K., Caraglia M., Sahebkar A. Autophagy induction by trehalose: molecular mechanisms and therapeutic impacts. *J Cell Physiol*. 2018;233(9):6524-6543. doi 10.1002/jcp.26583
- Kobayashi M., Yasukawa H., Arikawa T., Deguchi Y., Mizushima N., Sakurai M., Onishi S., Tagawa R., Sudo Y., Okita N., Higashi K., Higami Y. Trehalose induces SQSTM1/p62 expression and enhances lysosomal activity and antioxidative capacity in adipocytes. *FEBS Open Bio*. 2021;11(1):185-194. doi 10.1002/2211-5463.13055
- Korolenko T.A., Dubrovina N.I., Ovsyukova M.V., Bgatova N.P., Tenditnik M.V., Pupyshev A.B., Akopyan A.A., Goncharova N.V., Lin C.L., Zavjalov E.L., Tikhonova M.A., Amstislavskaya T.G. Treatment with autophagy inducer trehalose alleviates memory and behavioral impairments and neuroinflammatory brain processes in db/db mice. *Cells*. 2021;10(10):2557. doi 10.3390/cells10102557
- Liu M., Zhang M., Ye H., Lin S., Yang Y., Wang L., Jones G., Trang H. Multiple toxicity studies of trehalose in mice by intragastric administration. *Food Chem*. 2013;136(2):485-490. doi 10.1016/j.foodchem.2012.09.031
- Makarova E.N., Chepeleva E.V., Panchenko P.E., Bazhan N.M. Influence of abnormally high leptin levels during pregnancy on metabolic phenotypes in progeny mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013;305(11):R1268-R1280. doi 10.1152/ajpregu.00162.2013
- Mayer A.L., Higgins C.B., Heitmeier M.R., Kraft T.E., Qian X., Crowley J.R., Hyrc K.L., Beatty W.L., Yarasheski K.E., Hruz P.W., DeBosch B.J. SLC2A8 (GLUT8) is a mammalian trehalose transporter required for trehalose-induced autophagy. *Sci Rep*. 2016;6:38586. doi 10.1038/srep38586
- Mizote A., Yamada M., Yoshizane C., Arai N., Maruta K., Arai S., Endo S., Ogawa R., Mitsuzumi H., Ariyasu T., Fukuda S. Daily intake of trehalose is effective in the prevention of lifestyle-related diseases in individuals with risk factors for metabolic syndrome. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2016;62(6):380-387. doi 10.3177/jnsv.62.380
- Parafati M., Lascala A., Morittu V.M., Trimboli F., Rizzuto A., Brunelli E., Coscarelli F., Costa N., Britti D., Ehrlich J., Isidoro C., Mollace V., Janda E. Bergamot polyphenol fraction prevents nonalcoholic fatty liver disease via stimulation of lipophagy in cafeteria diet-induced rat model of metabolic syndrome. *J Nutr Biochem*. 2015;26(9):938-948. doi 10.1016/j.jnutbio.2015.03.008
- Pelletier R.M., Layeghkhavidaki H., Vitale M.L. Glucose, insulin, insulin receptor subunits α and β in normal and spontaneously diabetic and obese ob/ob and db/db infertile mouse testis and hypophysis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2020;18(1):25. doi 10.1186/s12958-020-00583-2
- Pugazhenthil S., Qin L., Reddy P.H. Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017;1863(5):1037-1045. doi 10.1016/j.bbadis.2016.04.017
- Pupyshev A.B., Belichenko V.M., Tenditnik M.V., Bashirzade A.A., Dubrovina N.I., Ovsyukova M.V., Akopyan A.A., Fedoseeva L.A., Korolenko T.A., Amstislavskaya T.G., Tikhonova M.A. Combined induction of mTOR-dependent and mTOR-independent pathways of autophagy activation as an experimental therapy for Alzheimer's disease-like pathology in a mouse model. *Pharmacol Biochem Behav*. 2022a;217:173406. doi 10.1016/j.pbb.2022.173406
- Pupyshev A.B., Klyushnik T.P., Akopyan A.A., Singh S.K., Tikhonova M.A. Disaccharide trehalose in experimental therapies for neurodegenerative disorders: molecular targets and translational potential. *Pharmacol Res*. 2022b;183:106373. doi 10.1016/j.phrs.2022.106373
- Pupyshev A.B., Akopyan A.A., Tenditnik M.V., Ovsyukova M.V., Dubrovina N.I., Belichenko V.M., Korolenko T.A., Zozulya S.A., Klyushnik T.P., Tikhonova M.A. Alimentary treatment with trehalose in a pharmacological model of Alzheimer's disease in mice: effects of different dosages and treatment regimens. *Pharmaceutics*. 2024;16(6):813. doi 10.3390/pharmaceutics16060813
- Ren H., Wang D., Zhang L., Kang X., Li Y., Zhou X., Yuan G. Catalpol induces autophagy and attenuates liver steatosis in ob/ob and high-fat diet-induced obese mice. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(21):9461-9477. doi 10.18632/aging.102396
- Rusmini P., Cortese K., Crippa V., Cristofani R., Cicardi M.E., Ferrari V., Vezzoli G., ... Galbiati M., Garrè M., Morelli E., Vaccari T., Poletti A. Trehalose induces autophagy via lysosomal-mediated TFEB activation in models of motoneuron degeneration. *Autophagy*. 2019;15(4):631-651. doi 10.1080/15548627.2018.1535292
- Sahebkar A., Hatamipour M., Tabatabaei S.A. Trehalose administration attenuates atherosclerosis in rabbits fed a high-fat diet. *J Cell Biochem*. 2019;120(6):9455-9459. doi 10.1002/jcb.28221
- Sarkar S. Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers. *Biochem Soc Trans*. 2013;41(5):1103-1130. doi 10.1042/BST20130134
- Sato S., Okamoto K., Minami R., Kohri H., Yamamoto S. Trehalose can be used as a parenteral saccharide source in rabbits. *J Nutrition*. 1999;129(1):158-164. doi 10.1093/jn/129.1.158
- Stachowicz A., Wiśniewska A., Kuś K., Kiepusa A., Gębska A., Gajda M., Białas M., Tottoń-Żurańska J., Stachyra K., Suski M., Jawień J., Korbut R., Olszanecki R. The influence of trehalose on atherosclerosis and hepatic steatosis in apolipoprotein E knockout mice. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7):1552. doi 10.3390/ijms20071552
- Su S., Liu X., Zhu M., Liu W., Liu J., Yuan Y., Fu F., Rao Z., Liu J., Lu Y., Chen Y. Trehalose ameliorates nonalcoholic fatty liver disease by regulating IRE1 α -TFEB signaling pathway. *J Agric Food Chem*. 2025;73(1):521-540. doi 10.1021/acs.jafc.4c08669
- Tamargo-Gómez I., Mariño G. AMPK: regulation of metabolic dynamics in the context of autophagy. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12):3812. doi 10.3390/ijms19123812
- Yaribeygi H., Yaribeygi A., Sathyapalan T., Sahebkar A. Molecular mechanisms of trehalose in modulating glucose homeostasis in diabetes. *Diabetes Metab Syndr*. 2019;13(3):2214-2218. doi 10.1016/j.dsx.2019.05.023
- Yoshizane C., Mizote A., Yamada M., Arai N., Arai S., Maruta K., Mitsuzumi H., Ariyasu T., Ushio S., Fukuda S. Glycemic, insulinemic and incretin responses after oral trehalose ingestion in healthy subjects. *Nutr J*. 2017;16(1):9. doi 10.1186/s12937-017-0233-x
- Zhang Y., DeBosch B.J. Using trehalose to prevent and treat metabolic function: effectiveness and mechanisms. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2019;22(4):303-310. doi 10.1097/MCO.0000000000000568
- Zhang Y., Sowers J.R., Ren J. Targeting autophagy in obesity: from pathophysiology to management. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(6):356-376. doi 10.1038/s41574-018-0009-1
- Zhang Y., Higgins C.B., Fortune H.M., Chen P., Stothard A.I., Mayer A.L., Swarts B.M., DeBosch B.J. Hepatic arginase 2 (Arg2) is sufficient to convey the therapeutic metabolic effects of fasting. *Nat Commun*. 2019;10(1):1587. doi 10.1038/s41467-019-09642-8

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.04.2025. После доработки 20.06.2025. Принята к публикации 25.06.2025.

doi 10.18699/vjgb-25-89

Ассоциация варианта rs823144 гена *RAB29* с активностью лизосомных гидролаз в клетках крови и риском болезни Паркинсона

К.С. Башарова ^{1,2} , А.И. Безрукова ^{1,2}, К.А. Сенкевич ³, Г.В. Байдакова ⁴, А.В. Рыбаков⁵, И.В. Милюхина ^{1,5}, А.А. Тимофеева ^{1,2}, Е.Ю. Захарова^{1,4}, С.Н. Пчелина ^{1,2}, Т.С. Усенко ^{1,2} 

¹ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

³ Монреальский неврологический институт при Университете Макгилла, Монреаль, Канада

⁴ Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова, Москва, Россия

⁵ Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

 kbasharova@yandex.ru; basharova_ks@pnpi.nrcki.ru; usenko_ts@pnpi.nrcki.ru

Аннотация. Геномные исследования последних лет выявили ассоциацию гена *RAB29* с болезнью Паркинсона (БП). Белок Rab29, кодируемый геном *RAB29*, – один из регуляторов богатой лейциновыми повторами киназы 2 (LRRK2). Мутации в гене *LRRK2* ассоциированы с увеличением киназной активности LRRK2 и приводят к развитию аутосомно-доминантных форм БП. Недавно показано, что изменение киназной активности LRRK2 может быть связано с изменением активности лизосомных гидролаз и концентрации лизосфинголипидов. Цель данного исследования заключалась в оценке ассоциации rs823144 в промоторе гена *RAB29* с БП с экспрессией гена *RAB29*, активностью лизосомных гидролаз и концентрацией лизосфинголипидов в крови при БП. В ходе исследования проведены скрининг варианта rs823144 гена *RAB29* в группе пациентов с БП ($N = 903$) и в контроле ($N = 618$) с использованием методов массового параллельного секвенирования и полимеразная цепная реакция (ПЦР) с последующим рестрикционным анализом. Экспрессия гена *RAB29* оценивалась в мононуклеарах периферической крови методом ПЦР в режиме реального времени. Активности лизосомных гидролаз (глюкоцереброзидаза (GCase), альфа-галактозидаза (GLA), кислая сфингомиелиназа (ASMase), галактозилцереброзидаза (GALC)) и концентрации лизосфинголипидов (глоботриаозилсфингозин (LysoGb3), сфингомиелин (LysoSM), гексозилсфингозин (HexSph)) оценивались в крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). Аллель С rs823144 гена *RAB29* ассоциирован с пониженным риском БП в северо-западной популяции Российской Федерации (ОШ: 0.7806, 95 % ДИ: 0.6578–0.9263, $p = 0.0046$), что соответствует мировым данным. Однако в ходе работы не выявлено ассоциации аллеля С rs823144 гена *RAB29* с уровнем мРНК гена *RAB29* в мононуклеарах периферической крови. В то же время носительство аллеля С rs823144 было ассоциировано с повышенной активностью GLA и сниженной концентрацией LysoGb3 в крови при БП. Таким образом, нами впервые показана ассоциация аллеля С rs823144 гена *RAB29* с пониженным риском БП в северо-западной популяции Российской Федерации. Аллель С rs823144 ассоциирован с повышенной активностью GLA и сниженной концентрацией LysoGb3 в крови при БП. Полученные результаты позволяют предположить ассоциацию гена *RAB29* с метаболизмом сфинголипидов.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона; *RAB29*; лизосомные гидролазы; лизосфинголипиды; LRRK2

Для цитирования: Башарова К.С., Безрукова А.И., Сенкевич К.А., Байдакова Г.В., Рыбаков А.В., Милюхина И.В., Тимофеева А.А., Захарова Е.Ю., Пчелина С.Н., Усенко Т.С. Ассоциация варианта rs823144 гена *RAB29* с активностью лизосомных гидролаз в клетках крови и риском болезни Паркинсона. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(6):819-827. doi 10.18699/vjgb-25-89

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 1023031500037-7-1.6.8;1.6.1;1.6.2;1.6.3 Изучение молекулярных и клеточных компонентов патогенеза социально значимых заболеваний для разработки методов ранней диагностики и лечения) и государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (тема № 123030200067-6 Разработка генетических панелей для диагностики синуклеинопатий по результатам геномных исследований).

Благодарности. Мы выражаем глубокую благодарность всем пациентам, принявшим участие в данном исследовании.

Association of the rs823144 variant of the *RAB29* gene with the activity of lysosomal hydrolases in blood cells and risk of Parkinson's disease

K.S. Basharova ^{1,2} , A.I. Bezrukova ^{1,2}, K.A. Senkevich ³, G.V. Baydakova ⁴, A.V. Rybakov⁵,
I.V. Miliukhina ^{1,5}, A.A. Timofeeva ², E.Yu. Zakharova^{1,4}, S.N. Pchelina ^{1,2}, T.S. Usenko ^{1,2} 

¹ Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre "Kurchatov Institute", Gatchina, Russia

² Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

³ Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Canada

⁴ Bochkov Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

⁵ N.P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

 kbasharova@yandex.ru; basharova_ks@pnpi.nrcki.ru; usenko_ts@pnpi.nrcki.ru

Abstract. Recent genome-wide association studies have identified a link between the *RAB29* gene and Parkinson's disease (PD). The Rab29 protein encoded by *RAB29* regulates leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2). Mutations in the *LRRK2* gene increase its kinase activity and contribute to autosomal dominant forms of PD. Previous research has shown that altered LRRK2 kinase activity may correlate with the activity of lysosomal hydrolases and the concentration of sphingolipids. This study aimed to assess the association of the rs823144 variant in the promoter region of the *RAB29* gene with PD risk, and to evaluate *RAB29* expression, lysosomal hydrolase activity, and sphingolipid concentrations in the blood of PD patients. We screened the rs823144 variant of the *RAB29* gene in a cohort of PD patients ($N = 903$) and controls ($N = 618$) using next-generation sequencing (NGS) and polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction fragment length polymorphism analysis. The expression of the *RAB29* gene was measured in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using qPCR. We assessed the activities of lysosomal hydrolases (glucocerebrosidase (GCase), alpha-galactosidase (GLA), acid sphingomyelinase (ASMase), and galactosylcerebrosidase (GALC)) and the concentrations of sphingolipids (globotriaosylsphingosine (LysoGb3), sphingomyelin (LysoSM), and hexosylsphingosine (HexSph)) in blood using high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). The *RAB29* rs823144 C allele was associated with a reduced risk of PD in the Northwestern Russian population (OR = 0.7806, 95 % CI: 0.6578–0.9263, $p = 0.0046$), which is consistent with global data. However, no significant association was observed between the rs823144 C allele and *RAB29* mRNA expression in PBMCs. Notably, the C allele was associated with increased GLA activity and decreased concentrations of LysoGb3 and LysoSM in the blood of PD patients. In conclusion, we demonstrate for the first time an association between the *RAB29* rs823144 C allele and a reduced risk of PD in the Northwestern Russian population. Moreover, the *RAB29* rs823144 C allele is associated with altered lysosomal enzyme activity and sphingolipid profiles, suggesting a potential role of *RAB29* in sphingolipid metabolism relevant to PD pathogenesis.

Key words: Parkinson's disease; *RAB29*; lysosomal hydrolases; lysosphingolipids; LRRK2

For citation: Basharova K.S., Bezrukova A.I., Senkevich K.A., Baydakova G.V., Rybakov A.V., Miliukhina I.V., Timofeeva A.A., Zakharova E.Yu., Pchelina S.N., Usenko T.S. Association of the rs823144 variant of the *RAB29* gene with the activity of lysosomal hydrolases in blood cells and risk of Parkinson's disease. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(6):819-827. doi 10.18699/vjgb-25-89

Введение

Болезнь Паркинсона (БП) – распространенное медленно прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции (ЧС) головного мозга (Lill, 2016). В основе патогенеза БП лежат накопление и агрегация белка альфа-синуклеина в ЧС головного мозга. В основном заболевание носит спорадический характер, однако около 15 % пациентов с БП имеют отягощенный семейный анамнез. Молекулярные механизмы БП неизвестны. Однако все больше данных свидетельствует о дисфункции лизосом как о ключевом звене патогенеза БП (Nechushtai et al., 2023). В частности, нами и другими исследователями показаны нарушение активности лизосомных гидролаз и изменение уровня сфинголипидов в периферических жидкостях пациентов с идиопатической формой БП (Alcalay et al., 2015; Galper et al., 2022; Usenko et al., 2022). А также обнаружено изменение активности лизосомных гидролаз и уровня сфинголипидов при БП, ассоциированной с

мутациями в гене *LRRK2*, которая является одной из наиболее распространенных форм БП с известной этиологией (Alcalay et al., 2015; Usenko et al., 2023, 2024).

Ген *LRRK2* кодирует обогащенную лейциновыми повторами киназу 2 (LRRK2) (Zimprich et al., 2004). Основные субстраты LRRK2 – малые ГТФазы семейства Rab (Steger et al., 2016), участвующие в регуляции везикулярного, в частности эндолизосомного, транспорта (Wang et al., 2014). Изменение киназной активности LRRK2 приводит к нарушению эндолизосомного транспорта гидролаз к сайту их действия в лизосомы (MacLeod et al., 2013; Ysselstein et al., 2019; Rivero-Ríos et al., 2020; Kedariti et al., 2022).

Среди субстратов LRRK2 особый интерес представляет белок Rab29, кодируемый геном *RAB29* (Steger et al., 2016). Одна из функций Rab29 заключается в активации киназы LRRK2 (Liu et al., 2018; Madero-Pérez et al., 2018; Purlyte et al., 2018; Kuwahara, Iwatsubo, 2020). Белок Rab29 связывается с мембранами лизосом и аппарата Гольджи, где рекрутирует неактивные цитоплазматические мономеры

LRRK2, инициируя их олигомеризацию, в ходе которой образуются активные димеры или тетрамеры LRRK2 (Purlyte et al., 2018; Zhu et al., 2023). Ген *RAB29* расположен в локусе PARK16, который ранее был ассоциирован с риском БП (Satake et al., 2009; Pihlström et al., 2015; Nalls et al., 2019). В 2024 г. с помощью мультипризнакового анализа полногеномных ассоциаций была подтверждена ранее обнаруженная ассоциация гена *RAB29* с БП как на транскриптомном, так и на протеомном уровнях (Shi et al., 2024).

В ряде исследований выявлена ассоциация вариантов, расположенных в промоторной области гена *RAB29*, со сниженным риском БП. Предполагается, что такие варианты могут влиять на уровень экспрессии гена *RAB29* (Gan-Or et al., 2012; Khaligh et al., 2017; Sun et al., 2021) и, возможно, приводить к изменению степени активации LRRK2, что, в свою очередь, может быть связано с нарушением активности лизосомных гидролаз при болезни Паркинсона.

Цель исследования заключалась в оценке ассоциации rs823144 в промоторе гена *RAB29* с риском БП, уровнем экспрессии гена *RAB29*, активностью лизосомных гидролаз (глюкоцереброзидазы (GCCase), α -галактозидазы (GLA), галактоцереброзидазы (GALC) и сфингомиелиназы (ASMase)) и концентрацией лизосфинголипидов (гексазилсфингозина, HexSph (смесь гликозилсфингозина (GlcSph) и галактозилсфингозина (GalSph), лизо-сфингомиелина (LysoSM), лизоглоботриаозилсфингозина (LysoGb3)) в крови пациентов с БП и контроля.

Материалы и методы

Характеристики исследуемых групп. В исследование вошли 903 пациента со спорадической БП и 618 индивидуумов контрольной группы, сопоставимые по полу и возрасту. Все пациенты были набраны на базе клиники ФГБУН «Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой» Российской академии наук. Контрольная группа составлена из индивидуумов, наблюдавшихся в консультативно-диагностическом центре Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова. С целью исключения диагноза БП и других нейродегенеративных заболеваний все индивидуумы контрольной группы были обследованы неврологом. Клинические и демографические характеристики исследуемых групп приведены в табл. 1. Участники в исследуемых группах не отличались по полу и возрасту ($p > 0.05$).

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изме-

нениям или сопоставимым нормам этики. От каждого включенного в исследование участника получено информированное добровольное согласие. Исследование одобрено этическим комитетом Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова (протокол № 275 от 04.09.2023).

Генетический анализ. Для скрининга варианта rs823144 гена *RAB29* применено два метода: массовое параллельное секвенирование (NGS) и полимеразная цепная реакция (ПЦР) с последующим рестрикционным анализом. От всех индивидуумов, включенных в исследование, получены образцы периферической крови и выделена геномная ДНК методом фенольно-хлороформной экстракции, как описано ранее (Маниатис и др., 1984).

В исследование по скринингу варианта rs823144 гена *RAB29* методом NGS, с молекулярными инверсионными зондами, как описано ранее (Rudakou et al., 2021), были включены 521 пациент с БП и 420 индивидуумов контрольной группы. Секвенирование проводили на платформе Illumina NovaSeq 6000 SP PE100. Прочтения выравнивали на референсный геном hg19 с помощью алгоритма Burrows–Wheeler Aligner (Li, Durbin, 2009). Для идентификации генетических вариантов (variant calling) и поствыравнивающего контроля качества применяли Genome Analysis Toolkit (GATK, v3.8). (McKenna et al., 2010). После вызова вариантов использовали фильтры по глубине покрытия и качеству. В анализ включали только варианты с глубиной покрытия более 30 прочтений и оценкой качества выше 20.

В дополнение к NGS-анализу скрининг варианта rs823144 проводили методом ПЦР с последующим рестрикционным анализом. В исследование вошли 473 пациента с БП и 384 индивидуума контрольной группы. Последовательности праймеров были подобраны с помощью программы Primer3 v0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (FOR: 5'-CCCTGCACGTGACGCTTG-3', REV: 5'-GAATCCCAGTCAGCTCCTTACA-3'). Для последующего рестрикционного анализа с использованием программы NEBCutter (Vincze et al., 2003) была подобрана эндонуклеаза рестрикции BstAC I (рис. 1).

Девяносто один пациент с БП и 186 индивидуумов контрольной группы были проскринированы на носительство варианта rs823144 гена *RAB29* с применением как ПЦР с последующим рестрикционным анализом, так и NGS-секвенирования, что было учтено в ходе дальнейшего анализа.

Результаты скрининга двумя методами подтверждены с помощью секвенирования по Сэнгеру на генетическом анализаторе Нанофор-05 («Синтол», Россия). Визуализация результатов секвенирования по Сэнгеру осуществля-

Таблица 1. Клинические и демографические характеристики исследуемых групп

Группа	Пол (мужчины:женщины)	Возраст, годы	Возраст начала заболевания, годы	Длительность заболевания, годы
БП (N = 903)	378:525	65 (25–90)	59 (20–88)	3 (1–36)
Контроль (N = 618)	228:390	64 (40–96)	–	–

Примечание. БП – болезнь Паркинсона; данные представлены как медиана (мин–макс).

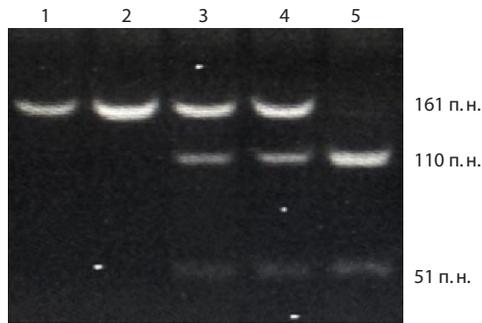


Рис. 1. Электрофореграмма, отображающая результаты генотипирования варианта rs823144 в гене *RAB29*.

1, 2 – гомозигота по аллелю А (генотип АА); 3, 4 – гетерозигота (генотип АС); 5 – гомозигота по аллелю С (генотип СС).

лась с помощью программного обеспечения Trasy (Rausch et al., 2020) (рис. 2).

Оценка относительного уровня экспрессии гена *RAB29* в мононуклеарах периферической крови пациентов с БП и контроля. Из образцов свежей венозной периферической крови пациентов с БП ($N = 30$) и контроля ($N = 43$) получена мононуклеарная фракция методом центрифугирования в градиенте плотности раствора Фиколл (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare) при 400g в течение 40 мин по методике, описанной ранее (Вёрум, 1968), и дважды промыта PBS («Биолот», Санкт-Петербург) с последующим центрифугированием при 3000 об./мин в течение 10 мин. Тотальная РНК была выделена из мононуклеаров периферической крови с помощью набора для выделения РНК RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74104, США). кДНК была получена методом обратной транскрипции с использованием набора Revert Aid First cDNA Synthesis kit (K1622, Thermo Scientific, Литва).

Относительный уровень экспрессии гена *RAB29* в мононуклеарной фракции клеток периферической крови пациентов с БП ($N = 30$) и группы контроля ($N = 43$) оценивали методом ПЦР в режиме реального времени с применением интеркалирующего красителя SYBR Green I.

В качестве референсных генов использованы конститутивно экспрессирующиеся в клетках гены *RPLP0* и *GAPDH*. Последовательности праймеров разработаны с помощью программы “Primer3 v. 0.4.0” (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>) (FOR: 5'-CGGTTTCACAGGTTGGA CAG-3', REV: 5'-CCCTTGGGTGGACAAAGACA-3'). Относительный уровень мРНК для каждого гена рассчитывали методом сравнения пороговых уровней амплификации $\Delta\Delta Ct$ (Livak, Schmittgen, 2001).

Оценка активности лизосомных гидролаз и концентрации лизосфинголипидов в периферической крови пациентов с БП и контроля. От пациентов с БП и индивидуумов контрольной группы были получены образцы периферической венозной крови в пробирки с ЭДТА. Для подготовки сухих пятен крови 40 мкл цельной крови наносили на каждое пятно на тест-бланке из фильтровальной бумаги, после чего пятнам давали высохнуть на открытом воздухе при комнатной температуре в течение 2 ч, а затем хранили при +4 °C до экстракции. Активность четырех лизосомных гидролаз, глюкоцереброзидазы (GCase), α -галактозидазы (GLA), галактоцереброзидазы (GALC), сфингомиелиназы (ASMase), и концентрацию трех лизосфинголипидов, гексазилсфингозина (HexSph) (смесь гликозилсфингозина (GlcSph) и галактозилсфингозина (GalSph)), лизосфингомиелина (LysoSM) и лизоглоботриазилсфингозина (LysoGb3), оценивали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) по ранее опубликованному нами протоколу (Pchelina et al., 2018).

Статистическую обработку данных проводили в среде программирования R версии 4.0.5. Отношение шансов (ОШ) было рассчитано с 95 % доверительным интервалом (ДИ) с помощью логистического анализа с поправкой на пол и возраст. Для оценки отличий относительного уровня экспрессии гена *RAB29*, активности лизосомных гидролаз и концентрации лизосфинголипидов между исследуемыми группами использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Для оценки ассоциации rs823144 гена *RAB29* с активностью лизосомных гидролаз применяли

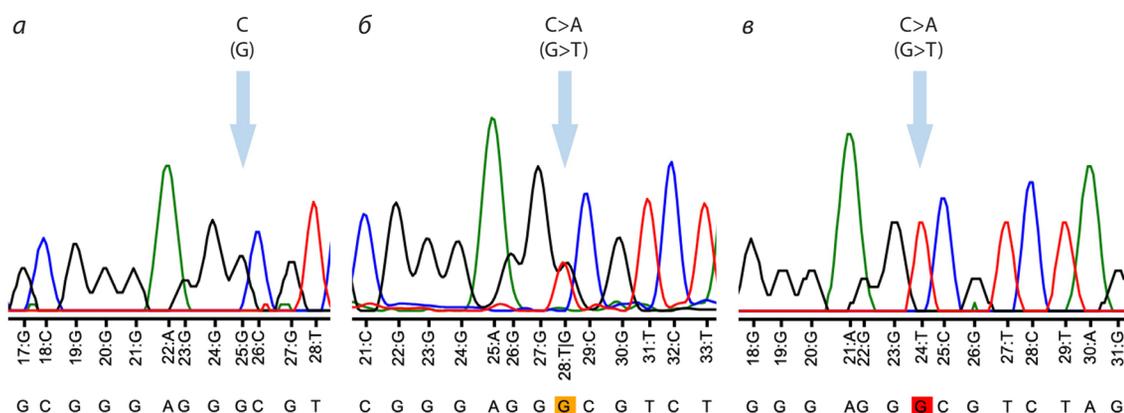


Рис. 2. Электрофореграмма, полученная в ходе секвенирования по Сэнгеру, отображающая результаты генотипирования rs823144 гена *RAB29*.

а – гомозигота по аллелю С (генотип СС); б – гетерозигота (генотип АС); в – гомозигота по аллелю А (генотип АА).

метод множественной линейной регрессии с поправкой на пол, возраст и длительность заболевания. Различия признавали статистически значимыми при $p < 0.05$. Данные представлены как медиана (мин–макс).

Результаты

Оценка ассоциации rs823144 гена *RAB29* с риском БП

В результате скрининга rs823144 гена *RAB29* среди пациентов с БП и в контрольной группе обнаружено, что для популяции Северо-Западного региона России мажорным является аллель А. Нами проведена проверка равновесия Харди–Вайнберга для rs823144 гена *RAB29* в исследуемых группах. Показано, что данное равновесие соблюдается ($p > 0.05$). Полученное распределение генотипов в исследуемых группах представлено в табл. 2. В результате нами выявлена ассоциация rs823144 гена *RAB29* со сниженным риском БП в Северо-Западном регионе России (ОШ: 0.7806, 95 % ДИ: 0.6578–0.9263, $p = 0.0046$).

Оценка относительного уровня мРНК гена *RAB29* в мононуклеарной фракции клеток периферической крови пациентов с БП и контроля

В ходе данного исследования впервые проведена оценка ассоциации rs823144 с относительным уровнем мРНК гена *RAB29* в мононуклеарной фракции клеток периферической крови пациентов с БП и контроля. Относительный уровень мРНК гена *RAB29* в мононуклеарах периферической крови у пациентов с БП составил 1.0 (0.22–1.75), а в контрольной группе – 0.96 (0.13–1.79). Статистически значимых различий в относительном уровне мРНК гена *RAB29* в мононуклеарной фракции клеток периферической крови пациентов с БП и контроля не выявлено ($p > 0.05$). При делении исследуемых групп по генотипам rs823144 гена *RAB29* относительный уровень мРНК гена *RAB29* составил в группе пациентов с БП: АА – 1.09 (0.55–1.68), АС+СС – 1.13 (0.36–1.75); в контрольной группе: АА – 1.05 (0.58–1.28), АС+СС – 0.97 (0.55–1.33). При делении исследуемых групп по генотипам rs823144 гена *RAB29* относительный уровень мРНК гена *RAB29* был в группе пациентов с БП: АА – 1.09 (0.55–1.68), АС+СС – 1.13 (0.36–1.75); в контрольной группе: АА – 1.05 (0.58–1.28), АС+СС – 0.97 (0.55–1.33). Ассоциации

rs823144 гена *RAB29* с относительным уровнем мРНК гена *RAB29* во всех исследуемых группах не выявлено ($p > 0.05$).

Ассоциация rs823144 гена *RAB29* с активностью лизосомных гидролаз и концентрацией лизосфинголипидов в периферической крови пациентов с БП и контроля

В ходе данной работы впервые в мире проведено ассоциативное исследование rs823144 гена *RAB29* и активности лизосомных гидролаз, а также концентрации лизосфинголипидов в крови пациентов с БП и контроля.

Пациенты с БП характеризовались повышенной активностью GALC и сниженной концентрацией LysoSM по сравнению с контролем ($p = 0.008$, $p = 0.01$ соответственно) (табл. 3). При делении групп по генотипам rs823144 гена *RAB29* было показано, что носительство аллеля С rs823144 гена *RAB29* ассоциировано с повышением активности GLA и снижением концентрации LysoGb3, который является субстратом гидролазы GLA, в крови в группе пациентов с БП ($p = 0.038$, $p = 0.022$ соответственно) (см. табл. 3). Обнаруженные ассоциации были подтверждены регрессионным анализом с поправкой на пол, возраст и длительность заболевания (GLA: $\beta = 1.11$, $p = 0.024$; LysoGb3: $\beta = -0.23$, $p = 0.015$ соответственно) (табл. 4). Статистически значимых различий в активности GCase, GLA и ASMase, а также в концентрации HexSph и LysoGb3 в объединенных группах контроля и пациентов с БП не найдено. Аналогично при делении групп по генотипам rs823144 гена *RAB29* различий в активности GCase, ASMase, GALC и концентрации HexSph не выявлено.

Показано также, что носители аллеля С среди пациентов с БП характеризовались снижением концентрации LysoGb3 и LysoSM в крови по сравнению с объединенной группой контроля ($p = 0.045$, $p = 0.015$ соответственно). В то же время пациенты с БП с генотипом АА rs823144 гена *RAB29* характеризовались повышением концентрации LysoSM по сравнению с объединенной группой контроля ($p = 0.022$). Примечательно, что повышение активности GLA и снижение концентрации ее субстрата, LysoGb3, в крови были характерны для носителей аллеля С rs823144 гена *RAB29* только в группе пациентов с БП, но не в контроле.

Таблица 2. Частоты генотипов и аллелей rs823144 в исследуемых группах

Генотипы и аллели	БП, % (N = 903)	Контроль, % (N = 618)	ОШ (95 % ДИ), p-value
АА	63.3 (N = 572)	57 (N = 352)	АС+СС vs АА: 0.7658 (0.6213–0.9438), $p = 0.0123$; СС vs АА+СС: 0.6671 (0.4392–1.0132), $p = 0.0576$
АС	31.5 (N = 284)	35.4 (N = 219)	
СС	5.2 (N = 47)	7.6 (N = 47)	
АС+СС	36.7 (N = 331)	43 (N = 266)	
АА+АС	94.8 (N = 856)	92.4 (N = 571)	
А	79.1 (N = 1428)	74.7 (N = 923)	С vs А: 0.7806 (0.6578–0.9263), $p = 0.0046$
С	20.9 (N = 378)	25.3 (N = 313)	

Примечание. БП – болезнь Паркинсона; ОШ – отношение шансов.

Таблица 3. Активность лизосомных гидролаз и концентрации лизосфинголипидов в периферической крови пациентов с БП и контроля

Генотип	Активность лизосомных гидролаз, мМ/л/ч				Концентрация лизосфинголипидов, нг/мл		
	GCase	GLA	ASMase	GALC	HexSph	LysoGb3	LysoSM
Объединенные группы							
БП (N = 211)	6.78 (2.07–23.08)	4.8 (1.33–36.39)	4.54 (1.53–13.25)	2.13 (0.21–12.68) *p = 0.008	2.63 (0.49–13.23)	0.8 (0.04–40.77)	3.62 (0.72–16.08) *p = 0.01
Контроль (N = 179)	6.29 (1.55–32.13)	4.18 (1.03–14.81)	4.14 (1.4–12.39)	1.86 (0.24–9.35)	2.97 (0.57–15.36)	0.78 (0.03–2.31)	3.98 (0.59–11.6)
Группы, разделенные по генотипам rs823144 гена RAB29							
БП AA (N = 91)	5.67 (2.07–19.52)	4.05 (1.2–13.93)	4.28 (1.67–11.83)	2.17 (0.12–12.68)	2.55 (0.5–13.81)	0.93 (0.02–2.49)	3.84 (1.65–16.08) *p = 0.022
БП AC+CC (N = 55)	5.78 (2.42–23.08)	5.39 (1.61–13.72) **p = 0.038	4.76 (1.53–9.31)	2.2 (0.52–7.28)	2.89 (0.87–13.08)	0.61 (0.04–3.73) *p = 0.045 **p = 0.022	3.45 (0.72–15.34) *p = 0.015
Контроль AA (N = 52)	6.92 (1.55–32.13)	4.23 (1.86–12.94)	4.35 (1.5–10.99)	2.19 (0.58–9.35)	2.37 (0.57–12.11)	0.77 (0.16–2.27)	4.37 (0.59–14.87)
Контроль AC+CC (N = 40)	8.11 (3.9–17.23)	4.42 (2.17–12.6)	4.4 (1.82–12.03)	2.19 (0.96–8.37)	2.54 (0.69–9.87)	0.86 (0.03–2.31)	4.44 (2.03–11.75)

Примечание. БП – болезнь Паркинсона; GCase – глюкоцереброзидаза; GLA – α-галактозидаза; GALC – галактоцереброзидаза; ASMase – сфингомиелиназа; HexSph – гексазилсфингозин; LysoSM – лизосфингомиелин; LysoGb3 – лизоглоботриаозилсфингозин.

* По сравнению с объединенной группой контроля; ** по сравнению с пациентами с БП с генотипом AA. Данные представлены в виде медианы (мин–макс).

Обсуждение

Ген *RAB29* – один из пяти генов, расположенных в ранее ассоциированном с риском БП локусе *PARK16*, локализованном на длинном плече хромосомы 1, сегмент 1q32 (Simón-Sánchez et al., 2009; Tucci et al., 2010). В ассоциативных исследованиях показано, что носительство минорного аллеля С rs823144, расположенного в промоторной области гена *RAB29*, ассоциировано со снижением риска БП в различных популяциях (Gan-Or et al., 2012; Xia et al., 2015; Khaligh et al., 2017; Sun et al., 2021). Предполагается, что аллель С rs823144 гена *RAB29* может влиять на сайт связывания транскрипционных факторов (Gan-Or et al., 2012; Khaligh et al., 2017).

In silico предсказано, что аллель С rs823144 гена *RAB29* потенциально может устранять сайт связывания для транскрипционного фактора c-Ets-1 и добавлять сайты связывания для трех других: p300, GATA-1 и Sp1, что может приводить к увеличению экспрессии гена *RAB29* (Gan-Or et al., 2012). С использованием базы данных GTeX (<https://www.gtexportal.org/>) показана связь генотипа CC rs823144 со снижением уровня экспрессии *RAB29* в цельной крови и в головном мозге ($p < 0.0001$). В свою очередь, увеличение экспрессии гена *RAB29*, одного из основных регуляторов киназы LRRK2, потенциально может нарушать ее активацию. Киназа LRRK2, фосфорилируя белки семейства Rab, регулирует эндолизосомный транспорт (Reczek et al., 2007; Wei et al., 2023). Таким образом, нарушение процесса активации киназы LRRK2 может вызывать дисфункцию транспорта лизосомных гидролаз и, как следствие, нарушение их активности.

В данном исследовании выявлена ассоциация аллеля С rs823144 гена *RAB29* со сниженным риском БП в Северо-Западном регионе России, что согласуется с мировыми данными (Gan-Or et al., 2012; Khaligh et al., 2017; Sun et al., 2021). В то же время нами не обнаружены ассоциации аллеля С rs823144 гена *RAB29* с уровнем мРНК гена *RAB29* как в группе пациентов с БП, так и в контроле.

Дисфункция лизосом считается одним из ключевых звеньев, лежащих в основе патогенеза БП. Ранее нами и другими исследователями были продемонстрированы изменения активности лизосомных гидролаз и уровня сфинголипидов в периферических жидкостях, а также в посмертных образцах черной субстанции и височной коры мозга пациентов с БП (Alcalay et al., 2018; Nelson et al., 2018; Huebecker et al., 2019; Chang et al., 2022; Usenko et al., 2022, 2024). Так, нами показаны увеличение активности GALC и снижение концентрации LysoSM, являющегося субстратом ASMase, вовлеченных в метаболизм лизосфинголипидов, в периферической крови пациентов с БП (Usenko et al., 2022, 2024). В свою очередь, нарушение метаболизма лизосфинголипидов, в том числе посредством изменения активности лизосомных гидролаз, может способствовать агрегации белка альфа-синуклеина (Mazzulli et al., 2011; Marie et al., 2015).

Обсуждается, что накапливающиеся лизосфинголипиды в нейронах могут напрямую стабилизировать нейротоксичные олигомеры альфа-синуклеина (Battis et al., 2023). Ранее в аутоптатах головного мозга пациентов с БП были найдены прямая корреляция концентрации изоформ лизосфинголипида LysoGb3 и обратная корреляция

Таблица 4. Активность лизосомных гидролаз и концентрации лизосфинголипидов в периферической крови пациентов с БП (регрессионный анализ)

Гидролазы/лизосфинголипиды	Генотип/ другие характеристики	БП			Контроль		
		β	95 % ДИ	<i>p</i> -value	β	95 % ДИ	<i>p</i> -value
GCase	АС+СС	-0.95	-2.32–0.43	0.17	1.44	-0.25–3.14	0.09
	Пол (мужчины:женщины)	0.55	-0.81–1.90	0.43	0.12	-1.61–1.85	0.89
	Возраст, годы	-0.03	-0.094–0.028	0.29	-0.06	-0.17–0.05	0.30
	Длительность заболевания, годы	0.004	-0.042–0.049	0.87	–	–	–
GLA	АС+СС	1.11	0.15–2.07	0.02	-0.29	-1.52–0.95	0.64
	Пол (мужчины:женщины)	0.03	-0.93–0.98	0.96	0.93	-0.33–2.18	0.14
	Возраст, годы	-0.03	-0.07–0.01	0.16	-0.00001	-0.080–0.080	1
	Длительность заболевания, годы	-0.002	-0.03–0.03	0.93	–	–	–
ASMase	АС+СС	0.23	-0.53–0.98	0.55	0.31	-0.85–1.46	0.60
	Пол (мужчины:женщины)	0.05	-0.69–0.80	0.87	-0.20	-1.38–0.97	0.73
	Возраст, годы	0.06	0.03–0.09	0.0005	-0.021	-0.096–0.054	0.58
	Длительность заболевания, годы	0.025	0.0005–0.050	0.046	–	–	–
GALC	АС+СС	0.080	-0.57–0.72	0.81	0.07	-0.64–0.77	0.85
	Пол (мужчины:женщины)	0.16	-0.48–0.80	0.62	-0.15	-0.87–0.57	0.67
	Возраст, годы	-0.017	-0.046–0.012	0.25	-0.011	-0.057–0.035	0.63
	Длительность заболевания, годы	-0.0051	-0.027–0.016	0.64	–	–	–
HexSph	АС+СС	-0.014	-0.92–0.90	0.97	0.12	-0.80–1.04	0.80
	Пол (мужчины:женщины)	0.35	-0.55–1.24	0.45	0.49	-0.44–1.43	0.30
	Возраст, годы	-0.028	-0.069–0.013	0.18	0.011	-0.048–0.071	0.71
	Длительность заболевания, годы	-0.028	-0.058–0.0022	0.069	–	–	–
LysoGb3	АС+СС	-0.23	-0.41–0.044	0.015	0.039	-0.16–0.24	0.70
	Пол (мужчины:женщины)	-0.08	-0.26–0.10	0.39	-0.043	-0.25–0.16	0.67
	Возраст, годы	-0.007	-0.015–0.0016	0.11	-0.0039	-0.017–0.009	0.55
	Длительность заболевания, годы	-0.001	-0.007–0.004	0.66	–	–	–
LysoSM	АС+СС	-0.17	-1.18–0.84	0.74	-0.25	-1.51–1.014	0.70
	Пол (мужчины:женщины)	-0.82	-1.82–0.17	0.10	-0.63	-1.91–0.65	0.33
	Возраст, годы	-0.064	-0.11–0.018	0.006	0.070	-0.011–0.15	0.089
	Длительность заболевания, годы	-0.028	-0.061–0.0056	0.10	–	–	–

Примечание. БП – болезнь Паркинсона; GCase – глюкоцереброзидаза; GLA – α -галактозидаза; GALC – галактоцереброзидаза; ASMase – сфингомиелиназа; HexSph – гексазилсфингозин; LysoSM – лизосфингомиелин; LysoGb3 – лизоглоботриаозилсфингозин.

активности GLA с уровнем белка альфа-синуклеина, фосфорилированного по серину 129 – патологической форме белка, превалирующей в белковых агрегатах при БП (Nelson et al., 2018). В данном исследовании обнаруженная нами впервые в мире в крови у пациентов с БП ассоциация аллеля С rs823144 гена *RAB29* с повышением активности GLA и снижением концентрации LysoGb3, а также выявленное повышение концентрации LysoSM у носителей генотипа АА rs823144 гена *RAB29* позволяют предположить роль гена *RAB29* в метаболизме сфинголипидов при болезни Паркинсона.

Следует отметить, что выраженное снижение активности GLA вследствие мутаций в гене *GLA* приводит к редкой лизосомной болезни накопления – болезни Фабри.

Примечательно, что повышенная концентрация LysoGb3 – фактор риска поражения белого вещества головного мозга при болезни Фабри (Rombach et al., 2010). Нами показано, что накопление LysoGb3 может происходить не строго специфично при болезни Фабри, а наблюдаться также при нейронопатических формах мукополисахаридозов (Baydakova et al., 2020). Можно предположить, что выявленная нами ассоциация аллеля С rs823144 гена *RAB29* с повышением активности GLA и снижением ее субстрата LysoGb3 в крови при БП также может влиять на клиническое течение заболевания.

Настоящее исследование имеет несколько ограничений. Размер выборок пациентов с БП и контрольной группы, включенных в эксперимент по оценке ассоциации вариан-

та rs823144 гена *RAB29* с уровнем мРНК гена *RAB29*, был ограничен. Сравнимые группы были гетерогенными по популяционному составу. Кроме того, в рамках этого исследования не оценена ассоциация изучаемого генетического варианта с активностью киназы LRRK2.

Заключение

Таким образом, в ходе данного исследования нами впервые в мире показана ассоциация аллеля С rs823144 гена *RAB29*, ранее охарактеризованного как протективного в отношении БП в других популяциях, со сниженным риском БП и в Северо-Западном регионе России. Впервые продемонстрировано, что носительство аллеля С rs823144 ассоциировано с повышенной активностью GLA и сниженной концентрацией LysoGb3 в крови при болезни Паркинсона.

Полученные данные указывают на возможную роль гена *RAB29* в метаболизме лизосфинголипидов и позволяют предположить, что rs823144 может влиять на клиническое течение БП. Необходимы дальнейшие исследования, посвященные изучению ассоциации локуса *PARK16* и гена *RAB29* с метаболизмом лизосфинголипидов и клиническим течением болезни Паркинсона.

Список литературы / References

Маниатис Л., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии: Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984 [Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Methods of Genetic Engineering. Molecular Cloning. Moscow: Mir Publ., 1984 (in Russian)]
Alcalay R.N., Levy O.A., Waters C.C., Fahn S., Ford B., Kuo S.H., Mazzoni P., ... Wolf P., Oliva P., Keutzer J., Marder K., Zhang X. Glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations. *Brain*. 2015;138(9):2648-2658. doi 10.1093/brain/awv179
Alcalay R.N., Wolf P., Levy O.A., Kang U.J., Waters C., Fahn S., Ford B., ... Chung W.K., Oliva P., Keutzer J., Marder K., Zhang X.K. Alpha galactosidase A activity in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2018;112:85-90. doi 10.1016/j.nbd.2018.01.012
Battis K., Xiang W., Winkler J. The bidirectional interplay of α -synuclein with lipids in the central nervous system and its implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(17):13270. doi 10.3390/ijms241713270
Baydakova G., Ilyushkina A., Gaffke L., Pierzynowska K., Bychkov I., Ługowska A., Wegrzyn G., Tylki-Szymanska A., Zakharova E. Elevated LysoGb3 concentration in the neuronopathic forms of mucopolysaccharidoses. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(3):155. doi 10.3390/diagnostics10030155
Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1968;97:77-89
Chang K.H., Cheng M.L., Tang H.Y., Huang C.Y., Wu H.C., Chen C.M. Alterations of sphingolipid and phospholipid pathways and ornithine level in the plasma as biomarkers of Parkinson's disease. *Cells*. 2022;11(3):395. doi 10.3390/cells11030395
Galper J., Dean N.J., Pickford R., Lewis S.J.G., Halliday G.M., Kim W.S., Dzakmo N. Lipid pathway dysfunction is prevalent in patients with Parkinson's disease. *Brain*. 2022;145(10):3472-3487. doi 10.1093/brain/awac176
Gan-Or Z., Bar-Shira A., Dahary D., Mirelman A., Kedmi M., Gurevich T., Giladi N., Orr-Urtreger A. Association of sequence alterations in the putative promoter of *RAB7L1* with a reduced Parkinson disease risk. *Arch Neurol*. 2012;69(1):105-110. doi 10.1001/archneurol.2011.924

Huebecker M., Moloney E.B., Van Der Spoel A.C., Priestman D.A., Isacson O., Hallett P.J., Platt F.M. Reduced sphingolipid hydrolase activities, substrate accumulation and ganglioside decline in Parkinson's disease. *Mol Neurodegener*. 2019;14(1):40. doi 10.1186/s13024-019-0339-z
Kedariti M., Frattini E., Baden P., Cogo S., Civiero L., Ziviani E., Zilio G., ... Di Fonzo A., Alcalay R.N., Rideout H., Greggio E., Plotegher N. LRRK2 kinase activity regulates GCase level and enzymatic activity differently depending on cell type in Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis*. 2022;8(1):92. doi 10.1038/s41531-022-00354-3
Khaligh A., Goudarzian M., Moslem A., Mehrtash A., Jamshidi J., Darvish H., Emamalizadeh B. RAB7L1 promoter polymorphism and risk of Parkinson's disease; a case-control study. *Neurol Res*. 2017; 39(5):468-471. doi 10.1080/01616412.2017.1297558
Kuwahara T., Iwatsubo T. The emerging functions of LRRK2 and Rab GTPases in the endolysosomal system. *Front Neurosci*. 2020;14: 227. doi 10.3389/fnins.2020.00227
Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754-1760. doi 10.1093/bioinformatics/btp324
Lill C.M. Genetics of Parkinson's disease. *Mol Cell Probes*. 2016; 30(6):386-396. doi 10.1016/j.mcp.2016.11.001
Liu Z., Bryant N., Kumaran R., Beilina A., Abeliovich A., Cookson M.R., West A.B. LRRK2 phosphorylates membrane-bound Rabs and is activated by GTP-bound Rab7L1 to promote recruitment to the trans-Golgi network. *Hum Mol Genet*. 2018;27(2):385-395. doi 10.1093/hmg/ddx410
Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. doi 10.1006/meth.2001.1262
MacLeod D.A., Rhinn H., Kuwahara T., Zolin A., Di Paolo G., MacCabe B.D., Marder K.S., Honig L.S., Clark L.N., Small S.A., Abeliovich A. Rab7L1 interacts with LRRK2 to modify intraneuronal protein sorting and Parkinson's disease risk. *Neuron*. 2013; 77(3):425-439. doi 10.1016/j.neuron.2012.11.033
Madero-Pérez J., Fdez E., Fernández B., Lara Ordóñez A.J., Blanca Ramírez M., Gómez-Suaga P., Waschbüsch D., ... Beilina A., Gonnelli A., Cookson M.R., Greggio E., Hilfiker S. Parkinson disease-associated mutations in LRRK2 cause centrosomal defects via Rab8a phosphorylation. *Mol Neurodegener*. 2018;13(1):3. doi 10.1186/S13024-018-0235-y
Marie G., Dunning C.J., Gaspar R., Grey C., Brundin P., Sparr E., Linse S. Acceleration of α -synuclein aggregation by exosomes. *J Biol Chem*. 2015;290(5):2969. doi 10.1074/jbc.M114.585703
Mazzulli J.R., Xu Y.H., Sun Y., Knight A.L., McLean P.J., Caldwell G.A., Sidransky E., Grabowski G.A., Krainc D. Gaucher disease glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell*. 2011;146(1):37-52. doi 10.1016/j.cell.2011.06.001
McKenna A., Hanna M., Banks E., Sivachenko A., Cibulskis K., Kernytsky A., Garimella K., Altshuler D., Gabriel S., Daly M., DePristo M.A. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010;20(9):1297-1303. doi 10.1101/gr.107524.110
Nalls M.A., Blauwendraat C., Vallerga C.L., Heilbron K., Bandres-Ciga S., Chang D., Tan M., ... Silburn P.A., Vallerga C.L., Wallace L., Wray N.R., Zhang F. Identification of novel risk loci, causal insights, and heritable risk for Parkinson's disease: a meta-genome wide association study. *Lancet Neurol*. 2019;18(12):1091-1102. doi 10.1016/S1474-4422(19)30320-5
Nechushtai L., Frenkel D., Pinkas-Kramarski R. Autophagy in Parkinson's disease. *Biomolecules*. 2023;13(10):1435. doi 10.3390/biom13101435
Nelson M.P., Boutin M., Tse T.E., Lu H., Haley E.D., Ouyang X., Zhang J., Auray-Blais C., Shacka J.J. The lysosomal enzyme alpha-Galactosidase A is deficient in Parkinson's disease brain in associa-

- tion with the pathologic accumulation of alpha-synuclein. *Neurobiol Dis.* 2018;110:68-81. doi 10.1016/j.nbd.2017.11.006
- Pchelina S., Baydakova G., Nikolaev M., Senkevich K., Emelyanov A., Kopytova A., Miliukhina I., Yakimovskii A., Timofeeva A., Berkovich O., Fedotova E., Illarioshkin S., Zakharova E. Blood lysosphingolipids accumulation in patients with Parkinson's disease with glucocerebrosidase 1 mutations. *Mov Disord.* 2018;33(8):1325-1330. doi 10.1002/mds.27393
- Pihlström L., Rengmark A., Björnará K.A., Dizdar N., Fardell C., Forsgren L., Holmberg B., Larsen J.P., Linder J., Nissbrandt H., Tysnes O.B., Dietrichs E., Toft M. Fine mapping and resequencing of the PARK16 locus in Parkinson's disease. *J Hum Genet.* 2015; 60(7):357-362. doi 10.1038/jhg.2015.34
- Purlyte E., Dhekne H.S., Sarhan A.R., Gomez R., Lis P., Wightman M., Martinez T.N., Tonelli F., Pfeffer S.R., Alessi D.R. Rab29 activation of the Parkinson's disease-associated LRRK2 kinase. *EMBO J.* 2018;37(1):1-18. doi 10.15252/EMBJ.201798099
- Rausch T., Fritz M.H.Y., Untergasser A., Benes V. Tracy: basecalling, alignment, assembly and deconvolution of sanger chromatogram trace files. *BMC Genomics.* 2020;21(1):230. doi 10.1186/S12864-020-6635-8
- Reczek D., Schwake M., Schröder J., Hughes H., Blanz J., Jin X., Brondyk W., Van Patten S., Edmunds T., Saftig P. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell.* 2007;131(4):770-783. doi 10.1016/j.cell.2007.10.018
- Rivero-Ríos P., Romo-Lozano M., Fernández B., Fdez E., Hilfiker S. Distinct roles for Rab10 and Rab29 in pathogenic LRRK2-mediated endolysosomal trafficking alterations. *Cells.* 2020;9(7):1719. doi 10.3390/cells9071719
- Rombach S.M., Dekker N., Bouwman M.G., Linthorst G.E., Zwinderman A.H., Wijburg F.A., Kuiper S., vd Bergh Weerman M.A., Groener J.E., Poorthuis B.J., Hollak C.E., Aerts J.M. Plasma globotriaosylsphingosine: diagnostic value and relation to clinical manifestations of Fabry disease. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1802(9): 741-748. doi 10.1016/j.bbadis.2010.05.003
- Rudakou U., Yu E., Krohn L., Ruskey J.A., Asayesh F., Dauvilliers Y., Spiegelman D., ... Rouleau G.A., Hassin-Baer S., Fon E.A., Alcalay R.N., Gan-Or Z. Targeted sequencing of Parkinson's disease loci genes highlights *SYT11*, *FGF20* and other associations. *Brain.* 2021;144(2):462-472. doi 10.1093/brain/awaa401
- Satake W., Nakabayashi Y., Mizuta I., Hirota Y., Ito C., Kubo M., Kawaguchi T., ... Yamamoto M., Hattori N., Murata M., Nakamura Y., Toda T. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet.* 2009;41(12):1303-1307. doi 10.1038/ng.485
- Shi J.J., Mao C.Y., Guo Y.Z., Fan Y., Hao X.Y., Li S.J., Tian J., ... Zuo C.Y., Liang Y.Y., Xu Y.M., Yang J., Shi C.H. Joint analysis of proteome, transcriptome, and multi-trait analysis to identify novel Parkinson's disease risk genes. *Aging.* 2024;16(2):1555-1580. doi 10.18632/aging.205444
- Simón-Sánchez J., Schulte C., Bras J.M., Sharma M., Gibbs J.R., Berg D., Paisan-Ruiz C., ... Chen H., Riess O., Hardy J.A., Singleton A.B., Gasser T. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet.* 2009;41(12):1308-1312. doi 10.1038/ng.487
- Steger M., Tonelli F., Ito G., Davies P., Trost M., Vetter M., Wachter S., ... Fell M.J., Morrow J.A., Reith A.D., Alessi D.R., Mann M. Phosphoproteomics reveals that Parkinson's disease kinase LRRK2 regulates a subset of Rab GTPases. *eLife.* 2016;5:e12813. doi 10.7554/eLife.12813.001
- Sun J., Deng L., Zhu H., Liu M., Lyu R., Lai Q., Zhang Y. Meta-analysis on the association between rs11868035, rs823144, rs3851179 and Parkinson's disease. *Meta Gene.* 2021;30:100949. doi 10.1016/j.mgene.2021.100949
- Tucci A., Nalls M.A., Houlden H., Revesz T., Singleton A.B., Wood N.W., Hardy J., Paisán-Ruiz C. Genetic variability at the PARK16 locus. *Eur J Hum Genet.* 2010;18(12):1356-1359. doi 10.1038/ejhg.2010.125
- Usenko T.S., Senkevich K.A., Bezrukova A.I., Baydakova G.V., Basharova K.S., Zhuravlev A.S., Gracheva E.V., ... Palchikova E.I., Zalutskaya N.M., Emelyanov A.K., Zakharova E.Y., Pchelina S.N. Impaired sphingolipid hydrolase activities in dementia with Lewy bodies and multiple system atrophy. *Mol Neurobiol.* 2022;59(4): 2277-2287. doi 10.1007/S12035-021-02688-0
- Usenko T.S., Senkevich K.A., Basharova K.S., Bezrukova A.I., Baydakova G.V., Tyurin A.A., Beletskaya M.V., Kulabukhova D.G., Grunina M.N., Emelyanov A.K., Miliukhina I.V., Timofeeva A.A., Zakharova E.Y., Pchelina S.N. LRRK2 exonic variants are associated with lysosomal hydrolase activities and lysosphingolipid alterations in Parkinson's disease. *Gene.* 2023;882:147639. doi 10.1016/j.gene.2023.147639
- Usenko T.S., Timofeeva A., Beletskaya M., Basharova K., Baydakova G., Bezrukova A., Grunina M., Emelyanov A., Miliukhina I., Zakharova E., Pchelina S. The effect of p.G2019S mutation in the *LRRK2* gene on the activity of lysosomal hydrolases and the clinical features of Parkinson's disease associated with p.N370S mutation in the *GBA1* gene. *J Integr Neurosci.* 2024;23(1):16. doi 10.31083/jjin2301016
- Vincez T., Posfai J., Roberts R.J. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3688-3691. doi 10.1093/nar/gkg526
- Wang S., Ma Z., Xu X., Wang Z., Sun L., Zhou Y., Lin X., Hong W., Wang T. A role of Rab29 in the integrity of the trans-golgi network and retrograde trafficking of mannose-6-phosphate receptor. *PLoS One.* 2014;9(5):e96242. doi 10.1371/journal.pone.0096242
- Wei Y., Awan M.U.N., Bai L., Bai J. The function of Golgi apparatus in LRRK2-associated Parkinson's disease. *Front Mol Neurosci.* 2023; 16:1097633. doi 10.3389/fnmol.2023.1097633
- Xia H., Luo Q., Li X.X., Yang X.L. Association between PARK16 gene polymorphisms and susceptibility of Parkinson's disease in a Chinese population. *Genet Mol Res.* 2015;14(2):2978-2985. doi 10.4238/2015.april.10.7
- Ysselstein D., Nguyen M., Young T.J., Severino A., Schwake M., Merchant K., Krainc D. LRRK2 kinase activity regulates lysosomal glucocerebrosidase in neurons derived from Parkinson's disease patients. *Nat Commun.* 2019;10(1):5570. doi 10.1038/s41467-019-13413-w
- Zhu H., Tonelli F., Turk M., Prescott A., Alessi D.R., Sun J. Rab29-dependent asymmetrical activation of leucine-rich repeat kinase 2. *Science.* 2023;382(6677):1404-1411. doi 10.1126/science.adi9926
- Zimprich A., Biskup S., Leitner P., Lichtner P., Farrer M., Lincoln S., Kachergus J., Hulihan M., Uitti R.J., Calne D.B., Stoessl A.J. Mutations in *LRRK2* cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron.* 2004;44(4):601-607. doi 10.1016/j.neuron.2004.11.005

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 07.11.2024. После доработки 31.01.2025. Принята к публикации 30.06.2025.

doi 10.18699/vjgb-25-90

Вклад генов транскрипционных факторов семейства FOXO (*FOXO1*, *FOXO3*) в развитие хронической обструктивной болезни легких

В.А. Маркелов ^{1,2}, Л.З. Ахмадишина ^{1,3}, Т.Р. Насибуллин ¹, Ю.Г. Азнабаева ², О.В. Кочетова ^{1,2},
Н.Н. Хуснутдинова ¹, С.М. Измайлова ², Н.Ш. Загидуллин ², Г.Ф. Корытина ^{1,2} 

¹ Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

² Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

³ Уфимский государственный нефтяной технический университет, Уфа, Россия

 guly_kory@mail.ru

Аннотация. Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – многофакторное заболевание дыхательной системы, является третьей (после ишемической болезни сердца и инсульта) ведущей причиной смерти в мире. В рамках наиболее актуальных концепций патогенеза ХОБЛ ключевое значение уделяется ускоренному клеточному старению. Транскрипционные факторы семейства FOXO – важные ключевые компоненты сигнальных путей клеточного старения. Цель исследования – выявление ассоциации полиморфных вариантов генов *FOXO1* (rs12585277, rs9549240) и *FOXO3A* (rs 2253310, rs3800231) с развитием ХОБЛ и фенотипами заболевания. В работе использованы образцы ДНК больных ХОБЛ ($N = 710$) и здоровых индивидов ($N = 655$). Полиморфные локусы анализировали методом ПЦР в реальном времени. Впервые показаны значимые ассоциации полиморфных локусов генов *FOXO1* (rs12585277) и *FOXO3A* (rs2253310) с ХОБЛ и фенотипами заболевания. Ассоциация с ХОБЛ установлена с локусами генов *FOXO1* (rs12585277) ($P_{adj} = 0.0018$, OR = 1.44 генотип AG) и *FOXO3A* (rs2253310) ($P_{adj} = 5.926 \times 10^{-7}$, OR = 1.99 генотип GG). Обнаружена вариабельность показателей индекса курения (в пачках/лет), жизненной емкости легких и форсированной жизненной емкости легких в зависимости от полиморфных вариантов локусов *FOXO1* (rs9549240 и rs12585277) и *FOXO3A* (rs2253310). Идентифицирована значимая многофакторная регрессионная модель формирования ХОБЛ, в которую вошли полиморфные варианты генов *FOXO1* (rs12585277) и *FOXO3A* (rs2253310), индекс курения и возраст обследуемых ($P = 5.25 \times 10^{-93}$, AUC = 0.864). Многофакторная регрессионная модель развития фенотипа ХОБЛ с частыми обострениями включала генотип AG локуса *FOXO1* (rs12585277), индекс курения и возраст (AUC = 0.897, $P = 4.1 \times 10^{-86}$). Связанные с аутофагией, окислительным стрессом и клеточным гомеостазом транскрипционные факторы семейства FOXO как потенциальные биомаркеры и мишени для терапии могут стать основой для разработки новой стратегии диагностики и лечения хронической обструктивной болезни легких.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ); клеточное старение; аутофагия; окислительный стресс; транскрипционные факторы семейства FOXO; *FOXO1*; *FOXO3*

Для цитирования: Маркелов В.А., Ахмадишина Л.З., Насибуллин Т.Р., Азнабаева Ю.Г., Кочетова О.В., Хуснутдинова Н.Н., Измайлова С.М., Загидуллин Н.Ш., Корытина Г.Ф. Вклад генов транскрипционных факторов семейства FOXO (*FOXO1*, *FOXO3*) в развитие хронической обструктивной болезни легких. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(6):828-837. doi 10.18699/vjgb-25-90

Финансирование. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 23-25-00019.

The contribution of FOXO family transcription factor genes (*FOXO1*, *FOXO3*) to chronic obstructive pulmonary disease

V.A. Markelov ^{1,2}, L.Z. Akhmadishina ^{1,3}, T.R. Nasibullin ¹, Y.G. Aznabaeva ², O.V. Kochetova ^{1,2},
N.N. Khusnutdinova ¹, S.M. Izmailova ², N.Sh. Zagidullin ², G.F. Korytina ^{1,2} 

¹ Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

² Bashkortostan State Medical University, Ufa, Russia

³ Ufa State Petroleum Technological University, Ufa, Russia

 guly_kory@mail.ru

Abstract. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a multifactorial disease of the respiratory system and is the third leading cause of death worldwide. In the framework of the most relevant concepts of COPD pathogenesis, the key focus is on accelerated cellular senescence. FOXO family transcription factors are important hub components of

cellular senescence signaling pathways. The objective of the study is to identify the association of *FOXO1* (rs12585277, rs9549240), and *FOXO3A* (rs2253310, rs3800231) genes polymorphic variants with COPD and disease phenotypes. DNA samples from COPD patients ($N = 710$) and healthy individuals ($N = 655$) were used, polymorphic loci were analyzed by real-time PCR. For the first time, significant associations of *FOXO1* (rs12585277) and *FOXO3A* (rs2253310) gene polymorphic loci with COPD and disease phenotypes were shown. Association with COPD was established with *FOXO1* (rs12585277) ($P_{\text{adj}} = 0.0018$, OR = 1.44 for the AG genotype) and *FOXO3A* (rs2253310) ($P_{\text{adj}} = 5.926 \times 10^{-7}$, OR = 1.99 for the GG genotype). A significant genotype-dependent variation of smoking index (in pack/years), vital capacity and forced vital capacity was revealed for *FOXO1* (rs9549240, rs12585277) and *FOXO3A* (rs2253310) loci. Multiple regression and ROC analysis identified highly informative COPD risk model, which included polymorphic variants of the *FOXO1* (rs12585277) and *FOXO3A* (rs2253310) genes, smoking index and age ($P = 5.25 \times 10^{-93}$, AUC = 0.864). The multivariate regression model of the COPD "frequent exacerbator" phenotype included the AG genotype of *FOXO1* (rs12585277), smoking index and age (AUC = 0.897, $P = 4.1 \times 10^{-86}$). FOXO family transcription factors involved in autophagy, oxidative stress and cellular homeostasis may provide a platform for a new diagnostic and treatment strategy for COPD as potential biomarkers and targets for therapy.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease; cellular senescence; autophagy; oxidative stress; FOX transcription factor family; *FOXO1*; *FOXO3*

For citation: Markelov V.A., Akhmadishina L.Z., Nasibullin T.R., Aznabaeva Y.G., Kochetova O.V., Khusnutdinova N.N., Izmailova S.M., Zagidullin N.Sh., Korytina G.F. The contribution of FOXO family transcription factor genes (*FOXO1*, *FOXO3*) to chronic obstructive pulmonary disease. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2025; 29(6):828-837. doi 10.18699/vjgb-25-90

Введение

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – многофакторное заболевание дыхательной системы, затрагивающее дистальные отделы респираторных путей и легочную паренхиму с развитием эмфиземы легких (Agustí et al., 2023). ХОБЛ – третья (после ишемической болезни сердца и инсульта) ведущая причина смерти в мире, что объясняет постоянный процесс поиска новых подходов к диагностике, лечению и предупреждению развития данной патологии (Agustí et al., 2023). Несмотря на интенсивные исследования как молекулярных основ, так и различных клинических аспектов ХОБЛ, механизмы, лежащие в основе патогенеза ХОБЛ и различных фенотипов заболевания, остаются до сих пор не полностью понятыми (Brandsma et al., 2020).

Развитие ХОБЛ происходит в результате воздействия комплекса факторов риска в течение длительного времени, при этом основным считается табакокурение. Воздействие сигаретного дыма на дыхательные пути приводит к окислительному стрессу и активации воспалительных клеток и повреждению легочной ткани (Domej et al., 2014). В рамках наиболее актуальной концепции патогенеза ХОБЛ особое внимание уделяется ускоренному клеточному старению (Luo et al., 2024). Будучи фундаментальным механизмом поддержания гомеостаза тканей и органов, клеточное старение опосредовано множеством процессов. К наиболее значимым из них относятся повреждение ДНК, истощение теломер, дисфункция митохондрий, а также нарушения аутофагии и протеостаза (Li et al., 2024). Ранее нами был показан вклад генов семейства сиртуинов и Р1ЗК/АКТ сигнального каскада в развитие ХОБЛ (Кoryтина и др., 2023). Транскрипционные факторы FOXO являются основными мишенями сигнального каскада Р1ЗК/АКТ, осуществляя инсулин-зависимую регуляцию клеточного метаболизма (Farhan et al., 2020). Класс транскрипционных факторов FOXO млекопитающих на данный момент включает четыре белка: FOXO1 (FKHR), FOXO3a (FKHRL1), FOXO4 (AFX) и FOXO6 (Santos et al., 2023). Транскрипционные факторы FOXO регулируют экспрес-

сию ряда генов антиоксидантной защиты, клеточного цикла и апоптоза, пролиферации, метаболизма, а также участвуют в репрессии белков митохондриальной дыхательной цепи (Hagenbuchner, Ausserlechner, 2013).

Цель настоящего исследования – выявление ассоциации полиморфных вариантов генов транскрипционных факторов семейства FOXO (*FOXO1*, *FOXO3*) с развитием ХОБЛ и фенотипами заболевания.

Материалы и методы

Дизайн исследования – по принципу «случай-контроль». Использовали образцы ДНК неродственных индивидов, татар по этнической принадлежности, проживающих на территории Республики Башкортостан. Работа одобрена комитетом по этике Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (протокол № 19 от 01.11.2022). От всех участников получено информированное добровольное согласие на использование биологического материала. Критерии включения и исключения в исследование описаны нами ранее (Korytina et al., 2019). Диагноз ХОБЛ устанавливали с учетом рекомендаций рабочей группы по «Глобальной стратегии диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких» (<http://goldcopd.org>) на основании клинических и лабораторно-инструментальных исследований, включая компьютерную томографию высокого разрешения и спирометрию.

В контрольную группу вошли неродственные индивиды, не имевшие хронических заболеваний в анамнезе, в том числе болезней органов дыхания, а также острых респираторных заболеваний на момент сбора биоматериала, подобранные по полу, возрасту, статусу курения, воздействию факторов риска, региону проживания, этнической принадлежности. Критериями включения были нормальные показатели функции внешнего дыхания (ОФВ1/ФЖЕЛ > 70 %, ОФВ1 > 80 %) и возраст старше 45 лет. С целью выявления генетических маркеров, ассоциированных с фенотипами ХОБЛ, проводили сравнение

группы контроля и пациентов, дифференцированных по фенотипу заболевания, как описано нами ранее (Корытина и др., 2020) (Приложение, табл. S1)¹. Было выделено два фенотипа: первая группа – тяжелая форма с частыми обострениями; вторая группа – больные с редкими обострениями и стабильным течением заболевания. В табл. S1 представлена характеристика групп.

Генотипирование. ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с использованием фенольно-хлороформной экстракции. Были выбраны полиморфные локусы генов *FOXO1* (rs12585277, rs9549240) и *FOXO3A* (rs2253310, rs3800231), функциональная значимость которых исследовалась по базам RegulomeDB Version 1.1 (<https://regulomedb.org>), SNPinfo Web Server (<https://snpinfo.niehs.nih.gov>) и HaploReg v3 (Ward, Kellis, 2016) (табл. S2). Биоинформатический анализ показал, что выбранные SNP оказывали влияние на функционирование гена в различных типах тканей или были сцеплены с функциональными локусами гена. Полиморфные локусы анализировали при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени коммерческими наборами с флуоресцентной детекцией (<https://www.oligos.ru>, ООО «ДНК-Синтез», Россия) на приборе BioRad CFX96™ (Bio-Rad Laboratories, Inc, США). Подробно методы анализа описаны в работе (Корытина et al., 2019).

Статистическая обработка результатов. Описание стандартных методов статистического анализа приведено нами ранее (Корытина et al., 2019). Анализ отклонения полученных частот генотипов от равновесия Харди–Вайнберга и анализ ассоциаций отдельных SNP с заболеванием в базовом аллельном тесте и регрессионных моделях (доминантной, рецессивной, аддитивной (на дозу редкого аллеля – увеличение дозы редкого аллеля в ряду: гомозигота по частому аллелю (0) – гетерозигота (1) – гомозигота по редкому аллелю (2)) и сверхдоминирования (для гетерозигот)) проводили с использованием пакета SNPAssoc v. 2.0–2 для R (González et al., 2007). Полиморфный маркер считали ассоциированным с признаком при $P < 0.05$. Поправку на множественное тестирование выполняли с применением метода оценки доли ложноположительных результатов FDR (false discovery rate) с помощью программы (<https://tools.carbocation.com/FDR>). Частоты гаплотипов, стандартные коэффициенты сцепления для LD (D' , r^2) рассчитаны в программе Haploview 4.2. Вклад полиморфных вариантов изучаемых генов в варибельность количественных признаков, характеризующих тяжесть обструкции дыхательных путей (показатели функции внешнего дыхания – жизненная емкость легких (ЖЕЛ), форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ1)), и индекс курения определяли с помощью линейной регрессии. При построении многофакторных регрессионных моделей применяли метод логистической регрессии с пошаговым включением независимых переменных, в качестве которых выбирались отдельные генотипы/аллели исследуемых генов, а также клинические/демографические параметры (возраст, индекс курения, статус курения, пол).

Регрессионная модель – уравнение, в котором зависимая переменная представлена в виде функции от независимых переменных (предикторов). Уравнение лог-регрессии имеет вид:

$$Y = \text{logit}(P) = \ln(P/(1-P)) = \beta_0 + \beta_1.X_1 + \beta_2.X_2 + \dots + \beta_i.X_i,$$

где Y – зависимая переменная (статус: 0 – здоровый, 1 – больной), X – независимая переменная, β_0 – константа, β – коэффициент регрессии для независимой переменной, $X_1 \dots X_i$ – значение независимой переменной. Экспоненту отдельного коэффициента регрессии β интерпретировали как отношение шансов (OR). Проверку гипотезы о существовании построенной модели в целом с учетом всех независимых переменных проводили на основании теста отношения правдоподобия (likelihood ratio (LR) test). Для оценки эффективности регрессионных моделей рассчитывали показатель Нагелькерке R^2 (Nagelkerke R^2) и проводили анализ ROC-кривой. Способность регрессионной модели различать положительные и отрицательные случаи (статус больной–здоровый) оценивали площадью под ROC-кривой (AUC); значение AUC варьировало от 0.5 (дискриминационная способность модели отсутствует) до 1.0 (идеальная дискриминационная способность). Расчеты проводили с помощью программы SPSS v. 22.

Результаты

В сформированных выборках пациентов с ХОБЛ и контрольной группе выполнен анализ полиморфных локусов генов *FOXO1* (rs12585277, rs9549240) и *FOXO3A* (rs 2253310, rs3800231). Частоты генотипов всех исследованных полиморфных локусов в группе контроля находились в соответствии равновесию Харди–Вайнберга: *FOXO1* (rs12585277) ($P_{Х-В} = 0.597$), *FOXO1* (rs9549240) ($P_{Х-В} = 0.341$) и *FOXO3A* (rs 2253310) ($P_{Х-В} = 0.3191$), (rs3800231) ($P_{Х-В} = 0.3831$). Далее проведена оценка статистической значимости различий между группами по распределению частот аллелей и генотипов и рассчитаны показатели отношения шансов для редкого аллеля каждого локуса (базовый аллельный тест) (см. табл. 1).

На следующем этапе методом логистической регрессии анализировали ассоциацию отдельных полиморфных локусов с учетом количественных и бинарных признаков (пол, возраст, статус и индекс курения), вводимых в уравнение регрессии в качестве независимых переменных (см. табл. 1).

Выявлены статистически значимые различия в распределении частот генотипов между группами по локусу *FOXO1* (rs12585277) ($P = 0.002$). Ассоциация с развитием ХОБЛ была установлена в доминантной модели ($P_{\text{adj}} = 0.003$, OR = 1.42), частота гетерозиготного генотипа в группе больных ХОБЛ достигала 56.06 против 46.87 % в контроле ($P_{\text{adj}} = 0.0018$, OR = 1.44).

Значимые различия в распределении частот генотипов и аллелей между группами больных и здоровых индивидов установлены для локуса *FOXO3A* (rs2253310) ($P = 9.733 \times 10^{-7}$ и $P = 1.54 \times 10^{-7}$ соответственно). Ассоциация с ХОБЛ выявлена в доминантной ($P_{\text{adj}} = 5.926 \times 10^{-7}$, OR = 0.52), рецессивной ($P_{\text{adj}} = 3.360 \times 10^{-3}$, OR = 0.32), лог-аддитивной моделях ($P_{\text{adj}} = 1.451 \times 10^{-7}$, OR = 0.54)

¹ Табл. S1–S5 Приложения см. по адресу:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx28.pdf>

Таблица 1. Частоты аллелей и генотипов полиморфных локусов генов *FOXO1* и *FOXO3A* в группах больных ХОБЛ и здоровых индивидов, анализ ассоциации с развитием заболевания

Ген RefSNP	Редкий аллель	Генотипы, аллели, модель	ХОБЛ <i>n</i> (%) (<i>N</i> = 710)	Контроль <i>n</i> (%) (<i>N</i> = 655)	<i>P</i> _{adj}	<i>P</i> _{cor-FDR}	OR _{adj} (95 % CI)		
<i>FOXO1</i> rs12585277 G>A	A	GG/GA/AA	202/398/110 (28.45/56.06/15.49)	236/307/112 (36.03/46.87/17.10)	0.002	0.006	–		
		G/A	802/618 (56.48/43.52)	779/531 (59.47/40.53)	0.123	0.208	0.88 (0.76–1.03)		
		GG GA+AA	202 (28.45) 508 (71.55)	236 (36.03) 419 (63.97)	0.003	0.008	1.00 1.42 (1.11–1.82)		
		Доминантная							
		GG+AA GA	312 (43.94) 398 (56.06)	348 (53.13) 307 (46.87)	0.0018	0.006	1.00 1.44 (1.14–1.81)		
		GG+GA AA	600 (84.51) 110 (15.49)	543 (82.9) 112 (17.10)	0.5	0.54	1.00 0.90 (0.66–1.23)		
		Рецессивная							
		Лог-аддитивная	–	–	0.12	0.208	1.15 (0.97–1.36)		
		<i>FOXO1</i> rs9549240 T>G	T	GG/GT/TT	414/244/52 (58.31/34.37/7.32)	356/240/59 (54.35/36.64/9.01)	0.32	0.416	–
				G/T	1072/348 (75.49/24.51)	952/358 (72.67/27.33)	0.101	0.202	1.15 (0.97–1.37)
GG GT+TT	414 (58.31) 296 (41.69)			356 (54.35) 299 (45.65)	0.17	0.209	1.00 0.85 (0.67–1.07)		
Доминантная									
GG+TT GT	466 (65.66) 244 (34.37)			415 (63.36) 240 (36.64)	0.43	0.516	1.00 0.79 (0.52–1.21)		
GG+GT TT	658 (92.68) 52 (7.32)			596 (90.99) 59 (9.01)	0.52	0.54	1.00 0.85 (0.67–1.07)		
Рецессивная									
Лог-аддитивная	–			–	0.13	0.208	0.87 (0.73–1.04)		
<i>FOXO3A</i> rs3800231 A>G	A			GG/GA/AA	184/380/146 (25.92/53.52/20.56)	199/336/120 (30.38/51.30/18.32)	0.22	0.31	–
				G/A	748/672 (52.68/47.32)	734/576 (56.03/43.97)	0.86	0.86	0.87 (0.75–1.02)
		GG GA+AA	184 (25.92) 526 (74.08)	199 (30.38) 456 (69.62)	0.096	0.202	1.00 1.25 (0.96–1.63)		
		Доминантная							
		GG+AA GA	330 (46.48) 380 (53.52)	319 (48.70) 336 (51.30)	0.47	0.537	1.00 1.09 (0.86–1.38)		
		GG+GA AA	564 (79.44) 146 (20.56)	535 (81.68) 120 (18.32)	0.33	0.416	1.00 1.16 (0.86–1.57)		
		Рецессивная							
		Лог-аддитивная	–	–	0.097	0.173	1.16 (0.97–1.38)		
		<i>FOXO3A</i> rs2253310 C>G	C	GG/GC/CC	572/129/9 (80.56/18.17/1.27)	447/183/25 (68.24/27.94/3.82)	9.733×10^{-7}	5.8398×10^{-6}	–
				G/C	1273/147 (89.65/10.35)	1077/233 (82.21/17.79)	1.54×10^{-7}	1.848×10^{-6}	0.53 (0.43–0.67)
GG GC+CC	572 (80.56) 138 (19.44)			447 (68.24) 208 (31.76)	5.926×10^{-7}	4.7408×10^{-6}	1.00 0.52 (0.40–0.67)		
Доминантная									
GG+CC GC	581 (81.83) 129 (18.17)			472 (72.06) 183 (27.94)	4.111×10^{-5}	0.0001	1.00 0.57 (0.44–0.75)		
GG+GC CC	701 (98.73) 9 (1.27)			630 (96.18) 25 (3.82)	0.0003	0.0012	1.00 0.32 (0.14–0.72)		
Рецессивная									
Лог-аддитивная	–			–	1.451×10^{-7}	1.848×10^{-6}	0.54 (0.43–0.68)		

Примечание. *P* – значимость различий между группами по частотам аллелей и генотипов (тест χ^2 на гомогенность выборок); регрессионный анализ – количество индивидов, включенных в регрессионный анализ (*N* = 1365); *P*_{adj} – значимость для теста отношения правдоподобия лог-регрессионной модели с учетом возраста, статуса и индекса курения в различных моделях; OR_{adj} – отношение шансов с учетом всех факторов; 95 % CI – 95 % доверительный интервал для OR; *P*_{cor-FDR} – значимость теста после коррекции FDR.

и с гетерозиготным генотипом GC ($P_{\text{adj}} = 4.111 \times 10^{-5}$, OR = 0.57). При этом частый аллель G ($P = 1.54 \times 10^{-7}$, OR = 1.87 95 % CI 1.50–2.33) и генотип GG ($P_{\text{adj}} = 5.926 \times 10^{-7}$, OR = 1.99 95 % CI 1.57–2.47) чаще встречались в группе больных хронической обструктивной болезнью легких.

Для полиморфных локусов *FOXO1* (rs9549240) и *FOXO3A* (rs3800231) статистически значимых различий между группами больных и здоровых индивидов не обнаружено.

Анализ гаплотипов по полиморфным локусам генов *FOXO1* и *FOXO3A*

Выявлены неравновесие по сцеплению между локусами rs12585277 и rs9549240 гена *FOXO1* ($D' = 0.6183$, $r^2 = 0.429$) и статистически значимые различия в характере распределения частот гаплотипов гена *FOXO1* между группами больных ХОБЛ и контроля ($P = 0.045$) (табл. S3). Частота гаплотипа А-Г по локусам rs12585277 и rs9549240 была значимо выше в группе больных ХОБЛ (24.26 против 18.81 % в контроле, $P_{\text{adj}} = 0.011$, OR = 1.33).

Показано неравновесие по сцеплению между полиморфными локусами rs3800231 и rs2253310 гена *FOXO3A* ($D' = 0.3315$, $r^2 = 0.1452$) (см. табл. S3). Установлены статистически значимые различия в характере распределения частот гаплотипов между группами больных ХОБЛ и контроля ($P = 0.00001$). Частота гаплотипа А-Г по локусам rs3800231 и rs2253310 была значимо выше в группе ХОБЛ (40.27 против 32.56 % в контроле, $P_{\text{adj}} = 0.03$, OR = 1.25), тогда как гаплотипы А-С и С-С встречались чаще в группе здоровых индивидов ($P_{\text{adj}} = 0.0076$, OR = 0.65 и $P_{\text{adj}} = 0.0072$, OR = 0.51 соответственно).

Анализ ассоциации полиморфных вариантов генов *FOXO1* и *FOXO3A* с различными фенотипами ХОБЛ

С целью выявления генетических маркеров, ассоциированных с фенотипами ХОБЛ, проводили сравнение группы контроля и пациентов, дифференцированных по фенотипам заболевания по классификации (<http://goldcopd.org>), которая включала интегральную оценку фенотипа ХОБЛ с учетом количества обострений в год, результатов специализированных опросников: оценочный тест по ХОБЛ (COPD assessment test, CAT), шкалу оценки одышки медицинского исследовательского совета (medical research council dyspnea scale, MRC) и показателей исследования функции внешнего дыхания (табл. 2).

Статистически значимые ассоциации с развитием фенотипа ХОБЛ с частыми обострениями получены для полиморфных локусов генов *FOXO1* (rs12585277) в доминантной модели ($P_{\text{adj}} = 0.001$, OR = 1.65) и для гетерозиготного генотипа ($P_{\text{adj}} = 0.0005$, OR = 1.653); *FOXO3A* (rs2253310) в доминантной ($P_{\text{adj}} = 0.0002$, OR = 0.55) и лог-аддитивной моделях ($P_{\text{adj}} = 0.0001$, OR = 0.58), при этом гомозиготный по частому аллелю генотип GG локуса *FOXO3A* (rs2253310) чаще встречался среди больных (OR = 1.81 95 % CI 1.32–2.49). Частота гаплотипа А-Г по локусам rs12585277 и rs9549240 гена *FOXO1* была выше в группе ХОБЛ (24.29 против 18.81 % в контроле, $P_{\text{adj}} = 0.022$, OR = 1.36 95 % CI 1.05–1.76) (табл. S4).

У больных ХОБЛ с редкими обострениями значимая ассоциация была подтверждена только для локуса *FOXO3A* (rs2253310) в доминантной ($P_{\text{adj}} = 0.00001$, OR = 0.48) и лог-аддитивной ($P_{\text{adj}} = 0.00001$, OR = 0.5) моделях. Генотип GG локуса rs2253310 (OR = 2.09 95 % CI 1.53–2.88) и гаплотип А-Г по локусам rs3800231 и rs2253310 гена *FOXO3A* ($P_{\text{adj}} = 0.032$, OR = 1.31 95 % CI 1.02–1.67) чаще встречались в группе больных.

Ассоциация полиморфных локусов генов *FOXO1* и *FOXO3A* с показателями функции внешнего дыхания и индексом курения

Курение – основной фактор риска развития ХОБЛ и пусковой механизм развития окислительного стресса, приводящего к повреждению ДНК и апоптозу клеток (Domej et al., 2014). Проведен анализ количественного показателя, отражающего интенсивность и стаж курения (индекс курения) в общей группе курильщиков, включающей как больных, так и здоровых индивидов, в зависимости от полиморфных вариантов изученных генов *FOXO1* и *FOXO3A* (табл. S5). Установлено, что генотип GT по локусу *FOXO1* (rs9549240) и генотип GG по локусу *FOXO3A* (rs2253310) ассоциированы с более высокими показателями индекса курения в общей группе курильщиков ($P = 0.0042$ и $P = 0.012$).

Показатели функции легочного дыхания, такие как жизненная емкость легких (ЖЕЛ), форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ1), соотношение объема форсированного выдоха в 1 с и жизненной емкости легких (ОФВ1/ЖЕЛ), – ключевые клинические показатели, отражающие степень обструкции дыхательных путей при ХОБЛ и прогрессирование заболевания. Более низкие значения ЖЕЛ имели индивиды с гомозиготным генотипом GG по локусу *FOXO1* (rs9549240) ($P = 0.0071$); низкие значения ФЖЕЛ были у носителей аллеля А в гомозиготном и гетерозиготном состояниях (доминантная модель) по локусу *FOXO1* (rs12585277) ($P = 0.04$).

Множественный регрессионный анализ и ROC-анализ

На заключительном этапе с использованием метода множественного регрессионного анализа с пошаговым включением предикторов (независимых переменных) и последующего ROC-анализа проведен поиск комплексных клиничко-генетических моделей риска развития ХОБЛ. В качестве независимых переменных были отдельные генотипы или аллели исследованных генов, далее добавляли клиничко-демографические показатели (пол, возраст, статус и индекс курения) и выбирали наиболее значимые многофакторные регрессионные модели. Параметры функции легочного дыхания были исключены, так как они являются классическими и хорошо идентифицированными предикторами ХОБЛ и тяжести заболевания.

В информативную регрессионную модель формирования ХОБЛ в целом, без дифференциации на фенотипы, вошли полиморфные варианты генов *FOXO1* (rs12585277) (генотип AG) и *FOXO3A* (rs2253310) (аллель С), индекс курения и возраст обследуемых ($P = 5.25 \times 10^{-93}$) (табл. 3). ROC-анализ полученной модели показал ее высокую спо-

Таблица 2. Результаты анализа ассоциации полиморфных локусов генов *FOXO1* и *FOXO3A* в группах, дифференцированных по фенотипам ХОБЛ

Ген, SNP	Редкий аллель	Генотип, модель	OR _{adj} (95 % CI)	P _{adj}	P _{cor-FDR}
ХОБЛ с редкими обострениями (N = 991)					
<i>FOXO1</i> rs12585277 G>A	A	GG	1.00	0.16	0.18
		GA+AA	1.22 (0.93–1.60)		
		Доминантная			
		Лог-аддитивная	1.06 (0.89–1.28)	0.51	0.51
<i>FOXO1</i> rs9549240 T>G	T	GG	1.00	0.099	0.148
		GT+TT	0.80 (0.61–1.04)		
		Доминантная			
		Лог-аддитивная	0.84 (0.68–1.03)	0.094	0.148
<i>FOXO3A</i> rs3800231 A>G	A	GG	1.00	0.12	0.154
		GA+AA	1.27 (0.94–1.72)		
		Доминантная			
		Лог-аддитивная	1.20 (0.99–1.46)	0.063	0.148
<i>FOXO3A</i> rs2253310 C>G	C	GG	1.00	4.961 × 10 ⁻⁷	2.232 × 10 ⁻⁶
		GC+CC	0.48 (0.35–0.65)		
		Доминантная			
		Лог-аддитивная	0.50 (0.38–0.67)	1.373 × 10 ⁻⁷	1.235 × 10 ⁻⁶
ХОБЛ с частыми обострениями (N = 1029)					
<i>FOXO1</i> rs12585277 G>A	A	GG	1.00	0.001	0.0022
		GA+AA	1.65 (1.22–2.24)		
		Доминантная			
		GG+AA	1.00		
		GA	1.63 (1.24–2.15)		
		Лог-аддитивная	1.32 (1.12–1.49)	0.045	0.081
<i>FOXO1</i> rs9549240 T>G	T	GG	1.00	0.44	0.44
		GT+TT	0.90 (0.68–1.18)		
		Доминантная			
		Лог-аддитивная	0	0.33	0.371
			0.90 (0.73–1.11)		
<i>FOXO3A</i> rs3800231 A>G	A	GG	1.00	0.19	0.28
		GA+AA	1.24 (0.90–1.71)		
		Доминантная			
		Лог-аддитивная	0	0.31	0.371
			1.12 (0.90–1.38)		
<i>FOXO3A</i> rs2253310 C>G	C	GG	1.00	0.0002	0.0009
		GC+CC	0.55 (0.40–0.76)		
		Доминантная			
		Лог-аддитивная	0.58 (0.44–0.77)	0.0001	0.0009

Примечание. N – количество индивидов, включенных в регрессионный анализ; P_{adj} – значимость для теста отношения правдоподобия лог-регрессионной модели с учетом возраста, пола, статуса и индекса курения; OR_{adj} – отношение шансов с учетом всех факторов; 95 CI % – 95 % доверительный интервал для OR; P_{cor-FDR} – значимость теста после коррекции.

способность дискриминировать больных с ХОБЛ и здоровых индивидов (AUC = 0.864, чувствительность – 78.3 %, специфичность – 82.3 %) (см. рисунок, а).

Значимая многофакторная регрессионная модель развития фенотипа ХОБЛ с частыми обострениями включала генотип AG локуса *FOXO1* (rs12585277), индекс курения и возраст, характеризовалась высокой способностью дискриминировать больных и здоровых индивидов (AUC = 0.897, P = 4.1 × 10⁻⁸⁶). Однако чувствительность – показатель, характеризующий способность модели верно классифицированных больных с данным фенотипом

ХОБЛ от здоровых индивидов, была всего 69.6 %; в то же время модель точно классифицировала здоровых индивидов, так как имела высокую специфичность (90.9 %) (см. рисунок, б).

Многофакторная регрессионная модель для фенотипа ХОБЛ с редкими обострениями включала аллель С локуса *FOXO3A* (rs2253310), индекс курения и возраст (P = 1.4 × 10⁻⁴⁸). ROC-анализ полученной модели показал ее умеренную дискриминационную способность (AUC = 0.823), низкую чувствительность (54.5 %), но высокую специфичность (91.7 %) (см. рисунок, в).

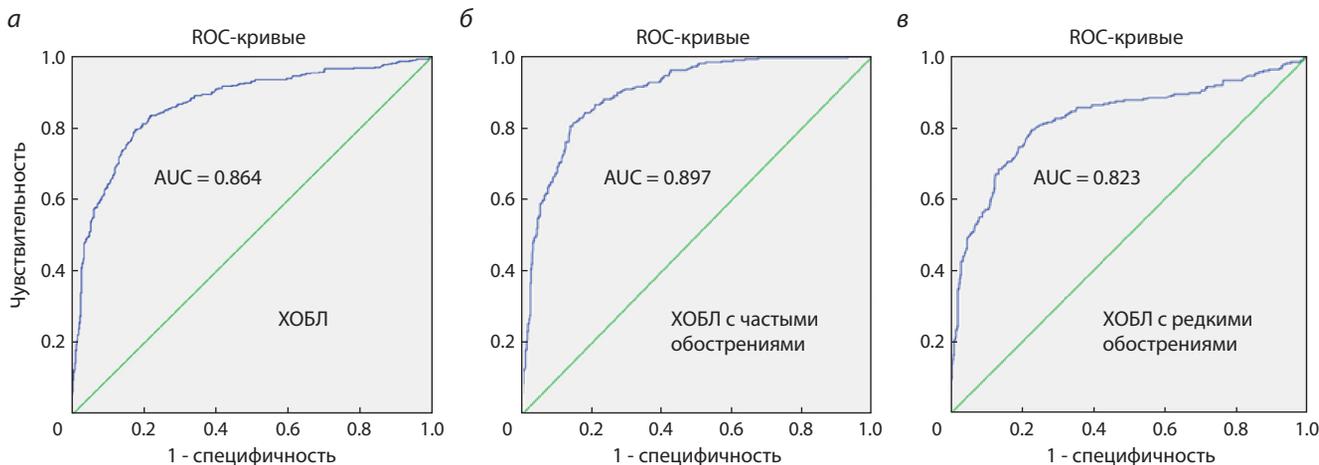


График площади под кривой (ROC-кривая) для оценки эффективности прогностических регрессионных моделей развития ХОБЛ (а), фенотипа ХОБЛ с частыми обострениями (б), фенотипа ХОБЛ с редкими обострениями (в), включающих значимые клинично-демографические и генетические предикторы.

AUC – площадь под кривой. Полные характеристики моделей представлены в табл. 3.

Таблица 3. Результаты множественного регрессионного анализа

Независимая переменная	β	$P_{\text{вальд}}$	OR	95 % CI _{OR}
ХОБЛ				
Индекс курения	0.04	4×10^{-20}	1.04	1.03–1.05
Возраст	0.08	1.55×10^{-31}	1.08	1.07–1.1
<i>FOXO1</i> (rs12585277) AG	0.33	0.0415	1.39	1.01–1.91
<i>FOXO3A</i> (rs2253310) C	-0.46	0.0037	0.62	0.46–0.86
Константа	-5.66	9.4×10^{-41}	0.003	
$\chi^2 = 435.74, P = 5.25 \times 10^{-93}$ AUC = 0.864 (чувствительность – 78.3 %, специфичность – 82.3 %, $R^2 = 0.483$)				
ХОБЛ с частыми обострениями				
Индекс курения	0.050	1.96×10^{-18}	1.05	1.04–1.06
Возраст	0.115	2.46×10^{-30}	1.12	1.1–1.14
<i>FOXO1</i> (rs12585277) AG	0.530	0.0123	1.7	1.12–2.57
Константа	-8.756889	6.5×10^{-42}	0.0002	
$\chi^2 = 398.76, P = 4.1 \times 10^{-86}$ AUC = 0.897 (чувствительность – 69.6 %, специфичность – 90.9 %, $R^2 = 0.57$)				
ХОБЛ с редкими обострениями				
Индекс курения	0.035	8.4×10^{-14}	1.04	1.03–1.05
Возраст	0.064	5.7×10^{-15}	1.07	1.05–1.08
<i>FOXO3A</i> (rs2253310) C	-0.469	0.0168	0.63	0.43–0.92
Константа	-4.992	4.7×10^{-26}	0.01	
$\chi^2 = 225.29, P = 1.4 \times 10^{-48}$ AUC = 0.823 (чувствительность – 54.5 %, специфичность – 91.7 %, $R^2 = 0.384$)				

Примечание. β – бета коэффициент для независимой переменной в уравнении регрессии; $P_{\text{вальд}}$ – уровень значимости для статистики Вальда (статистика Вальда – это коэффициент регрессии, деленный на квадрат стандартной ошибки: β/SE^2), указывает на значимость независимой переменной; OR – отношение шансов, представляет экспоненту бета коэффициента ($\exp(\beta)$) для независимой переменной; 95 % CI – доверительный 95 % интервал для OR; χ^2 – значение для теста отношения правдоподобия (likelihood ratio (LR) test), необходим для проверки гипотезы о существенности построенной регрессионной модели в целом с учетом всех независимых переменных; P – значение для теста отношения правдоподобия; R^2 – Нагелькерке R^2 (Nagelkerke R^2) показатель качества модели – отражает долю варируемости признака; константа – для уравнения регрессии, значение зависимой переменной, при котором независимая переменная равна нулю; AUC – площадь под ROC-кривой; чувствительность – доля верно классифицированных больных с данным диагнозом; специфичность – доля верно классифицированных здоровых. ROC-кривые представлены на рисунке.

Обсуждение

Установлена ассоциация локуса rs12585277 гена *FOXO1* с ХОБЛ и фенотипом ХОБЛ с частыми обострениями; гаплотип А-Г по локусам rs12585277 и rs9549240 гена *FOXO1* с более высокой частотой встречался в общей группе больных ХОБЛ и среди больных с фенотипом с частыми обострениями. Генотип АГ локуса rs12585277 гена *FOXO1* является составной частью многофакторной регрессионной модели развития ХОБЛ и фенотипа с частыми обострениями, наряду с такими предикторами, как возраст и индекс курения. Обнаружено снижение показателей функции легочного дыхания, характеризующих степень обструкции дыхательных путей: ФЖЕЛ у носителей гомозиготного и гетерозиготного генотипа по редкому аллелю А локуса rs12585277 и ЖЕЛ у носителей генотипа GG локуса rs9549240 гена *FOXO1*. Установлена вариабельность показателя индекса курения в зависимости от генотипов локуса rs9549240 гена *FOXO1*.

Ген *FOXO1* локализован на хромосоме 13q14.11 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2308>). Ранее была показана ассоциация ряда полиморфных локусов гена *FOXO1* с развитием сахарного диабета 2-го типа и ожирения (Hussain et al., 2022; Santana et al., 2024). Исследований по ассоциации полиморфных вариантов гена *FOXO1* с ХОБЛ не проводилось. Т. Хуе с коллегами (2024) выявили повышение уровня мРНК и белка FOXO1 в легочной ткани мышей с моделью эмфиземы легких. С другой стороны, показано, что экспрессия FOXO1 снижена в крови пациентов с ХОБЛ (Zhu et al., 2020).

Наиболее значимые ассоциации с ХОБЛ получены с локусом rs2253310 гена *FOXO3A*; аллель G и генотип GG чаще встречались в группе больных. Данная ассоциация сохраняла свою значимость независимо от фенотипа заболевания. Генотип GG ассоциировал с увеличением количественного показателя, характеризующего стаж и интенсивность курения, – индексом курения, среди всех курильщиков. Увеличение индекса курения – значимый фактор риска развития ХОБЛ, полученные результаты могут быть связаны с большей долей индивидов с высоким индексом курения (более 40 пачек/лет) среди больных ХОБЛ, имеющих частый гомозиготный генотип GG по локусу rs2253310 гена *FOXO3A*. По результатам множественного регрессионного анализа, локус rs2253310 – один из значимых факторов развития ХОБЛ в целом наряду с такими показателями, как локус rs12585277 гена *FOXO1*, возраст и индекс курения.

Ген *FOXO3A* локализован на хромосоме 6q21 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2309>). Была показана ассоциация полиморфных вариантов гена *FOXO3A* с продолжительностью жизни (Soerensen et al., 2015) и рядом возраст-ассоциированных заболеваний (Klinpuatan et al., 2022; Cao et al., 2023). Исследований по ассоциации полиморфных локусов гена *FOXO3A* с ХОБЛ ранее не проводилось.

Для ХОБЛ свойственно развитие системных эффектов, обуславливающих развитие тяжелых осложнений, дополнительно отягчающих течение болезни у отдельных пациентов (Agustí et al., 2023). В связи с изменением стратегии по диагностике и профилактике ХОБЛ (<http://goldcopd.org>) большое внимание исследователей в настоящее время

уделяется идентификации маркеров различных фенотипов заболевания и эффективному выявлению пациентов с частыми обострениями, так как для данной категории больных ХОБЛ характерны резкое прогрессирование обструкции дыхательных путей и повышение смертности (Geerdink et al., 2016). Нами показано, что гетерозиготный генотип АГ локуса *FOXO1* (rs12585277) и генотип GG локуса *FOXO3A* (rs2253310) встречались значимо чаще в группе больных ХОБЛ с частыми обострениями. Многофакторный регрессионный анализ продемонстрировал, что наиболее высокие оценки эффективности регрессионной модели, включающие показатели AUC и R^2 , по дискриминации больных ХОБЛ от здоровых индивидов имеет модель для ХОБЛ с частыми обострениями, что, вероятно, может быть объяснено большей гомогенностью этой группы. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что наиболее информативный генетический маркер развития фенотипа ХОБЛ с частыми обострениями среди тех, что показали ассоциацию, – генотип АГ локуса *FOXO1* (rs12585277).

Исследований по ассоциации полиморфных локусов генов *FOXO1* и *FOXO3A* с ХОБЛ или фенотипами заболевания ранее не проводилось, нами впервые изучен вклад генов, кодирующих транскрипционные факторы FOXO, в развитие заболевания. Интерес к ним обусловлен тем, что FOXO регулируют экспрессию белков, связанных с аутофагией, окислительным стрессом и клеточным метаболизмом (Hagenbuchner, Ausserlechner, 2013; Gui, Burgering, 2022).

Показано, что активация FOXO1 подавляет индуцированный окислительным стрессом апоптоз эпителиальных клеток в модели бронхолегочной дисплазии (Zang et al., 2023). FOXO1 стимулирует экспрессию кислород-регулируемого белка с молекулярной массой 150 кДа (oxygen-regulated protein, ORP150) и таким образом обеспечивает защиту эпителиальных клеток дыхательных путей от стресса эндоплазматического ретикулума, опосредованного воздействием сигаретного дыма (Liu et al., 2018). Ингибирование FOXO1 стимулирует сопряженные процессы аутофагии и стресса эндоплазматического ретикулума (Guo et al., 2022) и индуцирует фенотипическую конверсию легочных макрофагов, что способствует воспалению и ремоделированию дыхательных путей (Chung et al., 2019).

Выявлено, что активность FOXO3 подавляет клеточное старение и патологическое ремоделирование дыхательных путей, вызванные воздействием сигаретного дыма (Yao et al., 2012), с другой стороны, ингибирование экспрессии FOXO3 способствует накоплению NF-κB в ядре и стимулирует его провоспалительную транскрипционную активность (Di Vincenzo et al., 2018). Все эти процессы – важные патогенетические механизмы, приводящие к развитию ХОБЛ. Окислительный стресс, вызванный сигаретным дымом, стимулирует транскрипционную активность FOXO3, который активирует экспрессию FOXO1 и стимулирует его связывание с промоторами генов белков аутофагии (*ATG5*, *ATG12*, *ATG16*), белка беклина 1 (*BECLIN1*) и гена легкой цепи 3 альфа белка 1, ассоциированного с микротрубочками (*LC3*) (Bagam et al., 2021). Антиоксидантная функция FOXO3 обусловлена увеличением экс-

прессии генов *SOD2*, *CAT* и *GPX1*, играющих ключевую роль в регуляции гомеостаза АФК в клетках легких в ответ на окислительный стресс (Mahlooji et al., 2022).

Н. Jiang с коллегами (2023) установили, что активация FOXO3A при воздействии стрессовых факторов приводит к адаптации клеток и уменьшению уровня клеточного старения, в то время как подавление активности FOXO3A связано с большим повреждением митохондрий в клетках легочного эпителия. Недостаточный уровень FOXO3, который в том числе может быть связан с функциональными полиморфными вариантами, приводит к подавлению экспрессии генов антиоксидантов, в результате чего развивается окислительный стресс в ответ на воздействие сигаретного дыма (Hwang et al., 2011).

Таким образом, транскрипционные факторы FOXO играют ключевую роль в нормальном функционировании митохондрий, предотвращают развитие окислительного стресса и тем самым препятствуют развитию клеточного старения эпителия легких (Chen et al., 2021) – процесса, являющегося важным патогенетическим механизмом развития хронической обструктивной болезни легких.

Заклучение

Впервые показаны значимые ассоциации полиморфных локусов генов *FOXO1* (rs12585277) и *FOXO3A* (rs2253310) с ХОБЛ и фенотипами заболевания. Связанные с аутофагией, окислительным стрессом и клеточным гомеостазом транскрипционные факторы семейства FOXO как потенциальные биомаркеры и мишени для терапии могут стать основой для разработки новой стратегии диагностики и лечения хронической обструктивной болезни легких.

Список литературы / References

Корытина Г.Ф., Ахмадишина Л.З., Кочетова О.В., Азнабаева Ю.Г., Измайлова С.М., Загидуллин Ш.З., Викторова Т.В. Исследования ассоциации полиморфных вариантов генов С-реактивного белка (*CRP*), рецептора *CD14*, провоспалительных цитокинов и их рецепторов (*TNFA*, *LTA*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF1B*, *IL1B*, *IL6*) с развитием хронической обструктивной болезни легких. *Генетика*. 2020;56(8):953-963. doi 10.31857/S0016675820080081 [Korytina G.F., Akhmadishina L.Z., Kochetova O.V., Aznabaeva Y.G., Izmailova S.M., Zagidullin S.Z., Victorova T.V. Association of *CRP*, *CD14*, pro-inflammatory cytokines and their receptors (*TNFA*, *LTA*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF1B*, *IL1B*, and *IL6*) genes with chronic obstructive pulmonary disease development. *Russ J Genet*. 2020;56:972-981. doi 10.1134/S1022795420080086]

Корытина Г.Ф., Ахмадишина Л.З., Маркелов В.А., Азнабаева Ю.Г., Кочетова О.В., Насибуллин Т.Р., Ларкина А.П., Хуснутдинова Н.Н., Загидуллин Н.Ш., Т.В. Роль генов PI3K/AKT/mTOR-сигнального каскада и сиртуинов в развитии хронической обструктивной болезни легких. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(5):512-521. doi 10.18699/VJGB-23-62 [Korytina G.F., Akhmadishina L.Z., Markelov V.A., Aznabaeva Y.G., Kochetova O.V., Nasibullin T.R., Larkina A.P., Khusnutdinova N.N., Zagidullin N.S., Victorova T.V. Role of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and sirtuin genes in chronic obstructive pulmonary disease development. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov J Genet Breed*. 2023;27(5):512-521. doi 10.18699/VJGB-23-62].

Agustí A., Celli B.R., Criner G.J., Halpin D., Anzueto A., Barnes P., Bourbeau J. Global initiative for chronic obstructive lung disease 2023 report: GOLD executive summary. *Eur Respir J*. 2023;61(4):230-239. doi 10.1183/13993003.00239-2023

Bagam P., Kaur G., Singh D.P., Batra S. In vitro study of the role of FOXO transcription factors in regulating cigarette smoke extract-

induced autophagy. *Cell Biol Toxicol*. 2021;37(4):531-553. doi 10.1007/s10565-020-09556-y

Brandsma C.A., Van den Berge M., Hackett T.L., Brusselle G., Timens W. Recent advances in chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis: from disease mechanisms to precision medicine. *J Pathol*. 2020;250(5):624-635. doi 10.1002/path.5364

Cao G., Lin M., Gu W., Su Z., Duan Y., Song W., Liu H., Zhang F. The rules and regulatory mechanisms of FOXO3 on inflammation, metabolism, cell death and aging in hosts. *Life Sci*. 2023;328:121877. doi 10.1016/j.lfs.2023.121877

Chen J.X., Yang L., Sun L., Chen W., Wu J., Zhang C.F., Liu K.Y., Bai L., Lu H.G., Gao T., Tian H., Jiang S.L. Sirtuin 3 ameliorates lung senescence and improves type II alveolar epithelial cell function by enhancing the FoxO3a-dependent antioxidant defense mechanism. *Stem Cells Dev*. 2021;30(17):843-855. doi 10.1089/scd.2021.0099

Chung S., Kim J.Y., Song M.A., Park G.Y., Lee Y.G., Karpurapu M., Englert J.A., Ballinger M.N., Pabla N., Chung H.Y., Christman J.W. FoxO1 is a critical regulator of M2-like macrophage activation in allergic asthma. *Allergy*. 2019;74(3):535-548. doi 10.1111/all.13626

Di Vincenzo S., Heijink I.H., Noordhoek J.A., Cipollina C., Siena L., Bruno A., Ferraro M., Postma D.S., Gjomarkaj M., Pace E. SIRT1/FoxO3 axis alteration leads to aberrant immune responses in bronchial epithelial cells. *J Cell Mol Med*. 2018;22(4):2272-2282. doi 10.1111/jcmm.13509

Domej W., Oetl K., Renner W. Oxidative stress and free radicals in COPD – implications and relevance for treatment. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014;9:1207-1224. doi 10.2147/COPD.S51226

Farhan M., Silva M., Xingan X., Huang Y., Zheng W. Role of FOXO transcription factors in cancer metabolism and angiogenesis. *Cells*. 2020;9(7):1586. doi 10.3390/cells9071586

Geerdink J.X., Simons S.O., Pike R., Stauss H.J., Heijdra Y.F., Hurst J.R. Differences in systemic adaptive immunity contribute to the 'frequent exacerbator' COPD phenotype. *Respir Res*. 2016;17(1):140. doi 10.1186/s12931-016-0456-y

González J.R., Armengol L., Solé X., Guinó E., Mercader J.M., Estivill X., Moreno V. SNPassoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics*. 2007;23(5):644-645. doi 10.1093/bioinformatics/btm025

Gui T., Burgering B.M.T. FOXOs: masters of the equilibrium. *FEBS J*. 2022;289(24):7918-7939. doi 10.1111/febs.16221

Guo J., Nie J., Chen Z., Wang X., Hu H., Xu J., Lu J., Ma L., Ji H., Yuan J., Xu B. Cold exposure-induced endoplasmic reticulum stress regulates autophagy through the SIRT2/FoxO1 signaling pathway. *J Cell Physiol*. 2022;237(10):3960-3970. doi 10.1002/jcp.30856

Hagenbuchner J., Ausserlechner M.J. Mitochondria and FOXO3: breath or die. *Front Physiol*. 2013;4:147. doi 10.3389/fphys.2013.00147

Hussain S., Yadav S.S., Dwivedi P., Banerjee M., Usman K., Nath R., Khattri S. SNPs of *FOXO1* and their interactions contributes to the enhanced risk of diabetes among elderly individuals. *DNA Cell Biol*. 2022;41(4):381-389. doi 10.1089/dna.2021.1139

Hwang J.W., Rajendrasozhan S., Yao H., Chung S., Sundar I.K., Huyck H.L., Pryhuber G.S., Kinnula V.L., Rahman I. FOXO3 deficiency leads to increased susceptibility to cigarette smoke-induced inflammation, airspace enlargement, and chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol*. 2011;187(2):987-998. doi 10.4049/jimmunol.1001861

Jiang H., Xu Y., Jiang Y., Li Y. FOXO3 activation prevents cellular senescence in emphysema induced by cigarette smoke. *COPD*. 2023;20(1):80-91. doi 10.1080/15412555.2022.2164262

Klinpudtan N., Allsopp R.C., Kabayama M., Godai K., Gondo Y., Masui Y., Akagi Y. The association between longevity-associated FOXO3 allele and heart disease in septuagenarians and octogenarians: the SONIC study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2022;77(8):1542-1548. doi 10.1093/gerona/glab204

Korytina G.F., Akhmadishina L.Z., Aznabaeva Y.G., Kochetova O.V., Zagidullin N.S., Kzhyshkowska J.G., Zagidullin S.Z., Viktorova T.V. Associations of the NRF2/KEAP1 pathway and antioxidant

- defense gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease. *Gene*. 2019;692:102-112. doi 10.1016/j.gene.2018.12.061
- Li Y., Tian X., Luo J., Bao T., Wang S., Wu X. Molecular mechanisms of aging and anti-aging strategies. *Cell Commun Signal*. 2024;22(1):285. doi 10.1186/s12964-024-01663-1
- Liu J.Q., Zhang L., Yao J., Yao S., Yuan T. AMPK alleviates endoplasmic reticulum stress by inducing the ER-chaperone ORP150 via FOXO1 to protect human bronchial cells from apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;497(2):564-570. doi 10.1016/j.bbrc.2018.02.095
- Luo X., Zeng W., Tang J., Liu W., Yang J., Chen H., Jiang L., Zhou X., Huang J., Zhang S., Du L., Shen X., Chi H., Wang H. Multi-modal transcriptomic analysis reveals metabolic dysregulation and immune responses in chronic obstructive pulmonary disease. *Sci Rep*. 2024;14(1):22699. doi 10.1038/s41598-024-71773-w
- Mahlooji M.A., Heshmati A., Kheiripour N., Ghasemi H., Asl S.S., Solgi G., Ranjbar A., Hosseini A. Evaluation of protective effects of curcumin and nanocurcumin on aluminium phosphide-induced subacute lung injury in rats: modulation of oxidative stress through SIRT1/FOXO3 signalling pathway. *Drug Res (Stuttg)*. 2022;72(2):100-108. doi 10.1055/a-1647-2418
- Santana C.V.N., Magno L.A.V., Ramos A.V., Rios M.A., Sandrim V.C., De Marco L.A., de Miranda D.M., Romano-Silva M.A. Genetic variations in *AMPK*, *FOXO3A*, and *POMC* increase the risk of extreme obesity. *J Obes*. 2024;2024:3813621. doi 10.1155/2024/3813621
- Santos B.F., Grenho I., Martel P.J., Ferreira B.I., Link W. FOXO family isoforms. *Cell Death Dis*. 2023;14(10):702. doi 10.1038/s41419-023-06177-1. Erratum in: *Cell Death Dis*. 2023;14(12):797. doi 10.1038/s41419-023-06328-4
- Soerensen M., Nygaard M., Dato S., Stevnsner T., Bohr V.A., Christensen K., Christiansen L. Association study of FOXO3A SNPs and aging phenotypes in Danish oldest-old individuals. *Aging Cell*. 2015;14(1):60-66. doi 10.1111/accel.12295
- Ward L.D., Kellis M. HaploReg v4: systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D877-D881. doi 10.1093/nar/gkv1340
- Xue T., Dong F., Gao J., Zhong X. Identification of related-genes of T cells in lung tissue of chronic obstructive pulmonary disease based on bioinformatics and experimental validation. *Sci Rep*. 2024;14(1):12042. doi 10.1038/s41598-024-62758-w
- Yao H., Chung S., Hwang J.W., Rajendrasozhan S., Sundar I.K., Dean D.A., McBurney M.W., Guarente L., Gu W., Rönty M., Kinnula V.L., Rahman I. SIRT1 protects against emphysema via FOXO3-mediated reduction of premature senescence in mice. *J Clin Invest*. 2012;122(6):2032-2045. doi 10.1172/JCI60132
- Zang L., Chi J., Bi S., Tao Y., Wang R., Li L. SIRT3 improves alveolar epithelial cell damage caused by bronchopulmonary dysplasia through deacetylation of FOXO1. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2023;51(2):191-204. doi 10.15586/aei.v51i2.710
- Zhu M., Ye M., Wang J., Ye L., Jin M. Construction of potential miRNA-mRNA regulatory network in COPD plasma by bioinformatics analysis. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2020;15:2135-2145. doi 10.2147/COPD.S255262

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 09.02.2025. После доработки 24.03.2025. Принята к публикации 18.04.2025.

doi 10.18699/vjgb-25-91

Using polygenic scores to assess liability to antisocial behavior

A.V. Kazantseva , D.V. Yakovleva ^{1,2}, Yu.D. Davydova ¹, E.K. Khusnutdinova ¹

¹ Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

² Ufa University of Science and Technology, Ufa, Russia

 Kazantsa@mail.ru

Abstract. To date, several genome-wide association studies (GWAS) of antisocial behavior (ASB) have been conducted in Europeans, which promoted research aimed at evaluating liability to ASB-related phenotypes in independent samples. Such studies implemented a polygenic score (PGS) approach, which represents a composite score considering a number of “risky” alleles. Since no GWAS of ASB has been conducted in Russians, the present study aimed to perform a replication study of liability to severe criminal behavior (homicide) in individuals from Russia using PGS. Moreover, we sought to obtain the best model considering PGS and potential social factors as predictors. Genotyping of the “top” ten SNPs previously identified in GWAS meta-analysis of ASB (*CADM2*, *REV3L*, *FOXP1*, *FOXP2*, *BDNF*, *FURIN*, *XKR6*, *TMEM18*, *SORCS3*, and *ZIC4* genes) was conducted via real-time PCR in 227 homicide offenders and 254 healthy donors from the Volga-Ural region of Russia. Multiple regression models included “weighted” and “unweighted” PGS and potential social factors as predictors. The best regression model of liability to severe ASB was based on genetic effects of examined SNPs and social predictors, including traumatic brain injury, severe chronic disease, and tobacco smoking, which was more pronounced among subjects with a family history of mental illness ($p = 2 \times 10^{-13}$). PGS alone explained a small proportion of variance in liability to ASB (1.1–1.5 %), while the inclusion of social parameters increased variance explained (16.2–21.2 %). Revealed findings evidence a higher impact of social factors than a composite effect of selected “top” SNPs in predicting liability to ASB in the examined cohort. A higher probability of ASB was linked to comorbid substance abuse, traumatic brain injury, and family history of mental illness, which may also represent a result of a “risky” genetic profile.

Key words: aggression; homicide; G × E interaction; polygenic score; regression model; ROC-analysis; social factors

For citation: Kazantseva A.V., Yakovleva D.V., Davydova Yu.D., Khusnutdinova E.K. Using polygenic scores to assess liability to antisocial behavior. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(6):838-846. doi 10.18699/vjgb-25-91

Funding. The study was supported by the State Contract of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (No. 1022040500074-9).

Использование полигенных показателей для оценки предрасположенности к манифестации антисоциального поведения

А.В. Казанцева , Д.В. Яковлева ^{1,2}, Ю.Д. Давыдова ¹, Э.К. Хуснутдинова ¹

¹ Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

² Уфимский университет науки и технологий, Уфа, Россия

 Kazantsa@mail.ru

Аннотация. Проведенные к настоящему времени полногеномные анализы ассоциаций (GWAS) антисоциального поведения (АП) в европейских популяциях стали предпосылкой для дальнейших исследований по оценке предрасположенности к развитию схожих фенотипов в независимых выборках. В таких работах используются полигенные показатели, которые представляют собой обобщенный балл, учитывающий число «рисковых» аллелей по каждому включенному генетическому локусу. Поскольку в РФ не было проведено GWAS АП, цель настоящего исследования – проведение репликативного исследования предрасположенности к манифестации крайних форм АП (убийств) в российской когорте с использованием подсчета полигенных показателей. Кроме того, задачей было также выявление наилучшей модели, основанной на включении полигенного показателя и социальных факторов в качестве предикторов. Генотипирование 10 «топовых» SNP, идентифицированных ранее в метаанализе GWAS АП (в генах *CADM2*, *REV3L*, *FOXP1*, *FOXP2*, *BDNF*, *FURIN*, *XKR6*, *TMEM18*, *SORCS3*, *ZIC4*), проведено с помощью ПЦР в реальном времени у лиц, совершивших убийства ($N = 227$), и в контрольной группе ($N = 254$) из Волго-Уральского региона РФ. Множественный регрессионный анализ основывался на включении «взвешенных» и «невзвешенных» полигенных показателей и потенциальных социальных факторов в качестве предикторов. Наилучшая регрессионная модель предрасположенно-

сти к манифестации крайних форм АП содержала данные генетического профиля по 10 локусам и социальным факторам (черепно-мозговая травма, тяжелые хронические заболевания в анамнезе, табакокурение) и была наиболее значимой для лиц с семейной отягощенностью психическими расстройствами ($p = 2 \times 10^{-13}$). Введение только полигенного показателя в модель объясняло небольшой процент вариации в предрасположенности к АП (1.1–1.5 %), тогда как добавление социальных предикторов увеличивало процент объясненной вариации (16.2–21.2 %). Полученные результаты указывают на большую значимость социальных факторов по сравнению с кумулятивным эффектом 10 локусов в предикции развития АП в исследуемой выборке. Повышенная вероятность его манифестации связана с наличием коморбидного аддиктивного поведения, черепно-мозговой травмы и семейной отягощенности психопатологиями, что может быть результатом наличия «рискового» генетического профиля.

Ключевые слова: агрессия; убийство; ген-средовые взаимодействия; полигенная оценка; регрессионная модель; ROC-анализ; социальные факторы

Introduction

Aggressive behavior (AB) and antisocial behavior (ASB) represent a destructive form of social interaction aimed at causing damage to another object and resulting in its frustration. From the evolutionary point of view, enhanced aggression was required for the survival of human groups (Baron, Richardson, 2004), thus promoting certain biological benefits. Although it is suggested that the aggression level in modern society is decreased compared with early humans, it still remains significant. To be more precise, the level of severe crimes, including homicides and intentional inflictions of severe harm, accounted for 117.3 and 567.1 thousand cases in 2022 in Russia (according to the data from the Ministry of Internal Affairs of the Russian Federation, <http://www.crimestat.ru>). According to the data from the World Health Organization (<https://www.who.int/data>), the homicide rate remains significant worldwide and was estimated at 5.8 cases per 100,000 of population in 2021 in the United States (in comparison, 6.7 cases in Russia; 0.5–4.5 cases in Europe; 5–100 cases in South American countries, and 5–20 cases in Africa).

In turn, during past years, several specifically cruel cases of murder, domestic violence, and antisocial behavior at schools have shocked Russia and the neighboring countries. However, it remains impossible to predict the occurrence of severe cruelty before the crimes have been conducted. In this regard, it seems important to determine significant factors underlying ASB, which can help to predict a higher probability of manifesting cruelty and antisocial behavior. It should be noted that ASB usually manifests in the form of certain psychiatric diseases, including oppositional defiant disorder, conduct disorder, and antisocial personality disorder (Pezzoli et al., 2025). Therefore, these phenotypes can share etiology and underlying factors.

According to previous research, the main factors predisposing to ASB or related phenotypes include biological, psychological, and environmental ones (Fritz et al., 2023). Examination of biological factors, which contribute 50 to 80 % of variance in aggression (Manchia, Fanos, 2017; Odintsova et al., 2023), is mainly focused on the analysis of genetic and epigenetic effects. Logically, genetic variants (SNPs) in the genes attributed to neurotransmitter release, reuptake, and binding (Davydova et al., 2020a; Antón-Galindo et al., 2023), oxytocin and arginine vasopressin signaling (Davydova et al., 2020b; Kazantseva et al., 2021), and others (Pezzoli et al., 2025) have been tested for their relation to individual variance in aggressive behavior. However, the results of multiple studies demonstrate inconsistent findings. Another methodological

approach, i. e., genome-wide association studies (GWAS), enables to identify associated SNPs under a hypothesis-free paradigm. Although to date several GWASs of antisocial behavior have been carried out, these studies differ in the examined phenotypes frequently linked with ASB (combined phenotype of externalizing behavior (Karlsson Linnér et al., 2021), impulsivity (Deng et al., 2023), problems with self-regulation (Heilbronner et al., 2021), irritability (Mbatchou et al., 2021), risky behavior (Karlsson Linnér et al., 2019)) or age groups (children (Pappa et al., 2016), adults (Tielbeek et al., 2017)). Moreover, summarized findings from ~ 1.5 million subjects identified more than 500 SNPs related to liability to externalizing behavior, including antisocial behavior, attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD), and addiction in a European cohort (Karlsson Linnér et al., 2021).

One of the possible applications of GWAS findings is to use them for the calculation of polygenic scores (PGS) on the basis of effect estimates obtained for each SNP in the training sample. In turn, inclusion of PGS in mathematical models can gain prediction of enhanced risk of certain complex phenotypes. To date, several attempts seeking to replicate GWAS findings in an independent sample using PGS from ASB phenotype have been made (Karlsson Linnér et al., 2021; Li et al., 2023; Tesli et al., 2024; Acland et al., 2025), which succeeded in determining some proportion of variance in liability to conduct disorder, substance use disorders, smoking, ADHD, criminal behavior, depression, posttraumatic stress disorder, unemployment, and suicidal attempts. One of the possible limitations of using PGS for predicting ASB is the ethnic origin of the examined population, since differences in allele and genotype frequencies between ethnic groups can change SNPs' effect (Kazantseva et al., 2016). To date, no GWAS of liability to homicidal conduct has been carried out in subjects from Russia. Therefore, it is relevant to check if it is applicable to use the effect estimates obtained from combined ASB phenotype and different ethnic groups to predict the probability of conducting severe ASB in the Russian cohort.

Undoubtedly, specific environmental/social factors acting at various stages of ontogenesis affect genes' activity via epigenetic changes in regulation of genes responsible for manifesting aggression (Borinskaya et al., 2021). In this context, the analysis of potential social factors together with genetic effects (PGS) can help to increase the prognostic significance of the final model. In addition, it is established that ASB is highly accumulated in certain groups, including subjects with comorbid mental disorders (Ip et al., 2021; Wang et al., 2024; Pezzoli et al., 2025), family history of mental illness

(Han et al., 2024), addiction (Karlsson Linnér et al., 2021; Antón-Galindo et al., 2023), and unfavorable rearing conditions (Burt, 2022).

Considering the existing findings of ASB meta-analysis of European populations (Karlsson Linnér et al., 2021) and absent GWAS data for individuals from Russia, the present study aimed to evaluate the applicability of calculated polygenic scores based on existing GWAS data to predict severe ASB (homicide) in the Russian cohort. Moreover, to enhance the prognostic ability of regression models, we sought to obtain the best model with the optimal sensitivity and specificity, which assumes PGS and potential social factors as predictors.

Materials and methods

The study sample comprised 227 criminal offenders who conducted homicide and were directed to a forensic examination of present mental disorders in the Republican Clinical Psychiatric Hospital (Ufa, Russia). Only individuals without mental illness who were proven to be sane by the Court were included in the study. The examined sample consisted mainly of men (93 %) with a mean age of 41.5 ± 14.5 years. Ethnic content of the sample was the following: 48 % Russians, 34.8 % Tatars, and 17.2 % Bashkirs. The data on the social/clinical background of enrolled subjects were obtained via a survey and included the information on present and past tobacco smoking, alcohol/opiate abuse, family history of mental illness or criminal behavior, suicidal attempts, level of education, maltreatment in childhood, severe chronic disease in anamnesis, and type of ASB (proactive or reactive aggression).

The control group was selected on the basis of correspondence to the group of criminal offenders by age, ethnicity, and gender. In total, we examined DNA samples obtained from 254 individuals who reported no family history of mental illness and were non-registered in the psychiatric database of the Republic of Bashkortostan. The study was approved by the local bioethical committee at the Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences (Ufa, Russia) (protocol code 15, date of approval, October 12, 2017) in accordance

with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

SNP selection for PGS calculation from GWAS meta-analysis of ASB (Karlsson Linnér et al., 2021) was based on the following criteria: the lowest level of significance ($p < 10^{-18}$); selection of a single SNP from a set of proxy SNPs; minor allele frequency (MAF) above 0.05 in Europeans (based on 1000 Genomes); and known regulatory effect of the SNP based on the RDB (Regulome Database, <https://regulomedb.org/regulome-search>) and CADD (Combined Annotation Dependent Depletion, <https://cadd.gs.washington.edu>) databases. The final list of selected SNPs included *CADM2* rs993137, *REV3L* rs458806, *FOXP1* rs11720703, *FOXP2* rs1476535, *BDNF* rs6265, *FURIN* rs4702, *XKR6* rs4240671, *TMEM18* rs6711254, *SORCS3* rs11596214, and *ZIC4* rs2279829, which were used for PGS calculation, and is reported in Table 1. Genotyping of previously extracted DNA of the control group and criminal offenders was carried out using real-time PCR with KASP chemistry (LGC Genomics, UK).

All examined SNPs corresponded to the Hardy–Weinberg equilibrium ($p > 0.05$). At the second stage, we calculated PGS based on effect estimates obtained from R. Karlsson Linnér et al. (2021). Namely, PGS for each individual from our sample was calculated on the basis of inclusion of 1) SNPs under $p < 0.1$ (“weighted” effect), 2) all SNPs (using “weighted” effect), 3) all SNPs (using “unweighted” effect). Calculation of “weighted” and “unweighted” PGS was previously explained in detail (Kazantseva et al., 2023a). Briefly, individual PGS was calculated as the weighted/unweighted sum of the number of effect alleles at a certain SNP multiplied by the effect estimate (PLINK v.1.09).

Subsequently, a series of multiple logistic regressions was performed to obtain models that can predict liability to ASB in the total groups of homicide offenders, as well as in subgroups of subjects with proactive forms of aggression, comorbid substance use, or known family history of mental illness or criminal behavior. Initially, only PGS as a predictor was included, which was followed by a backward selection procedure to obtain a list of statistically significant social parameters to be

Table 1. Examined top SNPs linked to antisocial behavior: data from previous ASB GWAS and the VUR cohort

Gene	SNP	EA/OA	EE ^K	EAF ^K	EAF ^{ASB}	EAF ^{CT}	<i>p</i> ^K	<i>p</i> ^{VUR}
<i>CADM2</i>	rs993137	C/T	0.020	0.383	0.251	0.302	4.61×10^{-53}	0.081
<i>REV3L</i>	rs458806	C/T	0.016	0.178	0.313	0.252	1.30×10^{-29}	0.043
<i>FOXP1</i>	rs11720703	T/C	0.013	0.471	0.391	0.382	2.87×10^{-27}	0.795
<i>FOXP2</i>	rs1476535	T/C	0.013	0.451	0.459	0.445	3.41×10^{-26}	0.688
<i>BDNF</i>	rs6265	C/T	0.015	0.814	0.841	0.852	1.78×10^{-24}	0.647
<i>FURIN</i>	rs4702	G/A	0.012	0.442	0.405	0.461	1.08×10^{-23}	0.075
<i>XKR6</i>	rs4240671	G/A	0.012	0.509	0.563	0.543	4.80×10^{-23}	0.528
<i>TMEM18</i>	rs6711254	A/G	0.015	0.173	0.190	0.161	1.89×10^{-22}	0.257
<i>SORCS3</i>	rs11596214	G/A	0.011	0.606	0.593	0.533	6.25×10^{-21}	0.065
<i>ZIC4</i>	rs2279829	C/T	0.013	0.788	0.801	0.771	2.88×10^{-18}	0.247

Note. EA/OA – effect allele/other allele; EE – effect estimate; EAF – effect allele frequency; ASB – criminal offenders from VUR; CT – control group from VUR; VUR – Volga-Ural sample; K – data from R. Karlsson Linnér et al. (2021); *p* – *p*-values. *P*-values obtained in the present sample at a trend level ($p < 0.1$) are marked in bold.

included as predictors together with PGS (R v.4.4.2). To select the best predicting model, we have compared data on the lowest *p*-value, the highest proportion of variance (Nagelkerke pseudo-*R*²) explaining liability to ASB, and the highest area under the ROC curve (AUC) for each model.

Results

At the initial stage of the study, we examined the presence of significant differences between the criminal offenders and the control group in the examined social factors (Table 2). We have observed the differences in the proportion of individuals characterized by severe somatic diseases and traumatic brain injuries in anamnesis ($p = 1.2 \times 10^{-12}$), depending on education level ($p = 4.5 \times 10^{-16}$) and present smoking ($p = 4.0 \times 10^{-7}$) between the groups.

For the genetic part of the present study we selected the “top” ten SNPs ($p < 2.9 \times 10^{-18}$) identified in the previous meta-analysis GWAS of ASB (Karlsson Linnér et al., 2021). Effect estimates for alleles used for calculation of “weighted PGS” as well as effect allele frequencies in the VUR sample are given in Table 1. In addition, we have tested for statistically significant differences in allele frequencies of examined

SNPs between criminal offenders and the control group in the examined cohort from the VUR, which enabled us to confirm a coincidence of four SNPs, although at a trend level ($p < 0.1$): *CADM2* rs993137, *REV3L* rs458806, *FURIN* rs4702, and *SORCS3* rs11596214.

Primary logistic regression models that included PGS (based on four SNPs) revealed a small proportion of variance in liability to antisocial behavior in the total group ($r^2 = 0.9\%$, $p = 0.014$), among subjects with a proactive form of aggression ($r^2 = 0.9\%$, $p = 0.017$), with comorbid substance abuse ($r^2 = 0.9\%$, $p = 0.027$), and with a family history of mental illness ($r^2 = 1.5\%$, $p = 0.014$) (Table 3, Fig. 1). At the initial stage of regression analysis, we have included all social factors, including sex and ethnicity as covariates, together with PGS.

As expected, inclusion of potential social parameters as predictors enabled an increase in the statistical significance of the models, which resulted in 14.5% (ASB), 15.8% (proactive ASB), 21.0% (ASB with comorbid addiction), and 21.2% of variance (ASB with family history of mental illness) being explained. It should be mentioned that valuable social factors comprised of traumatic brain injury (TBI) or

Table 2. Characteristics of the examined groups of criminal offenders and healthy donors and analysis of differences in social factors between the groups

Social factor	Group	ASB (N = 227)		Control group (N = 254)		β	p-value
		N	%	N	%		
Sex	Men	211	92.9	235	92.5	-0.11	0.73
	Women	16	7.1	19	7.5		
Ethnicity	Russians	109	48	120	47.2	-0.003	0.99
	Tatars	79	34.8	92	36.2		
	Bashkirs	39	17.2	42	16.6		
Aggression type	Proactive	211	92.9	-	-	-	-
	Reactive	16	7.1	-	-		
Family history of mental illness	Yes	88	38.8	-	-	-	-
	No	139	61.2	254	100		
TBI/disease	Yes	136	59.9	62	24.4	1.53	1.2×10^{-12}
	No	91	40.1	192	75.6		
Education level	High	92	40.5	213	83.9	-2.0	4.5×10^{-16}
	Low	135	59.5	41	16.1		
Present smoking	Yes	160	70.4	112	44.1	1.1	4.0×10^{-7}
	No	67	29.6	142	55.9		
Past smoking	Yes	179	78.9	202	79.5	-0.05	0.84
	No	48	21.1	52	20.5		
Alcohol/opiate abuse	Yes	150	66.1	-	-	-	-
	No	77	33.9	254	100		
Maltreatment in childhood	Yes	31	13.7	24	9.4	0.36	0.73
	No	196	86.3	230	90.6		
Suicidal attempts	Yes	45	19.8	-	-	-	-
	No	182	80.2	254	100		

Note. Statistically significant differences between the groups based on *p*-value < 0.05 are shown in bold. TBI/disease – traumatic brain injury or severe chronic disease in anamnesis. Dashes indicate non-applicable data.

Table 3. Regression models of liability to ASB based on a polygenic score and social factors as predictors

Model	Predictor	ASB (N = 227)			Proactive ASB (N = 211)			Addictive ASB (N = 150)			FamPsy ASB (N = 88)		
		β	SE	p-value	β	SE	p-value	β	SE	p-value	β	SE	p-value
1	PGS_0.1	105.0	42.8	0.014	106.6	44.8	0.017	106.1	48.1	0.027	141.4	57.9	0.014
	Model p-value	0.014			0.017			0.027			0.014		
	Adjusted r ²	0.009			0.009			0.009			0.015		
	AUC	0.569			0.569			0.571			0.589		
2	PGS_0.1	84.8	55.4	0.126	86.6	57.4	0.131	98.2	63.5	0.122	148.7	75.2	0.048
	TBI/disease	1.4	0.2	9.8 × 10 ⁻⁹	1.3	0.2	1.1 × 10 ⁻⁷	1.3	0.3	5.7 × 10 ⁻⁷	1.6	0.3	1.9 × 10 ⁻⁷
	Past smoking	-1.3	0.3	8.8 × 10 ⁻⁴	-1.4	0.4	4 × 10 ⁻⁴	-1.1	0.5	0.031	-1.2	0.6	0.048
	Present smoking	1.7	0.3	1.4 × 10 ⁻⁷	1.7	0.3	4.1 × 10 ⁻⁷	2.2	0.4	4.1 × 10 ⁻⁷	1.8	0.5	4.4 × 10 ⁻⁴
	Model p-value	4.24 × 10 ⁻¹⁴			7.7 × 10 ⁻¹⁶			< 10 ⁻¹⁶			1.3 × 10 ⁻¹³		
	Adjusted r ²	0.145			0.158			0.210			0.212		
	AUC	0.752			0.744			0.788			0.780		
3	PGS_W	220.4	69.4	1.4 × 10 ⁻³	223.1	72.3	0.002	195.8	77.7	0.011	206.6	94.0	0.028
	Model p-value	1.3 × 10 ⁻³			0.002			0.011			0.028		
	Adjusted r ²	0.015			0.015			0.011			0.012		
	AUC	0.579			0.580			0.577			0.576		
4	PGS_W	193.3	92.4	0.036	191.9	95.3	0.044	178.8	104.4	0.086	245.2	125.8	0.051
	TBI/disease	1.4	0.2	1.3 × 10 ⁻⁸	1.3	0.2	1.3 × 10 ⁻⁷	1.3	0.3	5.7 × 10 ⁻⁷	1.6	0.3	2.1 × 10 ⁻⁷
	Past smoking	-1.2	0.3	1.4 × 10 ⁻³	-1.3	0.4	7.1 × 10 ⁻⁴	-1.1	0.5	0.034	-1.2	0.6	0.045
	Present smoking	1.7	0.3	2.8 × 10 ⁻⁷	1.6	0.3	9 × 10 ⁻⁷	2.2	0.4	6.9 × 10 ⁻⁷	1.8	0.5	5.3 × 10 ⁻⁴
	Model p-value	< 10 ⁻¹⁶			3.3 × 10 ⁻¹⁶			< 10 ⁻¹⁶			1.4 × 10 ⁻¹³		
	Adjusted r ²	0.170			0.162			0.211			0.212		
	AUC	0.758			0.751			0.792			0.800		
5	PGS_UW	2.9	0.9	0.002	2.9	1.0	0.003	2.5	1.1	0.019	2.6	1.3	0.045
	Model p-value	0.002			0.003			0.019			0.045		
	Adjusted r ²	0.013			0.013			0.010			0.010		
	AUC	0.588			0.589			0.584			0.584		
6	PGS_UW	2.5	1.3	0.047	2.5	1.3	0.053	2.2	1.4	0.131	3.1		0.078
	TBI/disease	1.4	0.2	1.2 × 10 ⁻⁸	1.3	0.2	1.2 × 10 ⁻⁷	1.4	0.3	5.6 × 10 ⁻⁷	1.6	0.3	2.1 × 10 ⁻⁷
	Past smoking	-1.2	0.3	0.0013	-1.3	0.4	6.5 × 10 ⁻⁴	-1.1	0.5	0.032	-1.2	0.6	0.044
	Present smoking	1.6	0.3	3.1 × 10 ⁻⁷	1.6	0.3	9.6 × 10 ⁻⁷	2.2	0.4	6.9 × 10 ⁻⁷	1.8	0.5	5.7 × 10 ⁻⁴
	Model p-value	< 10 ⁻¹⁶			3.3 × 10 ⁻¹⁶			< 10 ⁻¹⁶			2.0 × 10 ⁻¹³		
	Adjusted r ²	0.169			0.161			0.210			0.210		
	AUC	0.760			0.753			0.794			0.802		

Note. ASB – antisocial behavior; FamPsy ASB – ASB in individuals with a family history of mental illness; β – regression coefficient for each predictor in the model; SE – standard error of β ; AUC – area under curve; TBI/disease – traumatic brain injury or severe chronic disease in anamnesis. PGS_0.1 was based on effect estimates for *REV3L* rs458806, *FOXP1* rs11720703, *XKR6* rs4240671, and *SORCS3* rs11596214; PGS_W and PGS_UW were PGS based on “weighted” and “unweighted” effect estimates for ten SNPs, correspondingly.

severe chronic disease in anamnesis ($\beta = 1.4, p = 9.8 \times 10^{-9}$) and present smoking ($\beta = 1.7, p = 1.4 \times 10^{-7}$) were associated with enhanced liability to aggression, while past smoking demonstrated a positive effect on ASB decrease ($\beta = -1.3, p = 8.8 \times 10^{-4}$). The impact of other social factors together with sex and ethnicity remained insignificant after the backward selection procedure. Therefore, inclusion of the mentioned social parameters allowed us to explain up to 16.1 % of vari-

ance in developing ASB. According to determined models, we can conclude that they possess the highest prediction ability for developing ASB in individuals who have relatives with mental disorders or criminal behavior (AUC = 0.780) or have alcohol/opiate addiction (AUC = 0.788) (Table 3).

At the second stage of our analysis, we calculated PGS based on effect estimates for all examined SNPs, even if they were non-significant in the VUR sample (Table 1). Therefore,

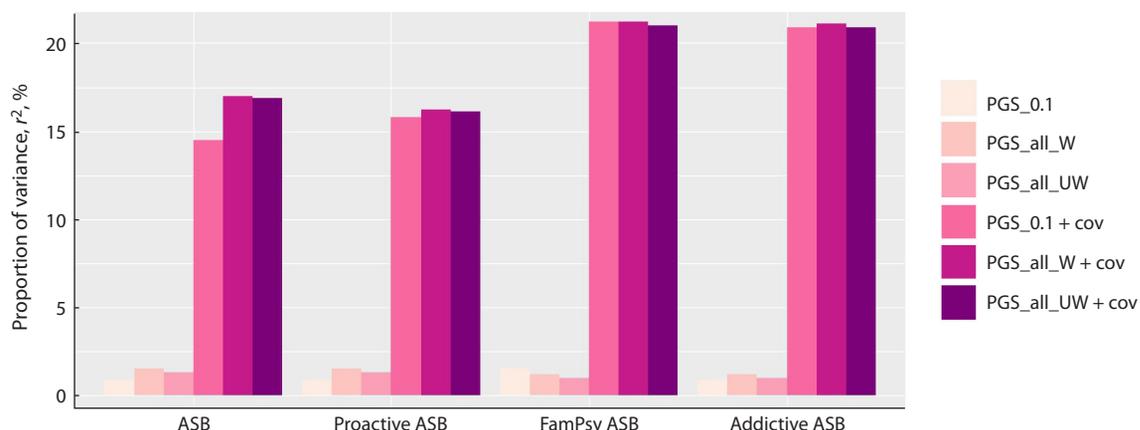


Fig. 1. Proportion of variance (adjusted r^2) in liability to antisocial behavior in the examined cohort explained by predictors included in multiple regression models based on PGS calculation of SNPs with $p < 0.1$ (PGS_0.1), “weighted effects” of all SNPs (PGS_all_W), “unweighted effects” of all SNPs (PGS_all_UW) with inclusion of social predictors (PGS_0.1 + cov, PGS_all_W + cov, PGS_all_UW + cov).

Examined groups of ASB: total group of homicide offenders (ASB); homicide offenders with a proactive type of ASB (Proactive ASB), family history of mental illness or criminal behavior (FamPsy ASB), or substance abuse (Addictive ASB).

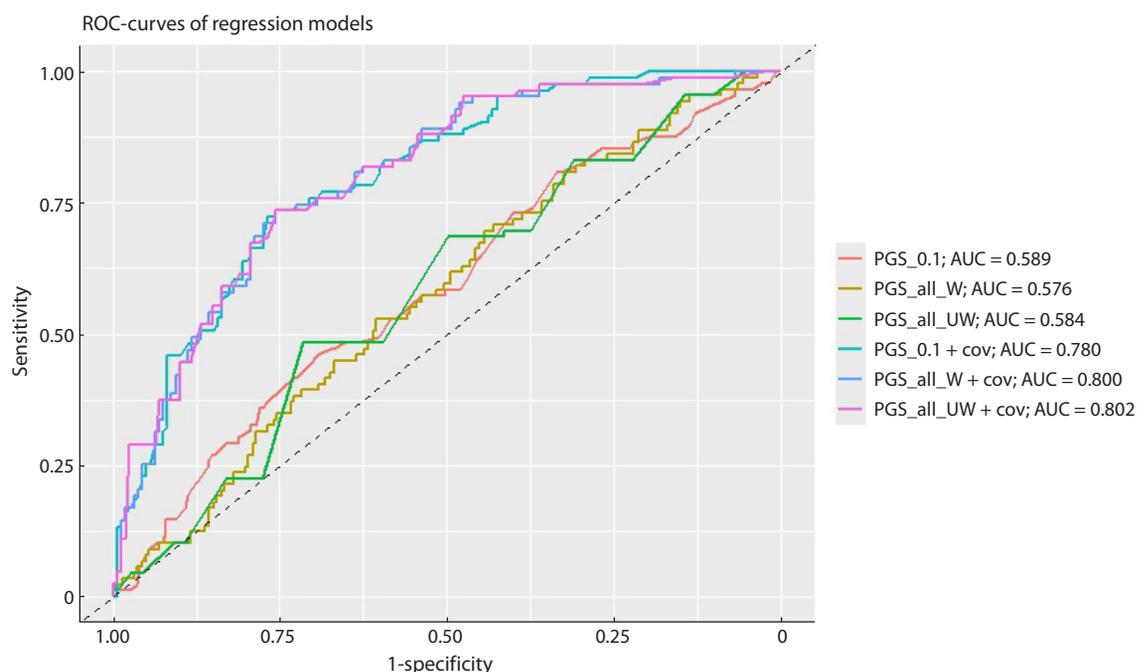


Fig. 2. ROC curves and areas under the curves (AUCs) for various regression models predicting liability to manifest ASB in individuals with a family history of mental illness or criminal behavior (abbreviations are given as in Fig. 1).

regression models, which implemented “weighted” (PGS_W) and “unweighted” (PGS_UW) PGS, slightly enhanced the proportion of variance in liability to ASB compared to previous models 1 and 2 (Table 2). Namely, a combined effect of ten genetic variants explained 1.1–1.5% (“weighted effect”) and 1.0–1.3% (“unweighted effect”) of variance in predisposition to homicide violence. Previously mentioned social predictors remained significant and, together with PGS, enabled to enhance the proportion of variance explained (16.2–21.2% in “weighted” PGS, 16.1–21.0% in “unweighted” PGS).

However, it seems that the inclusion of a larger number of non-significant SNPs had a very small effect on improving the

predicting abilities of the models. Nevertheless, models with ten vs. four SNPs in PGS demonstrated slightly higher prognostic ability for ASB in the total sample and in individuals with a proactive form of aggressive behavior or comorbid substance abuse (Table 2, Models 4, 6). We have also constructed ROC curves and calculated comparative areas under the curves (AUCs) for all analyzed models (Fig. 2). Finally, our findings indicate that the best regression model has higher prognostic ability ($r^2 = 21\%$) and a moderate measure of classifier performance (AUC = 0.802) to designate subjects at high risk for developing ASB if they have family history of mental disorders.

Discussion

In the present study, we tested different logistic regression models, which were based on calculated polygenic scores, aimed at predicting liability to homicide in individuals from the Volga-Ural region of Russia. Based on our findings, the highest prediction ability for developing ASB was observed for individuals with a family history of mental disorders and those with substance abuse comorbidity. The data revealed are not surprising, since externalizing pathology is frequently accumulated in families (Acheson et al., 2018; Han et al., 2024) due to shared genetic profiles between biological parents and offspring. On the other hand, it was reported that the same genes/genetic variants were linked to different psychiatric conditions, addiction, and antisocial behavior (Ip et al., 2021; Antón-Galindo et al., 2023; Li et al., 2023; Wang et al., 2024; Pezzoli et al., 2025), which can be explained by genes' pleiotropy in various complex traits (Watanabe et al., 2019).

Since no significant difference in predicting ASB risk in the VUR sample was observed among models based on "weighted" and "unweighted" effects of SNPs, it can be concluded that effect estimates from GWAS of Europeans seem to be inappropriate for individuals from Russia. Therefore, future research should be focused on conducting GWAS of ASB in a Russian cohort followed by verification in the same-ethnicity independent sample. Published studies, which sought to replicate findings obtained for different populations, succeeded in using PGS from ASB to predict liability to externalizing behavior in both Europeans and African Americans (Brislin et al., 2024), although representing a small cumulative effect of genetic variants.

Our findings indicate a very small impact of selected SNPs on predicting ASB, which was based on the effect estimates from the study of summarized phenotype of externalizing pathology. The data obtained support previous findings on the small effect (0.1–4.0 %) of analyzed genetic variants (even at a genome-wide level) as polygenic scores on predicting ASB (Tielbeek et al., 2017, 2022; Tesli et al., 2024). Our previous research also revealed a small proportion of variance explained in aggression level in a general population of Russia, which was attributed to the combined effect of 30 genetic variants (Kazantseva et al., 2023b).

It is known that environmental factors play a modulating role in establishing specific patterns of behavior (Kazantseva et al., 2014), including ASB-related ones. In particular, harsh parenting (Burt, 2022), school violence (Acland et al., 2025), and affiliation with delinquent peers (Schwartz et al., 2019) were assumed to increase a risk for manifesting ASB. Regression models designed in the present study also point to a more pronounced effect of environmental factors in establishing ASB than that of the genetic component. These findings are at odds with existing studies, which also depicted valuable impact of such social factors as community violence (Musci et al., 2019), harsh parenting (Acland et al., 2025), and low parental education level (Barnes et al., 2019) under gene-by-environment interactions.

In the present study, we have observed a significant effect of present smoking and history of traumatic brain injury/severe chronic disorders on manifesting criminal behavior. One of the probable links between smoking and ASB is attributed to the influence of nicotine on the CNS via exaggerated stress sensi-

tivity (Weltens et al., 2021) and changed in epigenetic regulation (Gould et al., 2023). It should be noted that the usually accepted environmental effects can also be due to the impact of certain genetic and epigenetic profiles, which are inherited (McAdams et al., 2013). In this regard, present smoking may represent the result of activity of the genes responsible for developing addiction and externalizing behavior. Moreover, the negative effect of smoking promoting the development of ASB later in life was only evident for individuals with predisposing genetic patterns. Namely, individuals who were subjected to prenatal smoking exposure (their mothers smoked during pregnancy) demonstrated an enhanced risk of ASB only if they were genetically related to their mothers. At the same time, no link between maternal smoking and offspring' ASB was observed if children were developed from a donated egg (van Goozen et al., 2022).

Another significant factor affecting liability to ASB in our cohort is traumatic brain injury in anamnesis, which confirms previous data (Ryan et al., 2021; Theadom et al., 2024). It was suggested that TBI can cause abnormal morphometry of the central executive network in the brain, which can result in worsening of executive functions (Ryan et al., 2021) or exacerbate other valuable triggers, including social deprivation (Guskiewicz et al., 2003), thus promoting ASB. In summary, reported findings on the higher effect of social factors on developing ASB in the Russian cohort can probably capture the effect of other genes on the occurrence of such an "environment".

Future research should integrate various methodological approaches, including those measuring brain activity and connectivity underlying specificity of individual behavioral responses, and consider the impact of genetic and environmental factors. For instance, there is some evidence of a link between amygdala hyper-reactivity and increased impulsivity and reduced self-regulation as a response to threatening stimuli (Dotterer et al., 2017). Another study identified a link between diminished P3(P300) amplitude of electrical potential, which was obtained as a response to a visual oddball task, and manifestation of externalizing phenotypes (Iacono, 2018; Brislin et al., 2024).

The present study has several limitations. First, the set of SNPs used for PGS calculation is rather small, which can mirror the low proportion of explained variance in liability to ASB attributed to genetic impact. To be more precise, calculated PGS in the previous meta-analysis (Karlsson Linnér et al., 2021) enabled to explain 3–4 % of variance in manifesting a combined phenotype of antisocial behavior when PGS was estimated on genetic data from 579 SNPs at the genome-wide significance level.

In turn, the present study has been focused on biallelic polymorphisms only, while other structural variations in the genome, such as tandem repeats and microdeletions/duplications, which can also contribute to genetically caused manifestations of aggression, remained unstudied within the present research. Although the examined sample represents a specific cohort of individuals with a severe form of aggressive behavior (homicide), the sample size is small, which can result in type I and II errors and requires future enlargement of the examined sample. Moreover, the obtained PGS models are limited to a number of analyzed social factors,

while other probably relevant factors including child-parent relationship, belonging to a criminal organization, physical or sexual violence, social isolation, personality type, etc. were non-examined. Finally, since the majority of enrolled offenders were characterized by excessive alcohol/opiate use, we cannot rule out whether the reported findings are attributed to present heavy alcohol drinking.

Conclusion

In summary, the present study represents an attempt to create a prognostic model for developing antisocial behavior in a Russian cohort based on genetic data reported for European populations. Revealed findings present evidence for a higher impact of social factors rather than a composite effect of the selected “top” SNPs in predicting liability to ASB. Nevertheless, the best model was able to explain up to 21.2 % of variance in liability to ASB, especially in subjects with a family history of mental illness or criminal behavior, which was based on the genetic profile of ten SNPs and such social parameters as traumatic brain injury, severe chronic disease in anamnesis, and tobacco smoking. Future research in this field has to be focused on performing GWAS in a Russian cohort of criminal offenders (or persons with other types of antisocial behavior) to identify genetic loci and their effect estimates specific to the main ethnic groups from Russia. Obviously, such analyses will enable the design of models of liability to manifest ASB with higher prediction probabilities.

References

- Acheson A., Vincent A.S., Cohoon A.J., Lovallo W.R. Defining the phenotype of young adults with family histories of alcohol and other substance use disorders: studies from the family health patterns project. *Addict Behav.* 2018;77:247-254. doi 10.1016/j.addbeh.2017.10.014
- Acland E.L., Pocuca N., Paquin S., Boivin M., Ouellet-Morin I., Andlauer T.F.M., Gouin J.P., Côté S.M., Tremblay R.E., Geoffroy M., Castellanos-Ryan N. Polygenic risk and hostile environments: links to stable and dynamic antisocial behaviors across adolescence. *Dev Psychopathol.* 2025;37(1):464-476. doi 10.1017/S095457942400004X
- Antón-Galindo E., Cabana-Domínguez J., Torrico B., Corominas R., Cormand B., Fernández-Castillo N. The pleiotropic contribution of genes in dopaminergic and serotonergic pathways to addiction and related behavioral traits. *Front Psychiatry.* 2023;14:1293663. doi 10.3389/fpsy.2023.1293663
- Barnes J.C., Liu H., Motz R.T., Tanksley P.T., Kail R., Beckley A.L., Belsky D.W., Domingue B.W., Moffitt T.E., Pratt T.C., Wertz J. The propensity for aggressive behavior and lifetime incarceration risk: a test for gene-environment interaction ($G \times E$) using whole-genome data. *Aggres Violent Behav.* 2019;49:101307. doi 10.1016/j.avb.2019.07.002
- Baron R.A., Richardson D.R. *Human Aggression.* New York: Plenum Press, 2004
- Borinskaya S.A., Rubanovich A.V., Larin A.K., Kazantseva A.V., Davydova Y.D., Genetozov E.V., Khusnutdinova E.K., Yankovsky N.K. Epigenome-wide association study of CpG methylation in aggressive behavior. *Russ J Genet.* 2021;57(12):1454-1460. doi 10.1134/S1022795421120048
- Brislin S.J., Salvatore J.E., Meyers J.M., Kamarajan C., Plawecki M.H., Edenberg H.J., Kuperman S., ... Kramer J.R., Chan G., Porjesz B.; COGA Collaborators; Dick D.M. Examining associations between genetic and neural risk for externalizing behaviors in adolescence and early adulthood. *Psychol Med.* 2024;54(2):267-277. doi 10.1017/S0033291723001174
- Burt S.A. The genetic, environmental, and cultural forces influencing youth antisocial behavior are tightly intertwined. *Annu Rev Clin Psychol.* 2022;18:155-178. doi 10.1146/annurev-clinpsy-072220-015507
- Davydova Y., Kazantseva A., Enikeeva R., Mustafin R., Malykh S., Lobaskova M., Valinurov R., Akhmerova I., Khusnutdinova E. The involvement of hypothalamic-pituitary-adrenal and monoaminergic systems genes in developing aggressive behavior. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2020a;31(S1):S16-S17. doi 10.1016/j.euroneuro.2019.12.023
- Davydova Y.D., Kazantseva A.V., Enikeeva R.F., Mustafin R.N., Lobaskova M.M., Malykh S.B., Gilyazova I.R., Khusnutdinova E.K. The role of oxytocin receptor (*OXTR*) gene polymorphisms in the development of aggressive behavior in healthy individuals. *Russ J Genet.* 2020b;56(9):1129-1138. doi 10.1134/S1022795420090057
- Deng W.Q., Belisario K., Gray J.C., Levitt E.E., Mohammadi-Shemirani P., Singh D., Pare G., MacKillop J. Leveraging related health phenotypes for polygenic prediction of impulsive choice, impulsive action, and impulsive personality traits in 1534 European ancestry community adults. *Genes Brain Behav.* 2023;22(3):e12848. doi 10.1111/gbb.12848
- Dotterer H.L., Hyde L.W., Swartz J.R., Hariri A.R., Williamson D.E. Amygdala reactivity predicts adolescent antisocial behavior but not callous-unemotional traits. *Dev Cogn Neurosci.* 2017;24:84-92. doi 10.1016/j.dcn.2017.02.008
- Fritz M., Soravia S.M., Dudeck M., Malli L., Fakhoury M. Neurobiology of aggression-review of recent findings and relationship with alcohol and trauma. *Biology (Basel).* 2023;12(3):469. doi 10.3390/biology12030469
- Gould T.J. Epigenetic and long-term effects of nicotine on biology, behavior, and health. *Pharmacol Res.* 2023;192:106741. doi 10.1016/j.phrs.2023.106741
- Guskiewicz K.M., McCrea M., Marshall S.W., Cantu R.C., Randolph C., Barr W., Onate J.A., Kelly J.P. Cumulative effects associated with recurrent concussion in collegiate football players: the NCAA Concussion Study. *JAMA.* 2003;290(19):2549-2555. doi 10.1001/jama.290.19.2549
- Han M.J., Kim S.T., Park C.I., Hwang S.S., Kim H.W., Kang J.I., Kim S.J. Serial mediating effects of childhood trauma and conduct behaviors on the impact of family history among patients with alcohol use disorder. *Sci Rep.* 2024;14(1):7196. doi 10.1038/s41598-024-57861-x
- Heilbronner U., Papiol S., Budde M., Andlauer T.F.M., Strohmaier J., Streit F., Frank J., ... Stürmer T., Müller-Myhsok B., Nöthen M.M., Rietschel M., Schulze T.G. “The Heidelberg Five” personality dimensions: genome-wide associations, polygenic risk for neuroticism, and psychopathology 20 years after assessment. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2021;186(2):77-89. doi 10.1002/ajmg.b.32837
- Iacono W.G. Endophenotypes in psychiatric disease: prospects and challenges. *Genome Med.* 2018;10(1):11. doi 10.1186/s13073-018-0526-5
- Ip H.F., Van der Laan C.M., Krapohl E.M.L., Brikell I., Sánchez-Mora C., Nolte I.M., St Pourcain B., ... Lundström S., Plomin R., Bartels M., Nivard M.G., Boomsma D.I. Genetic association study of childhood aggression across raters, instruments, and age. *Transl Psychiatry.* 2021;11(1):413. doi 10.1038/s41398-021-01480-x
- Karlsson Linnér R., Biroli P., Kong E., Meddens S.F.W., Wedow R., Fontana M.A., Lebreton M., ... Lee J.J., Cesarini D., Benjamin D.J., Koellinger P.D., Beauchamp J.P. Genome-wide association analyses of risk tolerance and risky behaviors in over 1 million individuals identify hundreds of loci and shared genetic influences. *Nat Genet.* 2019;51(2):245-257. doi 10.1038/s41588-018-0309-3
- Karlsson Linnér R., Mallard T.T., Barr P.B., Sanchez-Roige S., Madole J.W., Driver M.N., Poore H.E., ... Waldman I.D., Palmer A.A., Harden K.P., Koellinger P.D., Dick D.M. Multivariate analysis of 1.5 million people identifies genetic associations with traits related to self-regulation and addiction. *Nat Neurosci.* 2021;24(10):1367-1376. doi 10.1038/s41593-021-00908-3

- Kazantseva A.V., Kutlumbetova Yu.Yu., Malykh S.B., Lobaskova M.M., Khusnutdinova E.K. Arginine-vasopressin receptor gene (*AVPR1A*, *AVPR1B*) polymorphisms and their relation to personality traits. *Russ J Genet.* 2014;50(3):298-307. doi 10.1134/S1022795414030041
- Kazantseva A.V., Malykh S.B., Khusnutdinova E.K. Molecular-genetic studies of personality: from gene candidate analyses to genome-wide association studies. In: Malykh S.B., Kovas Y.V., Gaysina D.A. (Eds) *Genomics of Behavior: Children Development and Education*. Tomsk: Tomsk State University, 2016;178-209 (in Russian)
- Kazantseva A.V., Davydova Y.D., Enikeeva R.F., Valinurov R.G., Gareeva A.E., Khusnutdinova N.N., Khusnutdinova E.K. The association study of polymorphic variants of hypothalamic-pituitary-adrenal system genes (*AVPR1B*, *OXTR*) and aggressive behavior manifestation: a focus on social environment. *Res Results Biomed.* 2021;7(3):232-244. doi 10.18413/2658-6533-2021-7-3-0-3
- Kazantseva A., Davydova Y., Enikeeva R., Mustafin R.N., Malykh S., Lobaskova M., Kanapin A., Prokopenko I., Khusnutdinova E. A combined effect of polygenic scores and environmental factors on individual differences in depression level. *Genes.* 2023a;14(7):1355. doi 10.3390/genes14071355
- Kazantseva A.V., Davydova Y.D., Enikeeva R.F., Yakovleva D.V., Mustafin R.N., Lobaskova M.M., Malykh S.B., Khusnutdinova E.K. Individual variance in human aggression: a combined effect of polygenic score and social/lifestyle factors. *Russ J Genet.* 2023b;59(S2): S227-S236. doi 10.1134/s1022795423140065
- Li W., Zhou H., Thygesen J.H., Heydtmann M., Smith I., Degenhardt F., Nöthen M., Morgan M.Y., Kranzler H.R., Gelernter J., Bass N., McQuillin A. Genome-wide association study of antisocial personality disorder diagnostic criteria provides evidence for shared risk factors across disorders. *Psychiatr Genet.* 2023;33(6):233-242. doi 10.1097/YPG.0000000000000352
- Manchia M., Fanos V. Targeting aggression in severe mental illness: the predictive role of genetic, epigenetic, and metabolomic markers. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2017;77:32-41. doi 10.1016/j.pnpbp.2017.03.024
- Mbatchou J., Barnard L., Backman J., Marcketta A., Kosmicki J.A., Ziyatdinov A., Benner C., ... Baras A., Reid J., Abecasis G., Maxwell E., Marchini J. Computationally efficient whole-genome regression for quantitative and binary traits. *Nat Genet.* 2021;53(7): 1097-1103. doi 10.1038/s41588-021-00870-7
- McAdams T.A., Gregory A.M., Eley T.C. Genes of experience: explaining the heritability of putative environmental variables through their association with behavioural and emotional traits. *Behav Genet.* 2013;43(4):314-328. doi 10.1007/s10519-013-9591-0
- Musci R.J., Bettencourt A.F., Sisto D., Maher B., Masyn K., Ialongo N.S. Violence exposure in an urban city: a G×E interaction with aggressive and impulsive behaviors. *J Child Psychol Psychiatry.* 2019;60(1):72-81. doi 10.1111/jcpp.12966
- Odintsova V.V., Hagenbeek F.A., van der Laan C.M., van de Weijer S., Boomsma D.I. Genetics and epigenetics of human aggression. *Handb Clin Neurol.* 2023;197:13-44. doi 10.1016/B978-0-12-821375-9.00005-0
- Pappa I., St Pourcain B., Benke K., Cavadin A., Hakulinen C., Nivard M.G., Nolte I.M., ... Middeldorp C.M., Oldehinkel A.J., Pennell C.E., Boomsma D.I., Tiemeier H. A genome-wide approach to children's aggressive behavior: the EAGLE consortium. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2016;171(5):562-572. doi 10.1002/ajmg.b.32333
- Pezzoli P., McCrory E.J., Viding E. Shedding light on antisocial behavior through genetically informed research. *Annu Rev Psychol.* 2025;76(1):797-819. doi 10.1146/annurev-psych-021524-043650
- Ryan N.P., Catroppa C., Hughes N., Painter F.L., Hearps S., Beauchamp M.H., Anderson V.A. Executive function mediates the prospective association between neurostructural differences within the central executive network and anti-social behavior after childhood traumatic brain injury. *J Child Psychol Psychiatry.* 2021;62(9): 1150-1161. doi 10.1111/jcpp.13385
- Schwartz J.A., Solomon S.J., Valgardson B.A. Socialization, selection, or both? The role of gene-environment interplay in the association between exposure to antisocial peers and delinquency. *J Quant Criminol.* 2019;35:1-26. doi 10.1007/s10940-017-9368-3
- Tesli N., Jaholkowski P., Haukvik U.K., Jangmo A., Haram M., Rokicki J., Friestad C., Tielbeek J.J., Næss Ø., Skardhamar T., Gustavson K., Ask H., Fazel S., Tesli M., Andreassen O.A. Conduct disorder – a comprehensive exploration of comorbidity patterns, genetic and environmental risk factors. *Psychiatry Res.* 2024;331:115628. doi 10.1016/j.psychres.2023.115628
- Theadom A., Jones K., Starkey N., Barker-Collo S., Ameratunga S., Faulkner J., Ao B.T., Feigin V. Symptoms and engagement in antisocial behavior 10 years after mild traumatic brain injury within a community civilian sample: a prospective cohort study with age-sex matched control group. *Arch Phys Med Rehabil.* 2024;105(2):295-302. doi 10.1016/j.apmr.2023.07.016
- Tielbeek J.J., Johansson A., Polderman T.J.C., Rautiainen M.R., Jansen P., Taylor M., Tong X., ... Faraone S.V., Popma A., Medland S.E., Posthuma D.; Broad Antisocial Behavior Consortium collaborators. Genome-wide association studies of a broad spectrum of antisocial behavior. *JAMA Psychiatry.* 2017;74(12):1242-1250. doi 10.1001/jamapsychiatry.2017.3069
- Tielbeek J.J., Uffelmann E., Williams B.S., Colodro-Conde L., Gagnon É., Mallard T.T., Levitt B.E., ... Fisher S.E., Moffitt T.E., Caspi A., Polderman T.J.C., Posthuma D. Uncovering the genetic architecture of broad antisocial behavior through a genome-wide association study meta-analysis. *Mol Psychiatry.* 2022;27(11):4453-4463. doi 10.1038/s41380-022-01793-3
- van Goozen S.H.M., Langley K., Hobson C.W. Childhood antisocial behavior: a neurodevelopmental problem. *Annu Rev Psychol.* 2022; 73:353-377. doi 10.1146/annurev-psych-052621-045243
- Wang S., Dan Y.L., Yang Y., Tian Y. The shared genetic etiology of antisocial behavior and psychiatric disorders: insights from pleiotropy and causality analysis. *J Affect Disord.* 2024;365:534-541. doi 10.1016/j.jad.2024.08.149
- Watanabe K., Stringer S., Frei O., Umičević Mirkov M., de Leeuw C., Polderman T.J.C., van der Sluis S., Andreassen O.A., Neale B.M., Posthuma D. A global overview of pleiotropy and genetic architecture in complex traits. *Nat Genet.* 2019;51(9):1339-1348. doi 10.1038/s41588-019-0481-0
- Weltens I., Bak M., Verhagen S., Vandenberk E., Domen P., van Amelsvoort T., Drukker M. Aggression on the psychiatric ward: prevalence and risk factors. A systematic review of the literature. *PLoS One.* 2021;16(10):e0258346. doi 10.1371/journal.pone.0258346

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

Received March 24, 2025. Revised May 22, 2025. Accepted June 4, 2025.

doi 10.18699/vjgb-25-92

Эндогенный окситоцин и межсамцовые взаимодействия после введения окситоцина у серых крыс, селекционируемых по поведению

С.Г. Шихевич , Р.В. Кожемякина , Р.Г. Гулевич , Ю.Э. Гербек ^{1, 2}¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия² Хайфский университет, Хайфа, Израиль shikhsvt@bionet.nsc.ru

Аннотация. Известно, что нейропептид окситоцин (ОТ), секретируемый специализированными нейронами в гипоталамусе, оказывает дозозависимое влияние на социальное поведение и агрессию у различных видов животных. Ранее нами было показано, что у взрослых и неполовозрелых самцов серых крыс, селекционируемых на усиление агрессивного поведения по отношению к человеку, назальные аппликации окситоцина вызывали антиагрессивный эффект по отношению к оппоненту в тесте резидент–интродер, в то время как у крыс, селекционируемых на ручное поведение, аппликации окситоцина или не влияли на поведение, или вызывали усиление агрессивности. Однако оставалось неизвестным, как влияет отбор по поведению на эндогенную окситоцинергическую систему у крыс. В данной работе исследовали количество содержащих окситоцин клеток в паравентрикулярном (ПВЯ) и супраоптическом (СОЯ) ядрах гипоталамуса у интактных ручных и агрессивных крыс, учитывая фактор латерализации, поскольку было известно о функциональной асимметрии гипоталамуса. Наряду с этим оценивали, как изменяется уровень окситоцина в крови после назальных аппликаций этого нейропептида у крыс, селекционируемых по поведению. Так как эффекты окситоцина на агрессивность крыс могут зависеть от степени ее проявления, в данной работе исследовали влияние аппликаций окситоцина на поведение у ручных и агрессивных крыс при взаимодействии на нейтральной территории, где агрессивность самцов проявляется слабее, чем при защите собственной территории в тесте резидент–интродер. Показано, что только для ручных крыс характерна асимметрия по количеству содержащих окситоцин клеток, локализованных в правых и левых частях СОЯ и ПВЯ гипоталамуса. Причем количество таких клеток в правой половине СОЯ у ручных крыс оказалось больше, чем у агрессивных, в то время как уровень окситоцина в крови у ручных крыс как в контрольной группе, так и после аппликаций окситоцина, напротив, был достоверно ниже, чем у агрессивных. Аппликации окситоцина у агрессивных крыс вызывали уменьшение продолжительности агрессивных взаимодействий и боковых стоек угроз, а также количества последних по сравнению с животными того же поведения, получающими физраствор, что может свидетельствовать об антиагрессивном эффекте окситоцина, тогда как у ручных крыс аппликации окситоцина, наоборот, приводили к увеличению количества ударов задними лапами и их продолжительности. По-видимому, найденные нами различия в эндогенной окситоцинергической системе гипоталамуса могут быть связаны и с поведением, сформированным в процессе отбора, и с различной реакцией на введение окситоцина у ручных и агрессивных крыс.

Ключевые слова: окситоцин; отбор; поведение; крыса; агрессивность; иммуногистохимия; гипоталамус

Для цитирования: Шихевич С.Г., Кожемякина Р.В., Гулевич Р.Г., Гербек Ю.Э. Эндогенный окситоцин и межсамцовые взаимодействия после введения окситоцина у серых крыс, селекционируемых по поведению. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(6):847-855. doi 10.18699/vjgb-25-92

Финансирование. Содержание использованных линий крыс в виварии конвенциональных животных ИЦиГ СО РАН (Новосибирск) поддерживалось бюджетным проектом FWNR-0259-2022-0019.

Исследование эндогенной окситоцинергической системы и поведения у серых крыс после введения окситоцина проводилось при поддержке гранта РНФ 21-44-04405.

Благодарности. Выражаем благодарность ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>) за предоставленное оборудование, а также А.А. Сорокоумовой за помощь в оформлении рисунков.

Вклад авторов. Идея работы и планирование эксперимента (Ю.Э.Г., Р.Г.Г.), сбор данных (С.Г.Ш., Р.В.К.), обработка данных (С.Г.Ш.), написание и редактирование манускрипта (С.Г.Ш., Р.В.К., Р.Г.Г., Ю.Э.Г.).

Endogenous oxytocin and intermale interactions after oxytocin administrations in Norway rats selected for behavior

S.G. Shikhevich , R.V. Kozhemyakina ¹, R.G. Gulevich ¹, Yu.E. Herbeck ^{1, 2}

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

² University of Haifa, Haifa, Israel

 shikhsvt@bionet.nsc.ru

Abstract. The neuropeptide oxytocin (OT) secreted by specialized neurons in the hypothalamus affects social behavior and aggression in various animal species in a dose-dependent manner. Our earlier studies showed that OT administration by nasal application to adult and adolescent Norway rat males selected for enhanced aggressive response to humans reduced aggression upon the opponent in the resident-intruder test. By contrast, OT administration to rats selected for tame behavior exerted no effect on behavior or even enhanced aggression. It was still unknown how selection for behavior affected the endogenous oxytocinergic system in rats. Here we study the populations of OT-containing cells in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in intact tame and aggressive rats with regard to lateralization, as the hypothalamus is known to be functionally asymmetrical. We have also assessed blood OT changes after nasal OT application to rats selected for behavior. As it is known that the effect of OT on rat aggressiveness may depend on the basal level of the latter, we have analyzed the effect of OT administration on behavior in tame and aggressive rats interacting on neutral ground, where the aggressiveness of males manifests itself less than in the defense of territory in the resident-intruder test. The asymmetry in the numbers of OT-containing cells in the left and right halves of the paraventricular and supraoptic nuclei has been observed only in tame rats. The number of such cells in the right half of tame rats is greater than in aggressive. In contrast, the blood OT level in tame rats is significantly lower than in aggressive ones both in the intact animals and after OT administration. Oxytocin administration to aggressive rats shortens aggressive interactions and lateral threats and reduces the number of the latter as compared to animals of the same behavior pattern having received saline. This observation may point to an anti-aggressive effect of OT. In tame rats, though, OT administration increases the number of hind leg kicks and kicking duration. It appears that the differences in the endogenous OTergic system of hypothalamus found in this study are associated with both the behavior formed during selection and different responses to exogenous OT in tame and aggressive animals.

Key words: oxytocin; selection; behavior; rat; aggressiveness; immunohistochemistry; hypothalamus

For citation: Shikhevich S.G., Kozhemyakina R.V., Gulevich R.G., Herbeck Yu.E. Endogenous oxytocin and intermale interactions after oxytocin administrations in Norway rats selected for behavior. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektсии* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(6):847-855. doi 10.18699/vjgb-25-92

Введение

Длительное время гормон окситоцин ассоциировался исключительно с репродуктивной функцией, материнским поведением и грудным вскармливанием. Исследования всего спектра физиологических эффектов данного гормона приобрели широкое развитие в середине XX века. Результаты, полученные на животных, а позднее и на человеке, свидетельствуют о том, что окситоцин играет важную роль в снижении тревожности (Neumann, Slattery, 2016; Yoon, Kim, 2020; Takayanagi, Onaka, 2021) и агрессии (Calcagnoli et al., 2013; de Jong, Neumann, 2018; Herbeck, Gulevich, 2019; Marsh et al., 2021), а также улучшения памяти и обучаемости (Audogan et al., 2018).

Гипоталамический нейропептид окситоцин синтезируется прежде всего в нейронах паравентрикулярного (ПВЯ) и супраоптического (СОЯ) ядер гипоталамуса, затем транспортируется по аксонам в задний отдел гипофиза, где хранится в везикулах до момента высвобождения в системный кровоток (Castel et al., 1984). Наряду с этим окситоцин по коллатеральным аксонам гипоталамо-нейрогипофизарного тракта попадает в различные отделы переднего мозга, где экспрессируются рецепторы к нему, и оказывает влияние на разные поведенческие аспекты (Jurek, Neumann, 2018;

Grinevich, Neumann, 2021). В ответ на физиологические стимулы (роды, лактация, стресс, эмоции) происходит быстрый выброс предварительно накопленного окситоцина как в кровь, так и в различные отделы мозга (Eliava et al., 2016; Tang et al., 2020; Grinevich, Neumann, 2021).

В формировании мотиваций и иницировании поведения основополагающую роль играет гипоталамус (Симонов, 1987, 1993; Судаков, 1993). В литературе имеются немногочисленные данные о функциональной асимметрии гипоталамуса (Павлова, 2001; Kiss, 2020). В частности, при сопоставлении эффективности стимуляции правой и левой частей гипоталамуса у кроликов методом сопряженной импульсации нейронов с целью вызова мотивационных и эмоциональных реакций отмечено, что наиболее эффективной для вызова оборонительной мотивации была левая часть гипоталамуса, а для получения эмоционально-положительных реакций – правая часть гипоталамуса (Павлова, 2001). Исследуемые нами серые крысы, селекционируемые по отношению к человеку, существенно отличаются по оборонительной реакции на перчатку экспериментатора, что может быть связано с особенностями локализации нейронов, секретирующих окситоцин, у этих животных.

Показано, что интраназальное введение окситоцина самцам крыс Вистар и C57Bl/6 мышей через 70 мин вызывает параллельное повышение уровня окситоцина как в крови, так и в диализатах дорзального гиппокампа и миндаины. I. Neumann с коллегами утверждают (2013), что экзогенный окситоцин, введенный интраназально, достигает областей мозга, в дозах, значимых для регуляции поведения.

Согласно данным, полученным на серых крысах Groningen дикого типа (из популяции в Гронинген, Нидерланды), которые отличаются от крыс лабораторных линий повышенной межсамцовой агрессией и ее широкой вариабельностью, уровень мРНК окситоцина в ПВЯ гипоталамуса, но не в СОЯ, отрицательно коррелирует со степенью агрессивности этих животных (Calcagnoli et al., 2014). Так, у самцов крыс с максимальным проявлением агрессивности отмечали пониженный уровень мРНК окситоцина в ПВЯ по сравнению с менее агрессивными самцами. Введение окситоцина в желудочек мозга самцам серых крыс вызывало дозозависимое понижение агрессивности, которое было наиболее заметно у самцов с максимальным проявлением агрессивности (Calcagnoli et al., 2013). В исследованиях на человеке также отмечали разную эффективность влияния назального введения окситоцина на просоциальное поведение (или проявление позитивных взаимодействий с другими индивидуумами) в зависимости от исходного уровня социальной мотивации у испытуемого. Интраназальное введение окситоцина способствовало просоциальному поведению, особенно у людей, имеющих низкую исходную социальную мотивацию, но может усугубить межличностную тревогу у людей с низким уровнем социальной безопасности (Bartz et al., 2015; Soriano et al., 2020).

Исследования на серых крысах, селекционируемых на агрессивное и толерантное отношение к человеку, могли бы внести вклад в понимание особенностей функционирования эндогенной окситоцинергической системы и роли окситоцина в регуляции поведенческих реакций. В результате отбора у ручных крыс наблюдаются полное отсутствие оборонительных реакций и высокая толерантность к человеку при взятии в руки, тогда как серые крысы агрессивной линии характеризуются не только высокой агрессией по отношению к человеку, но и устойчивым и крайним проявлением внутривидовой межсамцовой агрессии (Плюснина, Соловьева, 2010; Plyusnina et al., 2011).

Показано, что у ручных крыс понижена функциональная активность гипоталамо-гипофизарно надпочечниковой системы (ГГНС) как в периферических, так и в центральных ее звеньях по сравнению с агрессивными и неселекционируемыми (Plyusnina, Oskina, 1997; Herbeck et al., 2017). В тесте на нейтральной территории агрессивность к оппоненту при взаимодействии самцов крыс, селекционируемых на агрессивное поведение, проявляется слабее, чем в тесте резидент-интродер, когда испытуемым животным приходится защищать собственную территорию (Плюснина, Соловьева, 2010). Назальные аппликации окситоцина как взрослым, так и неполовозрелым агрессивным самцам вызывали антиагрессивный эффект в тесте резидент-интродер, в то время как у ручных крыс

введение окситоцина или не влияло на поведение, или даже усиливало признаки агрессии у взрослых самцов с аппликациями раствора с концентрацией 2 мкг/мкл (Gulevich et al., 2019; Kozhemyakina et al., 2020).

Неизвестно, как влияет отбор крыс по поведению на параметры окситоцинергической системы гипоталамуса и уровень окситоцина в периферической крови, а также будет ли сохраняться эффект аппликаций окситоцина на поведение у крыс в тесте на нейтральной территории, где агрессивность самцов проявляется слабее, чем в тесте резидент-интродер.

Целью данной работы было исследование особенностей функциональной активности эндогенной окситоцинергической системы у самцов ручных и агрессивных крыс, а также влияния назальных аппликаций окситоцина на уровень его в крови и проявления агрессивного поведения в тесте на нейтральной территории у этих животных.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. Эксперименты проводили в конвенциональном виварии Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия) на взрослых самцах серых крыс (*Rattus norvegicus*) 84–93-го поколений селекции на отсутствие и усиление агрессивной реакции на человека (ручных и агрессивных соответственно). Животных содержали в металлических клетках (50 × 33 × 20 см) по четыре самца в условиях искусственного фотопериода 12:12 и свободного доступа к воде и пище. Тесты выполняли с 14:00 до 18:00 местного времени.

Все международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Биоэтического комитета Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 8 от 19.3.2012).

Иммуногистохимическое исследование СОЯ и ПВЯ гипоталамуса у интактных ручных и агрессивных крыс. Исследование проводили на крысах 89-го поколения селекции. Для фиксации мозга крыс использовали метод перфузии через аорту левого желудочка сердца с помощью перистальтического насоса. В течение 5–10 мин производили отмывку фосфатно-солевым буфером (1×ФСБ), а затем 4 % раствором параформальдегида (ПФА) 5–10 мин. Для дегидратации извлеченный мозг помещали в 30 % раствор сахарозы на 3–4 недели на +4 °С. Образцы хранились в среде криопротектора Tissue-Tek® O.C.T™ Compound на –70 °С до изготовления срезов. Фронтальные срезы мозга (30 мкм) изготавливали в криостате Microm HM-505N (Microm, Германия) при –20 °С. Срезы монтировали на предметные стекла Polysine® (Menzel-Gläser, Германия). Препараты хранились при –20 °С до дальнейших исследований.

Окрашивание срезов проводили по стандартной методике с использованием набора реактивов (Rabbit specific HPR/DAB (ABC) Detection IHC kit ab64261, фирмы “Abcam”, Великобритания). Антитела (Anti-Oxytocin-neurophysin 1 antibody ab2078 (Abcam)) разводили 1/10000, срезы инкубировали с антителами в течение 3 суток.

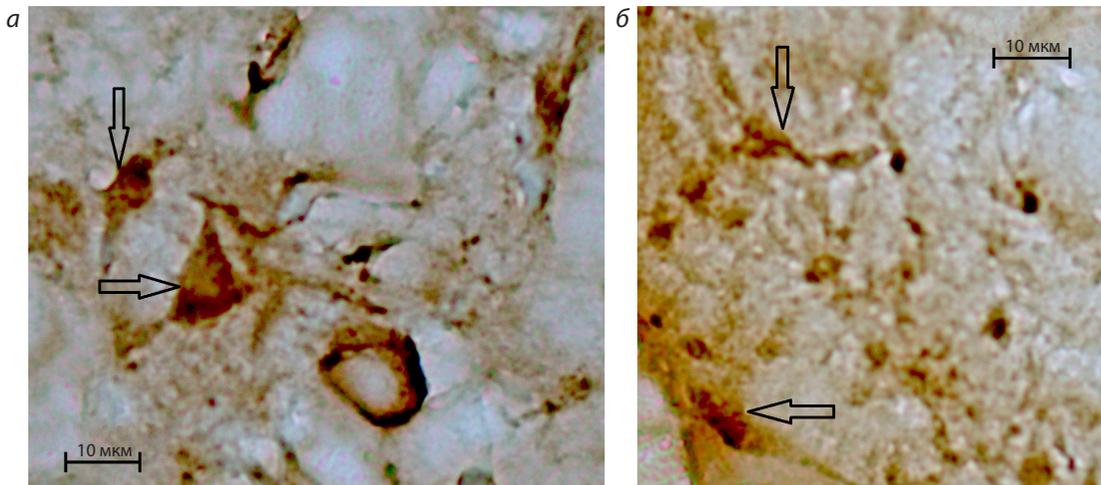


Рис. 1. Иммуногистохимическое окрашивание содержащих окситоцин клеток паравентрикулярного (а) и супраоптического (б) ядер гипоталамуса крыс.

Объектив: $\times 40$.

Далее с помощью оптического микроскопа AXIO (Zeiss, Германия) на срезах оценивали количество содержащих окситоцин клеток в области СОЯ и ПВЯ гипоталамуса (рис. 1). В ПВЯ гипоталамуса окситоцинергические клетки располагались компактными группами; в связи с этим была выбрана область с максимальной плотностью окрашенных клеток. Эта область составила 4.7 мкм^2 , в ней и определялось количество клеток на всех исследованных срезах. В СОЯ единой области для подсчета клеток выделить не удалось, поэтому определяли количество клеток в расчете на 1 мкм^2 площади среза.

Назальные аппликации окситоцина и определение уровня окситоцина в крови после аппликаций. Исследование выполняли на крысах 93-го поколения селекции. Экспериментальные группы составляли 10–12 животных. Для снижения стрессорного влияния процедуры введения окситоцина и физраствора экспериментальных животных до эксперимента в течение 7 дней приучали к рукам. На 8-й день экспериментальной группе крыс проводили однократную аппликацию на область вокруг носа 20 мкл окситоцина с концентрацией 2 мкг/мкл (группа окситоцин) или 20 мкл физраствора (группа физраствор). Через 40 мин после воздействия у животных брали кровь после декаптации для определения изменения содержания окситоцина в плазме периферической крови. Для контроля использовали интактных крыс. Пробы крови брали в пробирки (4 мл, $13 \times 75 \text{ мм}$, VACUETTE с К3 ЭДТА и ингибитором протеолиза аprotинином, PREMIUM). Кровь центрифугировали не более чем через 20 мин после взятия, полученную плазму немедленно замораживали при температуре $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Дальнейшее хранение проходило при температуре $-70 \text{ }^\circ\text{C}$.

Содержание окситоцина в плазме крови определяли с помощью набора DetectX® Oxytocin ELISA Kit (Arbor Assays, США) с предварительной экстракцией окситоцина. Для этого к 100 мкл плазмы добавляли 200 мкл 0.05 M Tris HCl pH = 8.0 и 5 мкл DTT (BioChemica, Пакистан), смесь инкубировали 45 мин при $37 \text{ }^\circ\text{C}$. После чего добавляли 15 мкл 0.5 M йодацетамида с последующей ин-

кубацией в течение 20 мин при комнатной температуре. По окончании вносили 640 мкл 80 % ацетонитрила. После центрифугирования на 14000 g в течение 15 мин супернатант отбирали и высушивали с помощью Concentrator plus (Eppendorf, ФРГ).

Исследование межсамцовых взаимодействий на нейтральной территории. Исследование выполняли на крысах 84-го поколения селекции. Экспериментальные группы составляли 9–10 животных. За две недели до начала эксперимента животные были рассажены в индивидуальные клетки. Всем крысам проводили однократную интраназальную аппликацию на эпителий вокруг ноздрей 20 мкл окситоцина в концентрации 1 мкг/мкл (группа окситоцин) или 20 мкл физраствора (группа физраствор). Через 40 мин после аппликации экспериментального самца помещали в незнакомую клетку ($40 \times 40 \times 60 \text{ см}$), разделенную перегородкой на два равных отсека (Плюснина, Соловьева, 2010). Одновременно с первым самцом во второй отсек помещали самца линии Вистар с примерно равной массой тела, а затем перегородку убирали. Длительность теста составляла 10 мин. Поведение регистрировали на видеокамеру для последующего анализа.

Агонистическое поведение самцов оценивалось по следующим поведенческим показателям: латентному периоду первого агрессивного взаимодействия, числу и времени атак, преследований, ударов задними лапами, вертикальных стоек, опрокидываний на спину, агрессивного груминга, времени боковых поз угрозы (Плюснина, Соловьева, 2010; Soriano et al., 2020). Суммарное время агрессивного поведения включало длительность всех перечисленных выше поз и движений, связанных с конкуренцией или конфликтом животных. Кроме того, оценивалось суммарное время социального неагрессивного поведения, которое включало время приближений и обнюхиваний.

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 10.0 (Statsoft™, США). Нормальность распределения проверяли с применением критерия Кол-

могорова–Смирнова. Для данных по количеству содержащих окситоцин клеток в ядрах гипоталамуса и уровню окситоцина в крови, имеющих нормальное распределение, использовали методы параметрической статистики: критерий Стьюдента и дисперсионный анализ ANOVA для независимых измерений и последующий *post-hoc* анализ с помощью критерия Фишера (Fisher LSD).

Данные по количеству содержащих окситоцин клеток в целых СОЯ и ПВЯ гипоталамуса у ручных и агрессивных крыс анализировали по *t*-критерию Стьюдента, а для результатов по количеству исследуемых клеток в правой и левой части СОЯ и ПВЯ гипоталамуса применяли двухфакторный дисперсионный анализ, где одним из факторов влияния был отбор по поведению, а другим – фактор локализации клеток в правой или левой части СОЯ и ПВЯ гипоталамуса (или латерализации), свидетельствующий о влиянии локализации клеток в правой или левой части ядер на их количество.

Для результатов по уровню окситоцина в крови использовали двухфакторный дисперсионный анализ, где одним из факторов был отбор по поведению, а другим – влияние аппликаций окситоцина или физраствора. Проверка данных по поведенческим показателям не подтвердила нормальность распределения, поэтому при дальнейшей обработке применяли метод непараметрической статистики – *U*-тест Манна–Уитни. Данные по поведенческим параметрам представлены в виде *box-plot* с максимальными, минимальными и медианными значениями параметров, где в пределах границ бокса располагается 50 % полученных результатов для данной выборки, от минимальных значений до нижней границы бокса – 25 % результатов, как и от максимальных значений до верхней границы бокса.

Результаты

Иммуногистохимическое исследование

Полученные данные свидетельствуют, что количество содержащих окситоцин клеток в целом ПВЯ гипоталамуса достоверно не отличается у ручных и агрессивных крыс (774.76 ± 38.98 и 826.16 ± 35.80 соответственно), тогда как в целом СОЯ этот показатель у ручных крыс 434.10 ± 28.76 на уровне тенденции был больше, чем у агрессивных 331.68 ± 37.16 ($p < 0.06$).

Анализ данных по количеству содержащих окситоцин клеток в отдельных половинах СОЯ и ПВЯ гипоталамуса проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа, где одним из факторов был отбор по поведению, а другим – фактор локализации в правой или левой части СОЯ и ПВЯ гипоталамуса (или фактор латерализации).

Показано, что отбор по поведению не влиял на количество содержащих окситоцин клеток в отдельных половинах ПВЯ гипоталамуса, тогда как влияние фактора латерализации было достоверно ($F_{1,65} = 8.08$, $p < 0.01$), но не было взаимодействия этих факторов. Последующий *post-hoc* анализ показал, что только у ручных крыс количество содержащих окситоцин клеток в левой половине ПВЯ больше, чем в его правой половине ($p < 0.05$) (рис. 2).

В отличие от ПВЯ, фактор отбора по поведению достоверно влиял на относительное количество содержащих

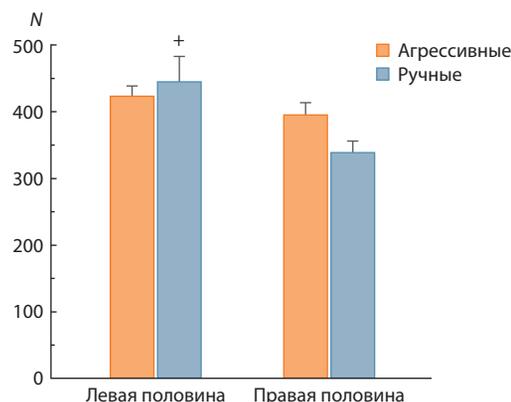


Рис. 2. Количество содержащих окситоцин клеток в левой и правой половинах ПВЯ гипоталамуса у серых крыс.

+ $p < 0.05$ по сравнению с правым ПВЯ; двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим *post-hoc* тестом Фишера. *N* – число клеток.

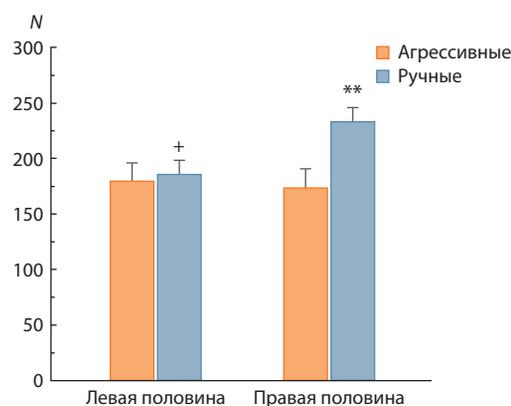


Рис. 3. Количество содержащих окситоцин клеток в левой и правой половинах СОЯ гипоталамуса у серых крыс.

** $p < 0.01$ по сравнению с агрессивными крысами; + $p < 0.05$ по сравнению с правой половиной СОЯ; двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим *post-hoc* тестом Фишера. *N* – число клеток.

окситоцин клеток в отдельных половинах СОЯ ($F_{1,56} = 4.2$, $p < 0.05$), но не фактор латерализации. Взаимодействие этих факторов было недостоверно. Последующий *post-hoc* анализ свидетельствовал, что в правой половине СОЯ количество содержащих окситоцин клеток у ручных крыс достоверно больше, чем у агрессивных ($p < 0.01$) (рис. 3), что согласуется с описанной выше тенденцией к большому количеству этих клеток в целом СОЯ у ручных крыс, чем у агрессивных. Кроме того, только у ручных крыс относительное количество содержащих окситоцин клеток в правой половине СОЯ достоверно больше, чем в левой половине СОЯ ($p < 0.05$).

Определение уровня окситоцина в крови после назальных аппликаций

Двухфакторный дисперсионный анализ показал достоверное влияние отбора по поведению на уровень окситоцина в плазме крови у крыс ($F_{2,55} = 23.65$, $p < 0.001$) и отсутствие как влияния фактора введения окситоцина, так и взаи-

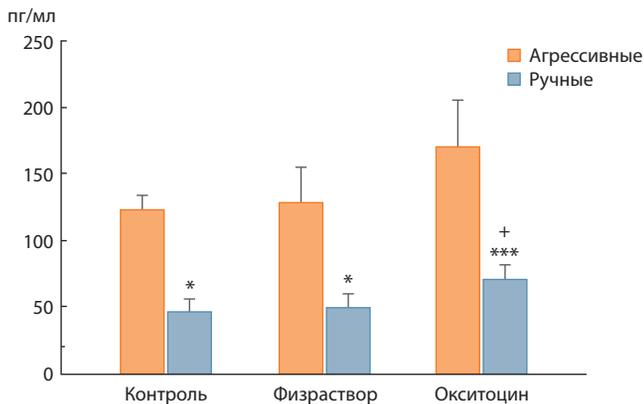


Рис. 4. Содержание окситоцина в плазме крови крыс спустя 40 мин после аппликации нейрогормона (20 мкл с концентрацией 2 мкг/мкл) или 20 мкл физраствора, пг/мл.

* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ по сравнению с агрессивными; * $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой, согласно двухфакторному дисперсионному анализу ANOVA и *post-hoc* тесту Фишера.

модействия факторов. Согласно последующему *post-hoc* анализу, уровень окситоцина в плазме крови у ручных животных был достоверно ниже, чем у агрессивных, во всех исследованных группах ($p < 0.05$ – для контрольной группы и группы с введением физраствора, $p < 0.001$ для группы с введением окситоцина) (рис. 4). Аппликации физраствора не влияли на уровень окситоцина в крови у ручных и агрессивных крыс. У ручных крыс, получавших окситоцин, уровень нейропептида в крови был выше, по сравнению с интактным контролем ($p < 0.05$).

Влияние назальных аппликаций окситоцина на поведение крыс в тесте на межсамцовые взаимодействия на нейтральной территории

На рис. 5 представлены данные по паттернам поведения в тесте на межсамцовые взаимодействия на нейтральной территории, в которых наблюдались достоверные различия. Наши исследования показали, что в контрольной группе с введением физраствора у агрессивных крыс общее время агрессивных взаимодействий, число и время боковых поз угроз достоверно больше, чем у ручных ($p < 0.03$, $U = 17.5$, $Z = 2.2$; $p < 0.035$, $U = 18$, $Z = 2.16$; $p < 0.04$, $U = 19$, $Z = 2.08$ соответственно). Тогда как латентный период до агрессивного взаимодействия у агрессивных животных достоверно меньше, чем у ручных после аппликаций физраствора ($p < 0.02$, $U = 16$, $Z = -2.33$).

После аппликации окситоцина у агрессивных крыс достоверно уменьшаются общее время агрессивных взаимодействий, число и время боковых стоек угроз по сравнению с крысами того же поведения после физраствора ($p < 0.04$, $U = 19$, $Z = 2.08$; $p < 0.035$, $U = 18$, $Z = 2.16$; $p < 0.025$, $U = 17$, $Z = 2.24$ соответственно). У ручных крыс после воздействия окситоцина достоверно возрастают число ударов задними лапами и их продолжительность по сравнению с группой, получающей физраствор ($p < 0.02$, $U = 16$, $Z = -2.33$ для обоих параметров). Наряду с этим у ручных крыс после аппликаций окситоцина отмечаются тенденции к более продолжительным агрессивным взаимодействиям и боковым позам угроз, а также к большему количеству последних, по сравнению животными, получающими физраствор.

Сравнение поведения агрессивных и ручных крыс после аппликаций окситоцина показывает, что у агрессивных

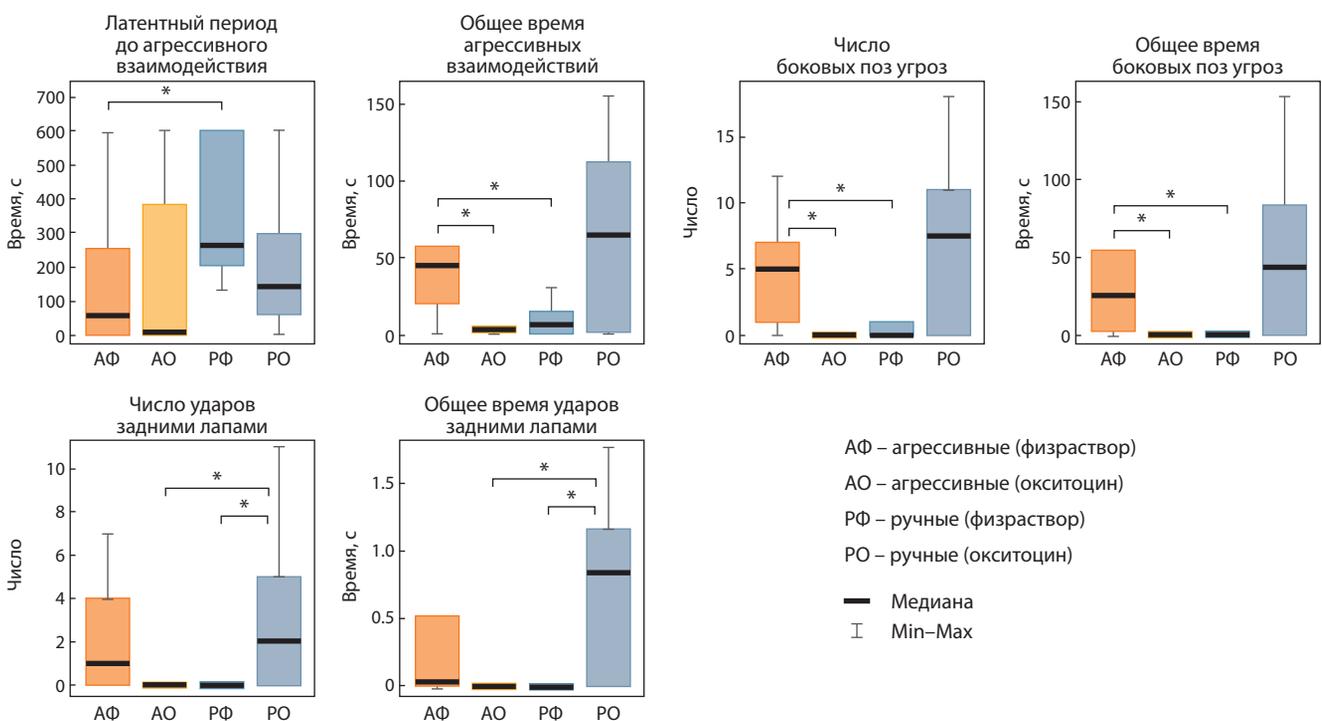


Рис. 5. Влияние назальных аппликаций окситоцина (20 мкл с концентрацией 1 мкг) на паттерны поведения в тесте на межсамцовые взаимодействия на нейтральной территории.

* $p < 0.05$, согласно U-тесту Манна-Уитни.

крыс число и продолжительность ударов задними лапами становятся значительно меньше, чем у ручных ($p < 0.02$, $U = 16$, $Z = -2.33$ для обоих параметров). Введение окситоцина нивелирует различия у ручных и агрессивных крыс по общему времени агрессивных взаимодействий, количеству и времени боковых стоек угроз, которые отмечались после введения физраствора.

Обсуждение

По данным иммуногистохимического исследования ядер гипоталамуса, у ручных крыс отмечается асимметрия по количеству содержащих окситоцин клеток в СОЯ и ПВЯ, тогда как у агрессивных крыс такой асимметрии не наблюдается. Данные по функциональной асимметрии гипоталамуса у кроликов, полученные методом сопряженной импульсации нейронов с целью вызова мотивационных и эмоциональных реакций, показали, что наиболее эффективным для вызова оборонительной мотивации был левый гипоталамус, а для эмоционально-положительных реакций – правый гипоталамус (Павлова, 2001).

Из наших данных следует, что количество содержащих окситоцин клеток в правом СОЯ у крыс, селекционируемых на ручное поведение, достоверно больше, чем у агрессивных (см. рис. 2). Поскольку в результате отбора по поведению ручные и агрессивные крысы заметно различаются по оборонительной реакции на человека, можно предполагать, что наблюдаемая нами асимметрия по количеству содержащих окситоцин клеток в СОЯ и ПВЯ гипоталамуса у ручных крыс, а также большее количество исследуемых клеток в правой части СОЯ у ручных животных, по сравнению с агрессивными, вносят вклад в особенности их реакций на человека.

Данные о большем количестве содержащих окситоцин клеток в правом СОЯ гипоталамуса у ручных крыс, по сравнению с агрессивными, согласуются с наблюдаемой тенденцией большего количества этих клеток в целом СОЯ ($p = 0.07$). Иными словами, можно предполагать, что количество содержащих окситоцин клеток отрицательно коррелирует с агрессивностью крыс, что в целом согласуется с ослаблением агрессивности у агрессивных крыс после введения окситоцина в желудочек мозга или с помощью назальных аппликаций (Calcagnoli et al., 2013, 2015; Gulevich et al., 2019).

Результаты, полученные на самцах крыс Groningen, свидетельствуют об отрицательной корреляции уровня мРНК окситоцина в ПВЯ и степени агрессивности самцов (Calcagnoli et al., 2014). Судя по данным этих авторов и полученным нами, функциональные параметры эндогенной окситоцинергической системы в гипоталамусе у более агрессивных крыс ниже, чем у менее агрессивных (в случае крыс Groningen) или ручных (в случае нашей селекционной модели). Вместе с тем, если в данном исследовании агрессивные самцы крыс отличались от ручных по количеству содержащих окситоцин клеток в правом СОЯ гипоталамуса, то крысы Groningen с разной степенью агрессивности отличались по уровню мРНК окситоцина в ПВЯ гипоталамуса (Calcagnoli et al., 2014). Такие особенности в локализации различий между крысами, исследуемыми нами, и крысами Groningen с разной степенью агрессивности могут быть связаны с разными подходами к формированию агрессивного поведения и его оценкой. Так,

агрессивность у крыс Groningen определяли по времени нападений на оппонента в процентах от всего времени эксперимента в 10 тестах резидент–интродер, а агрессивное поведение крыс, исследуемых в данной работе, было сформировано в результате длительного отбора по реакции на человека.

Показано, что у агрессивных крыс уровень окситоцина в крови достоверно выше, чем у ручных. Поскольку выделение окситоцина в кровь не всегда коррелирует с локальным выделением окситоцина из аксональных терминалей в различных областях головного мозга (Knobloch et al., 2012; Grinevich et al., 2015), оценка активности окситоциновой системы мозга по уровню гормона в крови не всегда однозначна, и изменение уровня окситоцина в плазме не обязательно соотносится с поведением животных (Neumann, 2008). Спустя 40 мин после назальных аппликаций окситоцина только у ручных крыс уровень этого нейропептида в крови был выше, чем у интактных животных, но не у крыс с аппликациями физраствора (см. рис. 4), хотя этот параметр достоверно не отличался у интактных и получающих физраствор крыс. Тогда как у крыс Вистар после аппликаций окситоцина уровень его в крови повышался спустя 70, 100 и 130 мин (Neumann et al., 2013). По-видимому, после аппликаций окситоцина для регистрации повышения уровня его в крови необходим более продолжительный промежуток времени, чем в данном исследовании, и для регистрации эффектов на поведение, наблюдаемых уже через 40 мин как на нейтральной территории, так и в тесте резидент–интродер (Gulevich et al., 2019; Kozhemyakina et al., 2020).

Представленные данные по поведению у агрессивных крыс в тесте межсамцовых взаимодействий на нейтральной территории свидетельствуют об антиагрессивном эффекте окситоцина, поскольку после однократной аппликации окситоцина (20 мкл с концентрацией 1 мкг/мкл) у этих животных становятся достоверно менее продолжительными агрессивные взаимодействия и боковые стойки угроз, а также уменьшается количество боковых стоек угроз по сравнению с животными того же поведения, получающими физраствор. Такой же эффект аппликаций окситоцина отмечали в тесте резидент–интродер у самцов крыс Groningen (Calcagnoli et al., 2015) и у крыс, селекционируемых на агрессивное поведение, в условиях взаимодействия как с самцом-оппонентом, так и с экспериментатором (в тесте «на перчатку») (Gulevich et al., 2019; Kozhemyakina et al., 2020). Причем у агрессивных крыс агрессивность понижалась как при однократных аппликациях раствора окситоцина с концентрацией 2 мкг/мкл, так и в случае 5-дневных аппликаций раствора с меньшей концентрацией, 1 мкг/мкл, т. е. с варьирующимися концентрациями раствора в определенном диапазоне. Поскольку ранее было показано, что у агрессивных крыс на нейтральной территории агрессивность к оппоненту проявляется слабее, чем при защите своей собственной территории в условиях теста резидент–интродер (Плюснина, Соловьева, 2010), можно полагать, что окситоцин вызывает понижение агрессивности у этих животных независимо от степени ее проявления в различных тестах.

Судя по поведению у ручных крыс в тесте на нейтральной территории, аппликации окситоцина (20 мкл с концентрацией 1 мкг/мкл), напротив, вызывали у них досто-

верное увеличение количества и продолжительности ударов задними лапами, а также на уровне тенденции более продолжительные агрессивные взаимодействия, боковые позы угроз и повышение количества последних по сравнению животными, получающими физраствор (см. рис. 5). Изменение этих отдельных поведенческих параметров позволяет судить в целом об усилении агрессивного поведения у ручных крыс. Из ранее полученных данных в тесте резидент–интродер после 5-дневных аппликаций окситоцина с такой же дозой, как и в данной работе (20 мкл с концентрацией 1 мкг/мкл), у ручных крыс увеличивается не только количество ударов задними лапами, но и продолжительность агрессивных взаимодействий, боковых стоек угроз, а также количество атак, тогда как однократные аппликации окситоцина с большей концентрацией 2 мкг/мкл не оказывали достоверного влияния на поведение ручных крыс в тесте резидент–интродер (Gulevich et al., 2019).

Для понимания феномена обратного эффекта увеличения дозы окситоцина требуются дальнейшие исследования. Усиление отдельных параметров агрессивного поведения у ручных самцов крыс под влиянием экзогенного окситоцина по сравнению с контролем при стрессирующих условиях взаимодействия с оппонентом на незнакомой нейтральной территории не противоречит данным других исследователей. К примеру, исследования на domestцированных животных (собаки, коровы и свиньи) и человеку также свидетельствуют, что окситоцин в условиях стресса может способствовать парадоксальному ответу на нейтральное или даже аффилиативное (или позитивное) взаимодействие, усиливая агрессию и стресс-ответ (Rault et al., 2013; Hernádi et al., 2015; Yayou et al., 2015; Crespi, 2016; Shamay-Tsoory, Abu-Akel, 2016).

Методом автордиографии у самцов крыс Groningen с максимальным проявлением агрессивности показано, что экспрессия рецепторов окситоцина в центральной миндалине и ядре ложа терминальной полоски была выше, чем у менее агрессивных крыс, что, по мнению F. Calcagnoli с коллегами (2014), может частично компенсировать пониженную секрецию окситоцина в ПВЯ гипоталамуса у первых, а также повышать их чувствительность к введению эндогенного окситоцина. Причем экспрессия рецепторов окситоцина в обоих регионах коррелировала с продолжительностью наступательной агрессии в 10-минутном тесте резидент–интродер. В связи с этим можно ожидать, что у крыс, селекционируемых на агрессивное поведение, экспрессия рецепторов окситоцина в центральной миндалине и ядре ложа терминальной полоски также выше, чем у ручных крыс. Для определения уровня экспрессии рецепторов окситоцина в этих отделах мозга у крыс, селекционируемых по поведению, необходимы дальнейшие исследования.

Как уже отмечалось выше, у человека максимально выраженные просоциальные эффекты назального введения окситоцина наблюдали у лиц с низкой социальной мотивацией или избегающих социального общения (Bartz et al., 2015; Soriano et al., 2020). Поскольку в наших исследованиях антиагрессивный эффект окситоцина отмечается только у агрессивных крыс, поведение которых отличается не только высокой агрессией по отношению к человеку, но и устойчивым и крайним проявлением внутривидовой

межсамцовой агрессии, по-видимому, этих крыс можно рассматривать в качестве модельных для исследования механизмов, а также подходов к лечению спектра таких нейropsychиатрических заболеваний, как аутизм, социальная тревожность и депрессия.

Исследования, проведенные на крысах и полевках, свидетельствуют о функциональной взаимосвязи окситоциновой системы и ГГНС (Neumann et al., 2000; Engelmann et al., 2004; Smith, Wang, 2014). При повышении активности эндогенной окситоциновой системы в случае лактации или после социальных взаимодействий отмечают ослабление секреции адренокортикотропного гормона и кортикостерона в покое и после стрессирующих воздействий, как, например, присутствия оппонента конспецифика (Neumann et al., 2000; Engelmann et al., 2004; Smith, Wang, 2014). Ингибирующее действие окситоцина на ГГНС при стрессе может осуществляться путем торможения транскрипции гена кортикотропин-рилизинг гормона *Crh* в гипоталамусе (Jurek et al., 2015). Можно предполагать, что повышенное количество содержащих окситоцин клеток в правой половине СОЯ у ручных крыс, по сравнению с агрессивными, связано с пониженной экспрессией гена *Crh* в гипоталамусе, о чем сообщалось нами ранее как для интактных, так и для животных после аппликаций окситоцина (Herbeck et al., 2017; Gulevich et al., 2019).

Заключение

Таким образом, ослабление или, наоборот, усиление агрессивного поведения под влиянием экзогенного окситоцина у крыс, селекционируемых по поведению, обусловлено различиями в активности эндогенной окситоциновой системы и, возможно, ее функциональной взаимосвязи с ГГНС, которая играет важную роль в регуляции поведения и существенно изменяется под влиянием отбора по поведению.

Список литературы / References

- Павлова И.В. Функциональная асимметрия мозга при мотивационных и эмоциональных состояниях: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2001
[Pavlova I.V. Functional brain asymmetry in motivational and emotional conditions: Doctor Sci (Biol.) Dissertation. Moscow, 2001 (in Russian)]
- Плюснина И.З., Соловьева М.Ю. Внутривидовая межсамцовая агрессия у ручных и агрессивных серых крыс. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. 2010;60(2):175-183
[Plyusnina I., Solov'eva M. Intraspecific intermale aggression in tame and aggressive Norway rats. *Zhurnal Vysshei Nervnoi Deyatel'nosti imeni I.P. Pavlova*. 2010;60(2):175-183 (in Russian)]
- Симонов П.В. Мотивированный мозг. М.: Наука, 1987
[Simonov P.V. The Motivated Brain. Moscow: Nauka Publ., 1987 (in Russian)]
- Симонов П.В. О нервных центрах эмоций. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. 1993;43(3):514-529
[Simonov P.V. The nerve centers of the emotions. *Zhurnal Vysshei Nervnoi Deyatel'nosti imeni I.P. Pavlova*. 1993;43(3):514-529 (in Russian)]
- Судаков К.В. Нейрофизиологические основы доминирующих мотиваций. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 1993; 7:42-48
[Sudakov K.V. The neurophysiological grounds of dominating motivation. *Vestnik Rossiiskoy Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 1993;7:42-48 (in Russian)]

- Aydogan G., Jobst A., Loy F., Dehning S., Zill P., Müller N., Kocher M. The effect of oxytocin on group formation and strategic thinking in men. *Horm Behav.* 2018;100:100-106. doi 10.1016/j.yhbeh.2018.02.003
- Bartz J.A., Lydon J.E., Kolevzon A., Zaki J., Hollander E., Ludwig N., Bolger N. Differential effects of oxytocin on agency and communion for anxiously and avoidantly attached individuals. *Psychol Sci.* 2015;26(8):1177-1186. doi 10.1177/0956797615580279
- Calcagnoli F., de Boer S.F., Althaus M., de Boer J.A., Koolhaas J.M. Antiaggressive activity of central oxytocin in male rats. *Psychopharmacology.* 2013;229(4):639-651. doi 10.1007/s00213-013-3124-7
- Calcagnoli F., de Boer S.F., Beiderbeck D.I., Althaus M., Koolhaas J.M., Neumann I.D. Local oxytocin expression and oxytocin receptor binding in the male rat brain is associated with aggressiveness. *Behav Brain Res.* 2014;261:315-322. doi 10.1016/j.bbr.2013.12.050
- Calcagnoli F., Kreutzmann J.C., de Boer S.F., Althaus M., Koolhaas J.M. Acute and repeated intranasal oxytocin administration exerts anti-aggressive and pro-affiliative effects in male rats. *Psychoneuroendocrinology.* 2015;51:112-121. doi 10.1016/j.psyneuen.2014.09.019
- Castel M., Gainer H., Dellmann H.D. Neuronal secretory systems. *Int Rev Cytol.* 1984;88:303-459. doi 10.1016/s0074-7696(08)62760-6
- Crespi B.J. Oxytocin, testosterone, and human social cognition. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2016;91(2):390-408. doi 10.1111/brv.12175
- de Jong T.R., Neumann I.D. Oxytocin and aggression. *Curr Top Behav Neurosci.* 2018;35:175-192. doi 10.1007/7854_2017_13
- Eliava M., Melchior M., Knobloch-Bollmann H.S., Wahis J., da Silva Gouveia M., Tang Y., Ciobanu A.C., ... Poisbeau P., Seeburg P.H., Stoop R., Charlet A., Grinevich V. A new population of parvocellular oxytocin neurons controlling magnocellular neuron activity and inflammatory pain processing. *Neuron.* 2016;89(6):1291-1304. doi 10.1016/j.neuron.2016.01.041
- Engelmann M., Landgraf R., Wotjak C.T. The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol.* 2004;25:132-149. doi 10.1016/j.yfrne.2004.09.001
- Grinevich V., Neumann I. Brain oxytocin: how puzzle stones from animal studies translate into psychiatry. *Mol Psychiatry.* 2021;26(1):265-279. doi 10.1038/s41380-020-0802-9
- Grinevich V., Desarménien M., Chini B., Tauber M., Muscatelli F. Ontogenesis of oxytocin pathways in the mammalian brain: late maturation and psychosocial disorders. *Front Neuroanat.* 2015;8:164. doi 10.3389/fnana.2014.00164
- Gulevich R., Kozhemyakina R., Shikhevich S., Konoshenko M., Herbeck Yu. Aggressive behavior and stress response after oxytocin administration in male Norway rats selected for different attitudes to humans. *Physiol Behav.* 2019;199:201-218. doi 10.1016/j.physbeh.2018.11.030
- Herbeck Y.E., Gulevich R.G. Neuropeptides as facilitators of domestication. *Cell Tissue Res.* 2019;375(1):295-307. doi 10.1007/s00441-018-2939-2
- Herbeck Y.E., Amelkina O.A., Konoshenko M.Yu., Shikhevich S.G., Gulevich R.G., Kozhemyakina R.V., Plyusnina I.Z., Oskina I.N. Effects of neonatal handling on behavior and stress response in rats selected for their reaction towards humans. *Russ J Genet Appl Res.* 2017;7(1):71-81. doi 10.1134/S2079059717010051
- Hernádi A., Kis A., Kanizsár O., Tóth K., Miklósi B., Topál J. Intranasally administered oxytocin affects how dogs (*Canis familiaris*) react to the threatening approach of their owner and an unfamiliar experimenter. *Behav Processes.* 2015;119:1-5. doi 10.1016/j.beproc.2015.07.001
- Jurek B., Neumann I. The oxytocin receptor: from intracellular signaling to behavior. *Physiol Rev.* 2018;98(3):1805-1908. doi 10.1152/Physrev.00031.2017
- Jurek B., Slattery D.A., Hiraoka Y., Liu Y., Nishimori K., Aguilera G., Neumann I.D., van den Burg E.H. Oxytocin regulates stress-induced *Crf* gene transcription through CREB-regulated transcription co-activator 3. *J Neurosci.* 2015;35(35):12248-12260. doi 10.1523/JNEUROSCI.1345-14.2015
- Kiss D.S., Toth I., Jocsak G., Barany Z., Bartha T., Frenyo L.V., Horvath T.L., Zsarnovszky A. Functional aspects of hypothalamic asymmetry. *Brain Sci.* 2020;10(6):389. doi 10.3390/brainsci10060389
- Knobloch S., Charlet A., Hoffmann L.C., Eliava M., Khrulev S., Cetin A.H., Osten P., Schwarz M.K., Seeburg P.H., Stoop R., Grinevich V. Evoked axonal oxytocin release in the central amygdala attenuates fear response. *Neuron.* 2012;73(3):553-566. doi 10.1016/j.neuron.2011.11.030
- Kozhemyakina R.V., Shikhevich S.G., Konoshenko M.Yu., Gulevich R.G. Adolescent oxytocin treatment affects resident behavior in aggressive but not tame adult rats. *Physiol Behav.* 2020;224:113046. doi 10.1016/j.physbeh.2020.113046
- Marsh N., Marsh A.A., Lee M.R., Hurlmann R. Oxytocin and the neurobiology of prosocial behavior. *Neuroscientist.* 2021;27(6):604-619. doi 10.1177/1073858420960111
- Neumann I. Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviours in both females and males. *J Neuroendocrinol.* 2008;20(6):858-865. doi 10.1111/j.1365-2826.2008.01726.x
- Neumann I.D., Slattery D.A. Oxytocin in general anxiety and social fear: a translational approach. *Biol Psychiatry.* 2016;79(3):213-221. doi 10.1016/j.biopsych.2015.06.004
- Neumann I., Wigger A., Torner L., Holsboer F., Landgraf R. Brain oxytocin inhibits basal and stress-induced activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in male and female rats: partial action within the paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol.* 2000;12(3):235-243. doi 10.1046/j.1365-2826.2000.00442.x
- Neumann I., Maloumy R., Beiderbeck D.I., Lukas M., Landgraf R. Increased brain and plasma oxytocin after nasal and peripheral administration in rats and mice. *Psychoneuroendocrinology.* 2013;38(10):1985-1993. doi 10.1016/j.psyneuen.2013.03.003
- Plyusnina I., Oskina I. Behavioral and adrenocortical responses to open-field test in rats selected for reduced aggressiveness toward humans. *Physiol Behav.* 1997;61(3):381-385. doi 10.1016/s0031-9384(96)00445-3
- Plyusnina I.Z., Solov'eva M.Y., Oskina I.N. Effect of domestication on aggression in gray Norway rats. *Behav Genet.* 2011;41(4):583-592. doi 10.1007/s10519-010-9429-y
- Rault J.-L., Carter C.S., Garner J.P., Marchant J.N., Richert B.T., Lay D.C. Jr. Repeated intranasal oxytocin administration in early life dysregulates the HPA axis and alters social behavior. *Physiol Behav.* 2013;112-113:40-48. doi 10.1016/j.physbeh.2013.02.007
- Shamay-Tsoory S.G., Abu-Akel A. The social salience hypothesis of oxytocin. *Biol Psychiatry.* 2016;79(3):194-202. doi 10.1016/j.biopsych.2015.07.020
- Smith A.S., Wang Z. Hypothalamic oxytocin mediates social buffering of the stress response. *Biol Psychiatry.* 2014;76(4):281-288. doi 10.1016/j.biopsych.2013.09.017
- Soriano J.R., Daniels N., Prinsen J., Alaerts K. Intranasal oxytocin enhances approach-related EEG frontal alpha asymmetry during engagement of direct eye contact. *Brain Commun.* 2020;2(2):fcaa093. doi 10.1093/braincomms/fcaa093
- Takayanagi Y., Onaka T. Roles of oxytocin in stress responses, allostasis and resilience. *Int J Mol Sci.* 2021;23(1):150. doi 10.3390/ijms23010150
- Tang Y., Benusiglio D., Lefevre A., Hilfiger L., Althammer F., Bludau A., Hagiwara D., ... Stern J.E., Leng G., Neumann I.D., Charlet A., Grinevich V. Social touch promotes interfemale communication via activation of parvocellular oxytocin neurons. *Nat Neurosci.* 2020;23(9):1125-1137. doi 10.1038/s41593-020-0674-y
- Yayou K., Ito S., Yamamoto N. Relationships between postnatal plasma oxytocin concentrations and social behaviors in cattle. *Anim Sci J.* 2015;86(8):806-813. doi 10.1111/asj.12363
- Yoon S., Kim Yu. The role of the oxytocin system in anxiety disorders. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1191:103-120. doi 10.1007/978-981-32-9705-0_7

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 04.12.2024. После доработки 12.03.2025. Принята к публикации 06.06.2025.

doi 10.18699/vjgb-25-93

Последовательности ДНК агробактериального происхождения в филогенетических исследованиях растений

Т.В. Матвеева , П.М. Журбенко , Г.В. Хафизова , А.Д. Шапошников , Р.Р. Жидкин , А.В. Родионов ¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия² Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия³ Хьюстонский университет, Хьюстон, США radishlet@gmail.com

Аннотация. Агробактериальная трансформация – наиболее распространенный метод получения трансгенных растений. Метод основан на способности определенных почвенных бактерий родов *Agrobacterium* и *Rhizobium* переносить и интегрировать в хромосому растения-реципиента фрагмент своей плазмиды. Этот фрагмент получил название Т-ДНК (transferred DNA – переносимая ДНК). В лабораторных условиях было показано, что из трансгенных клеток можно регенерировать целые растения. Вскоре стало ясно, что подобные процессы происходят и в природе, приводя к появлению природно-трансгенных растений или природных генно-инженерно-модифицированных организмов (ГМО). Таким образом, природно-трансгенными называются растения, у которых в геномах присутствуют гомологи генов Т-ДНК агробактерий (клеточные Т-ДНК, клТ-ДНК). Эти последовательности наследуются в ряду половых поколений и сохраняют свою функциональность. Кроме того, продемонстрирована возможность использования новоприобретенных растениями последовательностей в филогенетических исследованиях, поскольку клТ-ДНК являются четко определенными, высокоспецифичными и узнаваемыми фрагментами ДНК, не похожими на последовательности ДНК растений. Они не встречаются у нетрансформированных предков, и их интеграция в определенном хромосомном сайте маркирует монофилетическую группу видов. В представленном обзоре освещены вопросы разнообразия клТ-ДНК, возможности их применения как филогенетических маркеров, в том числе описаны основные методические подходы таких работ, на конкретных примерах рассмотрены возможности уточнения спорных моментов в филогении родов *Nicotiana*, *Camellia*, *Vaccinium* и *Arachis*. Важным моментом филогенетического анализа на основе клТ-ДНК является реконструкция отдельных аллелей. Это дает возможность отслеживать факты межвидовой гибридизации. Именно этот подход позволил продемонстрировать незавершенный процесс видообразования в пределах секции *Thea* рода *Camellia*, а также подтвердил использование межвидовой гибридизации в ходе селекции североамериканских голубик. В обзоре рассмотрены вопросы датировки событий трансформации на основе клТ-ДНК, организованных в виде несовершенных повторов, а также использования филогенетических исследований при изучении вопросов биоразнообразия генов Т-ДНК агробактериального происхождения.

Ключевые слова: агробактериальная трансформация; клеточная Т-ДНК; филогенетика; *Nicotiana*; *Camellia*; *Vaccinium*; *Arachis*

Для цитирования: Матвеева Т.В., Журбенко П.М., Хафизова Г.В., Шапошников А.Д., Жидкин Р.Р., Родионов А.В. Последовательности ДНК агробактериального происхождения в филогенетических исследованиях растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(6):856-867. doi 10.18699/vjgb-25-93

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант 25-26-00123.

Agrobacterium-derived DNA sequences in phylogenetic studies of plants

T.V. Matveeva , P.M. Zhurbenko , G.V. Khafizova , A.D. Shaposhnikov , R.R. Zhidkin , A.V. Rodionov ¹ Saint-Petersburg State University, St. Petersburg, Russia² Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia³ University of Houston, Houston, United States radishlet@gmail.com

Abstract. One of the main methods for obtaining transgenic plants is *Agrobacterium*-mediated transformation. This process relies on the ability of certain soil bacteria, specifically from the genera *Agrobacterium* and *Rhizobium*, to transfer and integrate a fragment of their plasmid into the chromosome of the recipient plant. This transferred DNA is referred to as T-DNA. Laboratory studies have demonstrated that whole plants can be regenerated from transgenic cells. It soon became evident that similar processes occur in nature, leading to the emergence of naturally transgenic plants, or natural GMOs. Thus, naturally transgenic plants possess homologues of the T-DNA genes from agrobacteria

in their genomes (cellular T-DNA, or cT-DNA). These sequences are inherited through multiple sexual generations and retain their functionality. Furthermore, the potential for using newly acquired plant sequences in phylogenetic studies has been established, as cT-DNAs are clearly defined, highly specific, and recognizable DNA fragments that differ from typical plant DNA sequences. They are not found in untransformed ancestors, and their integration at specific chromosomal sites marks a monophyletic group of species. This review highlights the diversity of cellular T-DNAs and their potential use as phylogenetic markers. It includes a description of the main methodological approaches to such studies and discusses specific examples that clarify controversial points in the phylogeny of the genera *Nicotiana*, *Camellia*, *Vaccinium*, and *Arachis*. An important aspect of phylogenetic analysis based on cT-DNA is the assembly of individual alleles, which enables the tracking of interspecific hybridization events. This approach demonstrated the incomplete process of speciation within the *Thea* section of the genus *Camellia* and confirmed the role of interspecific hybridization in the breeding of North American blueberries. The review also addresses the dating of transformation events based on cT-DNA, which are organized in the form of imperfect repeats, as well as the application of phylogenetic studies to investigate the biodiversity of agrobacterial T-DNA genes.

Key words: agrobacterium-mediated transformation; cellular T-DNA; phylogenetics; *Nicotiana*; *Camellia*; *Vaccinium*; *Arachis*

For citation: Matveeva T.V., Zhurbenko P.M., Khafizova G.V., Shaposhnikov A.D., Zhidkin R.R., Rodionov A.V. Agrobacterium-derived DNA sequences in phylogenetic studies of plants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(6):856-867. doi 10.18699/vjgb-25-93

Введение

Агробактериальная трансформация – наиболее распространенный на сегодняшний день метод получения трансгенных растений для нужд сельского хозяйства, медицины, ветеринарии и других отраслей народного хозяйства. Метод основан на способности почвенных бактерий *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend 1907) Conn 1942 (Approved Lists 1980) и *Rhizobium rhizogenes* (Riker et al. 1930) Young et al. 2001 переносить фрагмент своей плазмиды и интегрировать его в ДНК растения (Schell, Van Montagu, 1977; Bahramnejad et al., 2019). Эти последовательности получили название Т-ДНК (T-DNA, transferred DNA – переносимая ДНК).

В природных условиях процесс переноса и интеграции Т-ДНК в хромосому растения-хозяина обычно вызывает разрастание трансгенной ткани на нормальном растении по причине экспрессии генов Т-ДНК, ответственных за регуляцию морфогенеза (Nester, 2015). Однако описана возможность регенерации полностью трансгенных растений из таких тканей (Terfer, 1990; Christey, 2001). Множество фактов указывает на то, что этот процесс происходит и в природе, без участия человека, в результате чего появляются формы, содержащие в геномах последовательности бактериального происхождения и передающие их в ряду половых поколений (Матвеева, 2021). Первые природно-трансгенные растения были обнаружены среди представителей рода *Nicotiana* в 1983 г. (White et al., 1982, 1983), а к настоящему времени известны десятки родов двудольных, в пределах которых описаны природно-трансгенные виды (Matveeva, Otten, 2019; Matveeva, 2021). Т-ДНК в составе геномов природных ГМО (пГМО) получила название клеточной Т-ДНК (клТ-ДНК) (Матвеева, 2021). Сопоставляя количество видов с секвенированными геномами и количество пГМО среди них, можно сказать, что следы агробактериальной трансформации сохранились у семи процентов видов двудольных растений (Matveeva, Otten, 2019). Таким образом, в руки ученых попал обширный материал для изучения функций бактериальных генов в растениях, их эволюционной судьбы.

Не менее интересные данные были получены с использованием Т-ДНК как филогенетического маркера,

поскольку новоприобретенные последовательности имеют несколько преимуществ для изучения происхождения и эволюции видов пГМО (Матвеева и др., 2011; Chen et al., 2022; Zhidkin et al., 2023; Bogomaz et al., 2024). Так, клТ-ДНК являются четко определенными, высокоспецифичными и узнаваемыми фрагментами ДНК, не похожими на последовательности ДНК растений. Они не встречаются у нетрансформированных предков, и их интеграция в определенном хромосомном сайте маркирует монофилетическую группу видов. Как правило, клТ-ДНК представлены единичными вставками, что служит значительным преимуществом по сравнению с классическими ядерными маркерами. Наконец, клТ-ДНК могут быть достаточно протяженными и древними, накапливающими однонуклеотидные замены (ОНЗ), что позволяет строить филогенетические деревья. Вероятность того, что в двух независимых филогенетических ветвях одна и та же последовательность Т-ДНК встретится в геноме в одну и ту же мишень, с идентичными границами, кажется нам событием не исключенным, но маловероятным. Это делает инсерции Т-ДНК, так же как инсерции в геноме транспозонов, чрезвычайно важными синапоморфиями (Shedlock, Okada, 2000; Doronina et al., 2022) и, следовательно, мощными инструментами для систематики. Их анализ в масштабах генома также может помочь выявить причины конфликта филогенетического сигнала в случае его возникновения (Kuritzin et al., 2016). Наконец, повторяющиеся последовательности в клТ-ДНК могут использоваться для оценки времени с момента трансформации или в качестве относительных временных маркеров (Chen et al., 2022).

Структуры Т-ДНК

Физическая структура Т-ДНК различается между плазмидами из разных штаммов агробактерий и может быть классифицирована в зависимости от количества переносимых в геном растения фрагментов, закодированных в одной плазмиде. Т-ДНК может быть непрерывной, как, например, у маннопиновых, микимопиновых и кукумопиновых штаммов (Jouanin, 1984; Hansen et al., 1991). Она представляет собой непрерывный участок ДНК, фланкированный пограничными последовательностями на обоих

концах (как в плазмиде pRi8196). В плаزمиде другого типа, например в pRiA4, Т-ДНК разделена на два сегмента – TL-ДНК и TR-ДНК (White et al., 1985), между которыми находится в качестве спейсера не переносимый у растения участок ДНК размером около 15 kb. Независимо от различий их структуры, во всех упомянутых выше Т-ДНК содержатся гены синтеза опинов, используемые агробактериями как источник питания, и так называемые онкогены, продукты которых заставляют растительные клетки делиться.

Структуры клТ-ДНК пГМО более разнообразны. Среди них преобладают те, что содержат только гены синтеза опинов. Этот феномен можно объяснить, по крайней мере, тремя способами. Во-первых, в известных к настоящему времени Т-ДНК гены синтеза опинов находятся ближе к правой границе. При вырезании одноцепочечной Т-ДНК из плазмиды в ходе трансформации белок VirD2 ковалентно связывается с 5'-концом Т-ДНК у ее правой границы, а затем направляет Т-цепь через систему секреции белка типа IV в растительную клетку (Gelvin, 2021). Поскольку делеции происходят при интеграции Т-ДНК в хромосому растения, то они более обширны на 3'-, чем на 5'-конце, который пространственно защищен белком VirD2 (Gelvin, 2021). Во-вторых, можно ожидать наличие штаммов агробактерий, в Т-ДНК которых присутствуют только гены опин-синтаз. В-третьих, нельзя исключать возможность потери большей части Т-ДНК уже после ее интеграции в хромосому в процессе эволюции потомков природного трансформанта с сохранением только генов синтеза опинов, поскольку они не влияют на морфогенез в той степени, как онкогены, иными словами, не приводят к аномалиям роста и развития (Matveeva, Otten, 2021).

На втором месте по распространенности находятся протяженные фрагменты Т-ДНК с онкогенами и генами синтеза опинов. Эти клТ-ДНК, как правило, представлены инвертированными несовершенными повторами. Данную особенность можно использовать при датировке актов трансформации. Наименее распространенными являются клТ-ДНК, содержащие только онкогены (Matveeva, Otten, 2019; Matveeva, 2021).

Рассмотрим подробнее вопрос датировки актов возникновения пГМО в ходе эволюции.

Подходы к определению времени событий трансформаций у пГМО

Датировка событий трансформации у пГМО может быть проведена на основе метода молекулярных часов. Особенности механизма интеграции Т-ДНК в геном инфицированного растения приводят к образованию повторяющихся последовательностей Т-ДНК или ее участков (Tzfira et al., 2004, Singer, 2018). Эти повторы являются длинными клТ-ДНК, которые представлены несовершенными инвертированными повторами или их частями, образовавшимися в ходе делеции участка или его встраивания (Matveeva, Otten, 2019; Matveeva, 2021). Используя различия последовательности нуклеотидов таких повторов, можно определить с помощью коэффициента нуклеотидных замен приблизительное время расхождения данных повторов и, как следствие, время интеграции Т-ДНК в геном будущего пГМО (Gaut et al., 1996).

Расчет времени трансформации можно провести по формуле

$$T = \frac{d}{2r},$$

где T – приблизительное время интеграции клТ-ДНК; d – отношение нуклеотидных различий двух повторов; r – средний коэффициент нуклеотидных замен, 6.5×10^{-9} замены на сайт в год (Gaut et al., 1996; Lynch, Conery, 2000). На основе этого подхода была проведена датировка интеграции Т-ДНК у представителей рода *Camellia*, которые содержат различные структурные типы клТ-ДНК (Chen et al., 2022, 2023). Согласно этой датировке, наиболее древняя из вставок была интегрирована в геном около 7.5 млн лет назад, тогда как наиболее молодая была интегрирована 0.04 млн лет назад (Chen et al., 2023)¹.

Однако этот подход имеет ряд ограничений, которые не позволяют использовать его для определения времени интеграции многих клТ-ДНК. Первое из ограничений – невозможность обнаружения инвертированных повторов у всех клТ-ДНК, так как большая часть видов пГМО не содержит протяженных клТ-ДНК, где можно найти повторяющиеся прямые и инвертированные последовательности (Matveeva, 2021). Вторым является то, что даже не все протяженные клТ-ДНК имеют повторы. Так, только 6 из 12 типов клТ-ДНК у представителей рода *Camellia* содержат повторы, которые позволяют определить время интеграции (Chen et al., 2023). Еще одно важное условие при выборе последовательностей для датировки – необходимость исключить, что эти повторы могли образоваться в процессе других геномных перестроек, например в результате активности мобильных элементов генома.

Метод датировки клТ-ДНК, несомненно, следует использовать вместе с другими подходами, которые позволят точно оценить скорость нуклеотидных замен именно в этом виде, сравнить время дивергенции с другими близкородственными таксонами для валидации полученных данных. Хотя данный метод датировки времени трансформации пГМО еще требует дальнейшей доработки и верификации, он может позволить лучше понять эволюционный процесс, который претерпевали пГМО после агробактериальной трансформации.

Множественные акты трансформации в эволюции рода *Nicotiana*

Изучение феномена генетической трансформации растений в природе без участия человека началось с вида *Nicotiana glauca* Graham, в ядерном геноме которого были обнаружены последовательности, гомологичные агробактериальным Т-ДНК (White et al., 1983). Первая найденная клТ-ДНК была названа gT. Она была организована как несовершенный инвертированный повтор и состояла из одной копии гомолога *rolB* и двух копий гомологов *rolC*, *ORF13*, *ORF1* и *mis* (Suzuki et al., 2002). Последовательность gT послужила отправной точкой для проведения поиска клТ-ДНК в геномах других видов рода *Nicotiana* L. (Furner et al., 1986; Intrieri, Buiatti, 2001). На сегодняшний

¹ В результате общения с авторами статьи было уточнено, что приведенные в статье данные о времени вставок рассчитаны по ошибочной формуле, а именно завышены в два раза. В нашем обзоре приводятся корректные значения.

день известно о 16 природно-трансгенных видах данного рода (Otten, 2020). Род *Nicotiana* включает двенадцать секций (Knapp et al., 2004), в шести из которых описаны природно-трансгенные представители.

Поиск и анализ клТ-ДНК в растительных геномах долгое время осуществлялся на уровне отдельных генов (Furber et al., 1986; Meyer et al., 1995; Intrieri, Buiatti, 2001). В тот же период были предприняты попытки реконструкции филогенетических связей между клТ-ДНК разных видов табака и Т-ДНК агробактерий. Однако дальнейшие исследования поставили под сомнение некоторые более ранние эволюционные построения. Переход к полногеномным данным позволил не только искать клТ-ДНК и изучать их состав, но также оценивать их количество и сайты локализации в растительном геноме. Первый такой анализ был проведен для *N. tomentosiformis* Goodsp. (Chen et al., 2014), в геноме которого были найдены четыре разные по составу клТ-ДНК (ТА, ТВ, ТС и ТD) (см. таблицу), отличные от ранее исследованной гТ в *N. glauca* (Suzuki et al., 2002). Таким образом, стало ясно, что использование участков клТ-ДНК в качестве филогенетического маркера необходимо начинать с оценки количества клТ-ДНК в геноме и их сайтов локализации, маркирующих потомков конкретных событий трансформации.

Множественные протяженные клТ-ДНК у видов табака были использованы для датировки событий трансформации в эволюции. Было показано, что у *N. tomentosiformis* все четыре клТ-ДНК являются результатами независимых актов агробактериальной трансформации, произошедших в разное время. Клеточная Т-ДНК ТС была определена как самая древняя. По приблизительной оценке ее возраст составил 1 млн лет (Chen et al., 2014). Позже в геноме вида *N. otophora* Griseb., филогенетически близкого к *N. tomentosiformis*, были найдены две копии ТС, различающиеся между собой на 4 % и расположенные в том же сайте, что и ТС *N. tomentosiformis*. Общий сайт локализации указывает на то, что клТ-ДНК ТС, скорее всего, была получена неким общим для *N. tomentosiformis* и *N. otophora* предковым видом (рис. 1).

В ходе эволюции данного вида, вероятно, случилась дупликация ТС, после чего образовались вид *N. otophora*, несущий в геноме две копии ТС, и *N. tomentosiformis*, утративший одну копию ТС в ходе видообразования (Chen et al., 2018). Попытки восстановить ход эволюционных событий, в том числе видообразования, в роду *Nicotiana* осложняет свойственный ему ретикулярный, или сетчатый, тип эволюции, для которого характерно частичное слияние предковых ветвей с образованием гибридных форм (Knapp et al., 2004). Так, например, известный представитель рода *Nicotiana*, *N. tabacum* L. (культурный табак), является межвидовым гибридом *N. tomentosiformis* и *N. sylvestris* Speg. (Yukawa et al., 2006). Геном *N. tabacum* содержит три из четырех клТ-ДНК, найденных у *N. tomentosiformis* (ТА, ТВ, ТD), на основании чего можно предположить, что события агробактериальной трансформации *N. tomentosiformis* предшествовали видообразованию *N. tabacum* (Chen et al., 2014). В пользу данного предположения свидетельствует оценка времени видообразования *N. tabacum*, проведенная методами про-

Структуры клТ-ДНК у *N. tomentosiformis*

Название	Перечень генов (в скобках отмечены плечи несовершенных инвертированных повторов)
ТА	(<i>orf8, orf3, rolA, rolB, rolC, orf13, orf14, mis</i>) (<i>mis, orf14, orf13, rolC, rolB, rolA, orf8</i>)
ТВ	(<i>mis, orf14</i>) (<i>orf14, mis, ags-like, mas1', mas2'</i>)
ТС	(<i>ocl, orf2, orf3, orf8, rolA, rolB</i>) (<i>rolB, rolA, orf8, orf3, orf2, c</i>)
ТD	(<i>orf14</i>), (<i>orf55, orf 15, orf511, (orf1)</i>)

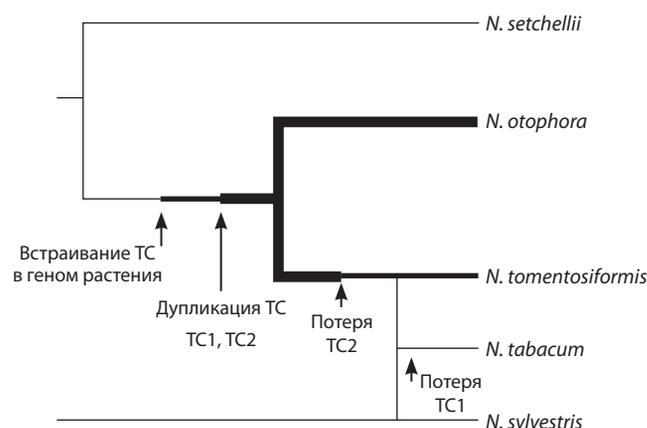


Рис. 1. Модель эволюции клТ-ДНК ТС в геномах *Nicotiana*.

Толщина линий отражает присутствие в геноме вида одной или двух копий ТС либо ее отсутствие, по (Chen et al., 2018).

точной цитометрии и геномной гибридизации, согласно которой возраст вида составляет менее 600 лет (Leitch et al., 2008). КлТ-ДНК ТС, копия которой содержится в геноме предкового вида *N. tomentosiformis*, вероятно, была утрачена в ходе видообразования *N. tabacum* (Chen et al., 2014) (см. рис. 1). Используя данные датировок клТ-ДНК и результаты оценки времени видообразования, можно проследить путь ТС от первого переноса ее в растительный геном до утраты либо закрепления в различных видах, произошедших от предковой формы на разных этапах эволюции рода.

Все вышеописанные представители относятся к секциям *Tomentosae* и *Nicotiana*. Для представителей секции *Noctiflorae* (*N. glauca*, *N. noctiflora* Hook.) тоже описано присутствие трех различающихся клТ-ДНК, полученных в ходе независимых актов трансформации (одна вставка в геноме *N. glauca*, две другие – в *N. noctiflora*) (Khafizova et al., 2023), однако для восстановления филогенетических отношений в данной ветви необходимо больше природно-трансгенных представителей с секвенированными геномами.

Таким образом, степень изученности таксона напрямую связана с доступностью материала и его хозяйственной значимостью. Внутривидовое разнообразие культурного табака также представляет интерес, поэтому в следующем разделе мы остановимся на использовании клТ-ДНК в исследовании этого вопроса.

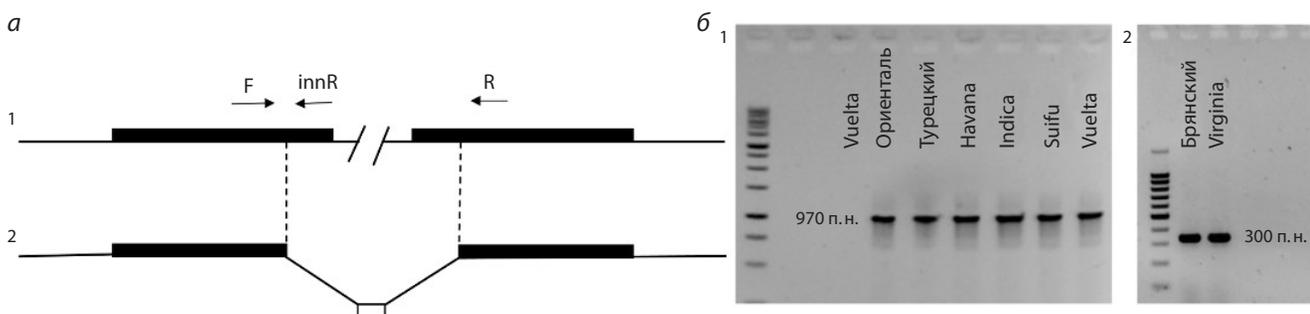


Рис. 2. КлТ-ДНК ТА в геномах *N. tabacum*.

a – схема ТА; центральная часть не показана, черными прямоугольниками отмечен ген *orf13*, штриховыми линиями – границы делеции. Отмечены праймеры, подобранные в работе (Хафизова, Матвеева, 2020); 1 – клТ-ДНК ТА без делеции; 2 – клТ-ДНК ТА с делецией, белым прямоугольником показана последовательность неизвестного происхождения длиной 42 п.н.; *б* – фрагменты, полученные с использованием праймеров F и *innR* (1), F и R (2) при ПЦР-анализе восьми сортов *N. tabacum*, по (Хафизова, Матвеева, 2020).

Внутривидовая изменчивость клТ-ДНК у табака

Nicotiana tabacum, или культурный табак, – аллотетраплоид, образовавшийся в ходе межвидовой гибридизации видов *N. tomentosiformis* и *N. sylvestris* (Yukawa et al., 2006). Количество существующих сортов и разновидностей *N. tabacum* насчитывает десятки тысяч, при этом родственные отношения между ними установлены далеко не во всех случаях (Moon et al., 2009; Fricano et al., 2012; Sierro et al., 2014). В основе самой широко используемой сегодня внутривидовой классификации культурного табака лежат различия в морфологии растений, а также в количественном и качественном составе их вторичных метаболитов. Данные показатели определяют ключевые характеристики табачного сырья, а саму классификацию называют рыночной (Lewis, Nicholson, 2007). Всего выделяют восемь рыночных классов: Берли, наполнитель для сигар, табак для закручивания сигар, темный табак воздушной сушки, темный табак паровой сушки, табак дымовой сушки, Мэриленд и восточный табак (Moon et al., 2009). При том, что среди сортов культурного табака наблюдается высокий уровень фенотипической изменчивости (Lewis, Nicholson 2007), уровень нуклеотидной изменчивости, выявленный методами полиморфизма длины рестриционного фрагмента (RFLP), случайно амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD), маркерами полиморфизма длины амплифицированного фрагмента (AFLP) и полногеномным поиском ассоциаций (GWAS), сравнительно невысок (Brandle, Bai, 1999; Ren, Timko, 2001; Rossi et al., 2001; Tong et al., 2020).

Для проведения филогенетического анализа и построения карты, отражающей истинные родственные отношения внутри вида, необходимо использовать дополнительные молекулярные маркеры. Одним из таких маркеров может служить клТ-ДНК. Изучение клТ-ДНК в полногеномных данных трех сортов *N. tabacum* позволило выявить протяженную делецию в центральной части клТ-ДНК ТА у сорта Basma/Xanti. При этом в сортах K326 и TN90 была обнаружена последовательность ТА без делеции (Chen et al., 2014). Различия в структуре ТА уже были показаны ранее методом ПЦР для сортов *N. tabacum* Basma Drama 2, Samsoun и Xanthi, клТ-ДНК которых содержат неполные последовательности гомолога гена *orf13*, в отличие от клТ-ДНК в сортах Wisconsin 38 и Havana 425, а также в

виде *N. tomentosiformis* (Mohajjel-Shoja et al., 2011). Позже с помощью метода ПЦР были проанализированы еще восемь сортов культурного табака: Vuelta abajo, Suifu, Black Indian, Havana 307, Турецкий, Ориенталь, Брянский 91 и Virginia × Berley 38 (рис. 2). В результате проведенного анализа описанная ранее делеция была обнаружена в сортах Брянский 91 и Virginia × Berley 38, при этом сайт локализации делеции совпал с сайтами делеции в геномах сортов Basma Drama 2, Samsoun, Xanthi и Basma/Xanti с точностью до нуклеотида (Хафизова, Матвеева, 2020).

Таким образом, использование структурного варианта клТ-ДНК в качестве молекулярного маркера позволило отделить сорта, принадлежащие к рыночному классу восточных табачков, в отдельную группу по признаку делеции в ТА. Можно предположить, что центральная часть ТА была утрачена предковой формой *N. tabacum*, которая дала начало данному классу. К настоящему времени делеция в ТА описана только у пяти сортов культурного табака. На основании анализа подобной выборки рано делать вывод о том, является ли наличие данной делеции маркером, по которому сорт может быть отнесен к восточным табачкам. При этом результаты исследований указывают на то, что структурный полиморфизм клТ-ДНК в сортах *N. tabacum* может быть использован в качестве одного из молекулярных маркеров для изучения внутривидовых родственных отношений сортов. С расширением списка секвенированных клТ-ДНК различных сортов культурного табака в перспективе, возможно, будут найдены новые структурные различия в последовательностях клТ-ДНК, на основании которых могут быть разработаны новые маркеры для решения поставленной задачи.

Тонкий полиморфизм клТ-ДНК в филогенетических исследованиях

Тонкий полиморфизм клТ-ДНК общего происхождения в геноме (с общим сайтом локализации) может быть использован для изучения межвидовой изменчивости и реконструкции филогенетических связей внутри монофилиетической группы видов-потомков древнего трансформанта. Важно понимать, что для корректной оценки завершенности процесса видообразования у растений имеет смысл оценить и сопоставить как внутри-, так и межвидовую изменчивость по изучаемым маркерам. С этой целью

было предложено реконструировать отдельные аллели изучаемых маркеров, особенно для перекрестно-опыляемых видов (Chen et al., 2022). Для начала остановимся на методологии разделения аллелей.

Методы исследования

В научной литературе разделением аллелей или гаплотипов (анг. allele phasing/haplotype phasing) называют получение последовательностей фрагментов ДНК, находящихся на одной хромосоме среди пары гомологичных или, в случае полиплоидов, еще и среди гомеологичных хромосом. При этом об аллелях чаще говорят, имея в виду короткие фрагменты, тогда как про гаплотипы – если речь идет о более протяженных участках.

Разделение гаплотипов дает дополнительную информацию по сравнению с информацией, полученной только на основании консенсусной последовательности генома. Точные последовательности гаплотипов используются в самых различных исследованиях, включая филогенетическую реконструкцию (Tiley et al., 2024) и изучение гибридов (Sun et al., 2020).

Существуют разные подходы для разделения гаплотипов (Snyder et al., 2015). Так, можно провести физическое разделение фрагментов гомологичных хромосом с помощью методов молекулярной биологии с дальнейшим секвенированием фрагментов по отдельности. Для этого можно использовать, например, бактериальное клонирование. Другим подходом является разделение гаплотипов на основании данных генотипирования о частотах нуклеотидов в полиморфных позициях в популяции. В этом случае используют различные статистические методы (Browning S.R., Browning B.L., 2011). Однако наиболее активно развивается подход, использующий данные высокопроизводительного секвенирования. Внутри этого подхода можно выделить методы, основанные на сборке коротких прочтений или на картировании коротких прочтений на референсный геном (Zhang et al., 2020). Рассмотрим подробнее последний случай.

Если две полиморфные позиции находятся на одном секвенированном фрагменте ДНК (прочитанном с одного или обоих коротких прочтений), то они принадлежат одному гаплотипу. Последовательность гаплотипа можно продолжать реконструировать, пока находятся фрагменты, соединяющие соседние полиморфные позиции. Соответственно, чем больше плотность полиморфных позиций, длиннее перекрытия между короткими прочтениями и больше глубина прочтения, тем надежнее и длиннее последовательность гаплотипов, которую можно реконструировать. Эти параметры особенно важны при анализе полиплоидных геномов, где необходимо разделить более двух гаплотипов, некоторые из которых могут мало различаться на достаточно протяженных участках (Schrinner et al., 2020).

Перечисленные выше показатели будут зависеть и от технологии секвенирования. Лучших результатов можно достичь с технологиями Hi-Fi, которая позволяет получать длинные прочтения протяженностью несколько десятков тысяч пар нуклеотидов высокого качества с точностью прочтения более 99 % (Wenger et al., 2019). С помощью секвенирования Hi-Fi можно получать сборки протяжен-

ных участков гаплотипов, вплоть до длины всего генома (Tanaka et al., 2023). С использованием технологии Oxford Nanopore можно получать очень длинные прочтения, длиной до нескольких миллионов пар нуклеотидов, но с более низким качеством прочтения – точность около 90 % (Wang Y. et al., 2021). С помощью этих длинных прочтений при достаточной глубине секвенирования можно также успешно разделять на гаплотипы протяженные участки генома. Помимо длинных прочтений, для разделения гаплотипов можно использовать и короткие, получаемые с применением технологии Illumina. Однако такие фрагменты будут ограничены консервативными регионами, где перекрытия прочтений недостаточно для соединения соседних полиморфных позиций.

Одной из популярных программ для разделения гаплотипов является WhatsHap (Martin et al., 2016). Она умеет работать с прочтениями от всех перечисленных методов секвенирования как для диплоидных, так и для полиплоидных организмов. На вход программа требует последовательность референсного генома, файл в формате bam с картированием прочтений на референсный геном и файл в формате vcf, содержащий информацию о полиморфных позициях, отличающих картированные прочтения от референса. Результатом разделения будет модифицированный vcf файл, содержащий информацию о принадлежности полиморфных позиций к гаплотипам. На основании этого файла можно получить информацию о длинах и координатах разделенных фрагментов (haplotype blocks), последовательности гаплотипов в формате fasta, добавить в визуализацию картирования прочтений информацию об их принадлежности к гаплотипам и многое другое.

Разделять аллели можно и путем анализа результатов секвенирования по Сэнгеру. При секвенировании фрагментов ДНК гетерозигот на хроматограммах в одной и той же позиции появляются два «пика», соответствующих определенным нуклеотидам (Carr et al., 2009; Dehairs et al., 2016; Xie et al., 2019). Чтобы определить по этим данным последовательности аллелей изучаемого гена, полученные сиквенсы от каждого образца можно представить в виде вектора, каждая ячейка которого соответствует полиморфной позиции в гене для изучаемого вида. Затем каждую ячейку заполняют по правилу: «11» – если у данного образца в данной позиции наиболее распространенный нуклеотид; «00» – если наименее распространенный нуклеотид; «10» – если в этой позиции в геноме объекта встречаются два разных нуклеотида (предполагаемая гетерозигота). Полученные таким образом вектора впоследствии можно расписать по всевозможным комбинациям гетерозиготных позиций «10», оставив нетронутыми однозначные позиции «11» и «00». Поскольку среди образцов имеются гомозиготы и образцы с одной ОНЗ, то их последовательности формируют первичный пул аллелей, которые в дальнейшем могут быть обнаружены в остальных образцах. Каждая из этих аллелей в диплоиде должна соответствовать аллели с альтернативными значениями в полиморфных позициях, поэтому гомологичную пару можно найти для первичной аллели (Zhidkin et al., 2023). Перебирая таким образом возможные комбинации аллелей и выбирая те, чья частота встречаемости выше, можно определить генотипы образцов.

Описанные выше подходы были использованы для изучения внутри- и межвидовой изменчивости растений родов *Camellia*, *Vaccinium*, *Arachis*. Остановимся подробнее на этих примерах.

Полиморфизм клТ-ДНК у видов рода *Camellia*

Род *Camellia* L. принадлежит к семейству Theaceae и содержит несколько экономически и культурно значимых видов. *Camellia sinensis* (L.) Kuntze состоит из двух основных разновидностей: var. *sinensis* (обычно используется для производства зеленого чая) и var. *assamica* (в основном используется для производства черного чая). В работе (Chen et al., 2023) проанализировано 72 вида, относящихся к 12 из 14 секций рода *Camellia*, где описано не менее 12 различных вставок клТ-ДНК. Суммарно эти последовательности занимают 374 kb и содержат 47 открытых рамок считываний. Обнаруженные гены можно разделить на четыре типа: к первому относятся 19 *Plast* генов, ко второму – 6 генов синтеза опинов, к третьему – 4 гена, кодирующих триптофан монооксигеназы, к четвертому – все остальные гены с неизвестными функциями. Белковые последовательности генов клТ-ДНК обладают различным уровнем сходства с известными агробактериальными последовательностями. Средний уровень сходства равен 73.8 % (стандартное отклонение 12.8 %), тогда как минимальное и максимальное значения составляют 46 и 92 % соответственно.

Любопытно, что некоторые гены, гомологичные найденным у камелий, были обнаружены также в нескольких видах грибов, причем как у аско-, так и у базидиомицетов. В 7 из 12 вставок присутствуют внутренние инвертированные повторы, возникшие, вероятно, из-за встраивания одновременно нескольких копий Т-ДНК. Различия между повторами варьировали для разных фрагментов от 0.05 до 10 %. Учитывая, что на момент встраивания повторы были идентичны, и используя универсальное значение частоты замен на позицию в год 6.5×10^{-9} (Gaut et al., 1996) и количество замен между повторами, можно рассчитать примерное время вставки фрагментов (Haubold, Wiehe, 2001). Оно составляет от 0.04 до 7.5 млн лет назад (м. л. н.) (Chen et al., 2023).

Поскольку на разных этапах эволюции рода фрагменты встраивались в разные филогенетические линии, то они оказываются специфичными для современных таксонов различного уровня. Показано, что часть фрагментов была утрачена в определенных линиях и что самые молодые фрагменты еще не успели окончательно зафиксироваться в популяциях своих видов, присутствуя только в ряде особей.

При известных последовательностях клТ-ДНК их наличие/отсутствие в разных филогенетических линиях исследуемого таксона тоже является удобным признаком, состояние которого можно легко оценить. Так, последовательность дивергенции секций внутри рода, полученная на основании данных о наличии различных клТ-ДНК, согласуется с филогенетическим деревом, построенным по результатам полногеномного секвенирования (Wu et al., 2022). Различия между повторами также могут быть использованы для уточнения относительного и абсолютного времени дивергенции.

У представителей секции *Thea* описана только одна разновидность клТ-ДНК, которая была использована для уточнения филогенетических отношений видов этой секции. Данная секция содержит одиннадцать видов (Min, Bartholomew, 2007), включая чайный куст *C. sinensis* (L.) O. Kuntze и дикие виды чая. *C. sinensis* далее подразделяется на разновидности *sinensis*, *assamica*, *pubilimba* и *dehungensis*. Для девяти видов секции *Thea* рода *Camellia* была построена филогения на основании одной из вставок, описанных выше (Chen et al., 2022). Вставка имеет длину 5.5 kb, включает три гена, *acs-like*, *sus-like* и фрагмент *rolB-like*, и имеет на концах инвертированные повторы длиной 1 kb каждый. Анализ последовательностей показал, что гены *acs-like* и *sus-like* содержат стоп-кодоны, однако было отмечено, что у части видов они возникли независимо в разных позициях. Примерное время вставки фрагмента составляет 7.5 м. л. н., что примерно совпадает со временем возникновения секции *Thea* – 6.7 м. л. н. (Wu et al., 2022). Таким образом, данная вставка, от которой мы ожидаем, что она лишена возможных искажений, связанных с неполной сортировкой аллелей (incomplete lineage sorting), является подходящим маркером для этой группы.

В процессе сборки фрагментов из коротких прочтений обнаружено, что многие образцы содержат два аллеля, при этом от 2 до 7 % позиций являются полиморфными. В результате разделения 142 образцов было получено 225 аллелей, на основании которых построено филогенетическое дерево (рис. 3). В большинстве случаев полученные клады не совпадали с границами видов, а у многих гетерозиготных образцов присутствовали аллели из разных отдаленных клад. Особенно заметно присутствие в части образцов аллелей из клад, удаленных на значительное эволюционное расстояние. Максимальное количество замен между аллелями из разных клад, встречающихся в одном образце, составило около 4 %. Скорее всего, такая дивергенция аллелей была бы невозможна в популяции одного вида, поэтому выдвинуто предположение, что эволюция аллелей из основных клад происходила в границах отдельных предковых видов секции *Thea*, после чего современные виды, с высоким разнообразием аллелей в популяциях, образовались в результате интрогрессивных скрещиваний. Если предположить, что количество основных клад совпадает с количеством предковых видов, то по топологии дерева можно оценить степень родства этих видов, по количеству замен между аллелями – время дивергенции, а по частоте аллелей – вклад в современные популяции. Так, например, можно выделить две основные пары филогенетически отдаленных клад, между которыми происходила гибридизация. Соответственно, в результате одних скрещиваний сформировался вид *C. sinensis*, причем от одного из предполагаемых предковых видов присутствует в два раза больше аллелей, чем от второго. Расстояние между аллелями в 2.5 % позволяет предположить, что эти виды дивергировали 1.9 м. л. н. Тогда как в результате скрещиваний с равным участием внутри второй пары, дивергировавшей 2.9 м. л. н., возник вид *C. tachangensis*.

Наша работа позволила поставить вопрос о пересмотре границ видов, интенсивности межвидовых скрещиваний и других особенностях эволюции видов секции.

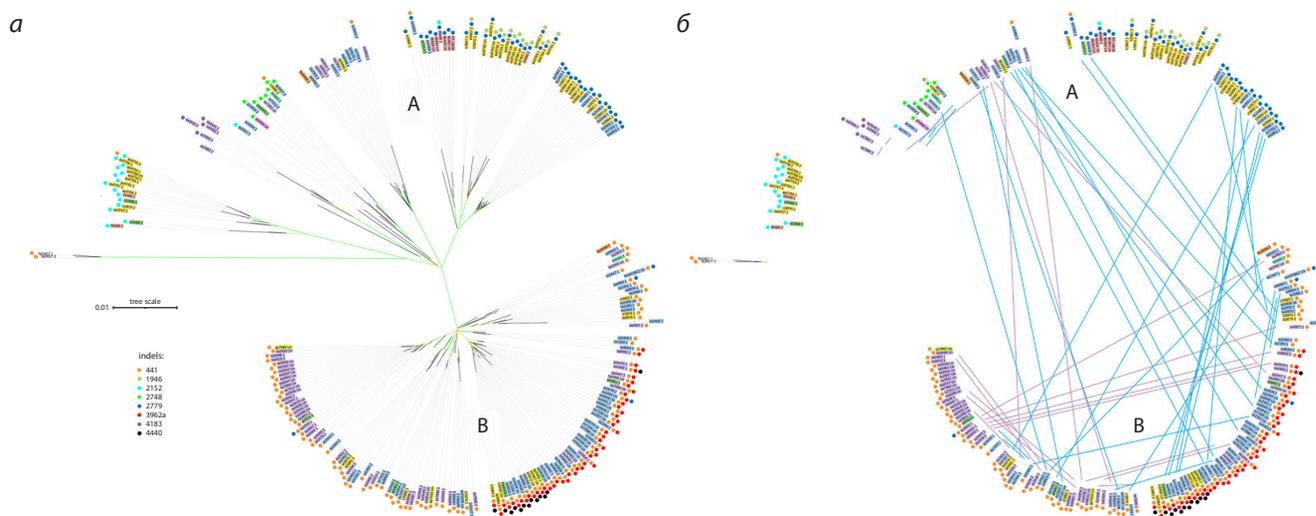


Рис. 3. Филогенетический анализ секции *Thea* с использованием кЛТ-ДНК: *а* – филогенетическое дерево 225 аллелей кЛТ-ДНК девяти видов рода *Camellia* секции *Thea*; *б* – линиями соединены аллели, находящиеся в одном образце *C. sinensis*.

Две основные клады на обоих рисунках обозначены латинскими буквами А и В. Цветовые обозначения видов: *C. sinensis* (включает *C. sinensis* var. *sinensis*, *C. pubilimba*, *C. angustifolia*) – голубой, *C. sinensis* var. *assamica* – фиолетовый, *C. tachangensis* – темно-желтый, *C. crassicolumna* – зеленый, *C. gymnogyna* – желтый, *C. taliensis* – розовый, *C. leptophylla* – темно-зеленый, *C. kwangsiensis* – оранжевый, *C. ptilophylla* – красный, *C. fangchengensis* – без цвета. Инделы обозначены цветными точками. Значения бутстрепа показаны цветом: зеленый – 85–100 %, желтый – 50–85 %, красный – менее 20 %. Рисунок создан на основе иллюстраций из (Chen et al., 2022), опубликованных под лицензией CC BY 4.0.

Полиморфизм кЛТ-ДНК у видов рода *Vaccinium*

Первым описанным в литературе природно-трансгенным видом из рода *Vaccinium* L. была клюква крупноплодная, *V. macrocarpon* Aiton (Matveeva, Otten, 2019). При помощи BLAST-алгоритма в полном геноме клюквы была найдена последовательность кЛТ-ДНК, представленная единичной, интактной копией *rolB/C*-подобного гена. Данный ген относится к *plast*-генам, и кодируемая им аминокислотная последовательность более схожа с *Plast*-белками таких организмов, как *Laccaria bicolor* (Matre) Orton, *Nyssa sinensis* Oliver и *Ensifer* sp., чем с аналогичными последовательностями из геномов известных видов агробактерий. Это может говорить о происхождении указанных последовательностей в ходе различных актов трансформации одним и тем же неизвестным видом агробактерий (Matveeva, Otten, 2019). Вторым после клюквы крупноплодной видом *Vaccinium*, содержащим гомолог изучаемого гена, была голубика высокорослая, *V. corymbosum* (Matveeva, 2021). Позже нам удалось показать наличие *rolB/C*-подобного гена еще у 26 видов *Vaccinium*, а также у вида *Agapetes serpens* (Wight) Sleumer, относящегося к тому же семейству Вересковые – Ericaceae (Zhidkin et al., 2023). Характерным является и общий сайт локализации обнаруженных последовательностей у видов *Vaccinium* и *A. serpens*. Такое широкое распространение трансгена по роду и общий сайт локализации указывают на трансформацию общего предка изучаемых видов. А значит, последовательность *rolB/C*-подобного гена можно использовать в качестве маркера для реконструкции филогенетических взаимоотношений между ними. Данная задача весьма актуальна, поскольку филогения рода *Vaccinium* остается противоречивой (Becker et al., 2024).

У всех изученных видов *rolB/C*-подобный ген представлен полноразмерной последовательностью. Исключение составила клюква обыкновенная *V. oxycoccos* L., у

большинства образцов которой имелись крупные делеции различной длины в центральной части гена, но в то же время существовали и образцы с полноразмерной последовательностью *rolB/C*-подобного гена. У остальных видов полиморфизм *rolB/C*-подобного гена представлен однонуклеотидными заменами и инделами, кратными трем, т. е. не нарушающими открытую рамку считывания. Паттерн таких нуклеотидных различий был видоспецифичен.

Несмотря на то что такие представители рода, как клюква, голубика, черника и брусника, издавна использовались человеком в пищу и в медицинских целях, селекция данных культур отсчитывается с начала XX в. (Wang H. et al., 2017; Vorsa, Zalapa, 2019; Sultana et al., 2020). Именно с началом селекционной работы связана разработка системы рода, первая из которых была предложена в 1945 г. (Camp, 1945). Представленная классическая система рода опиралась на различные морфологические признаки и делила род на секции. В дальнейшем система регулярно дополнялась и изменялась, поскольку в роду распространены межвидовая гибридизация и полиплоидизация (Camp, Gilly, 1943; Hancock et al., 2008). Эти особенности не позволяли однозначно определить филогенетические отношения между видами, что побудило с развитием молекулярной филогенетики применить для решения проблем методы ДНК-штрихкодирования (Kron et al., 2002; Powell, Kron, 2003). Полученная по последовательностям ITS (internal transcribed spacer – внутренний транскрибируемый спейсер) и *matK* (*maturase K* – пластидный ген матуразы К) дендрограмма шла вразрез с традиционными представлениями о разделении рода на секции, а также указывала на полифилиетичность рода *Vaccinium*. Однако использование классических филогенетических маркеров в кладистическом анализе для видов, в эволюции которых существенную роль играли процессы гибридизации и

полиплоидизации, может приводить к ошибкам (Soltis et al., 2008). В то же время данные, полученные с помощью SSR-маркеров (simple sequence repeats – микросателлитная ДНК) (Zalapa et al., 2015; Schlautman et al., 2017), филогеномики (Diaz-García et al., 2019; Kawash et al., 2022) и хемотаксономии (Leisner et al., 2017), имели меньше противоречий с классическими представлениями. Секвенирование геномов весьма трудоемко и дорогостояще, поэтому проводилось только на экономически значимых видах. *rolB/C*-подобный ген в качестве филогенетического маркера позволил вовлечь в работу больше видов.

У анализируемых видов внутривидовая изменчивость трансгена (в отличие от видов камелий секции *Thea*) оказалась ниже, чем межвидовая, а мозаичность некоторых клад могла быть объяснена актами гибридизации между видами, входящими в эти клады. Данные филогенетического анализа демонстрировали объединение в отдельные клады представителей секций *Oxycoccus*, *Vaccinium*, *Myrtillus* и *Conchophyllum*, тогда как виды из секции *Suaresococcus* не образовывали монофилетической группы, что может быть связано с ее полифилетичностью или событиями гибридизации в ходе создания сортов североамериканских голубик. Остальные исследованные в работе виды являются единичными представителями секций *Bracteata*, *Hemimyrtillus*, *Vitis-idaea*, *Oxycoccoides* и *Praestantia*, поэтому для изучения этих секций требуется дополнительный материал. Учитывая простоту и дешевизну разработанного молекулярного маркера, новые виды могут быть легко включены в дополнительный анализ. Иными словами, филогения рода *Vaccinium*, определенная по последовательностям *rolB/C*-подобного гена, имеет большее сходство с классической системой рода, чем с построенной на основе маркеров ITS и *matK*. Результаты, схожие с полученными при использовании маркера на основе *rolB/C*-подобного гена, были получены и другими авторами на основе NGS-подходов (next generation sequencing – секвенирование следующего поколения) (Diaz-García et al., 2019; Kawash et al., 2022).

Полиморфизм клТ-ДНК у видов рода *Arachis*

Род *Arachis* L. насчитывает 80 видов и подразделяется на девять таксономических секций: *Arachis* (с геномами А, В, К), *Erectoides* (геном Е), *Extranervosae* (геном EX), *Procumbentes* (геном PR), *Caulorrhizae* (геном С), *Heteranthae* (геном Н), *Rhizomatosae* (геном R), *Trierectoides* (геном TE) и *Triseminatae* (геном Т) (Stalker, 2017). Современное понимание эволюционных связей представителей рода *Arachis* основано на морфологических, географических, молекулярно-генетических и цитогенетических данных, но до сих пор существует много дискуссионных вопросов относительно структуры рода (Krapovickas, Gregory, 2007; Koppolu et al., 2010; Stalker, 2017; Tian et al., 2021).

Изначально пГМО были обнаружены в пределах секции *Arachis* у тетраплоидного культурного арахиса (*Arachis hypogaea* L.) и его предков: *A. duranensis* Krapov. & W.C. Greg. и *A. ipaensis* Krapov. & W.C. Greg., близкого к культурному арахису тетраплоидного вида *A. monticola* Krapov. & Rigoni (Matveeva, Otten, 2019) и диплоида *A. stenosperma* Krapov. & W.C. Greg. (Matveeva, Otten, 2021).

Арахис культурный и *A. monticola* содержат предковые геномы, известные как А и В. Геном А присутствует также в *A. duranensis* и *A. stenosperma*, тогда как *A. ipaensis* содержит геном В (Matveeva, Otten, 2019, 2021). В дальнейшем список пГМО был расширен представителями секций *Erectoides*, *Extranervosae*, *Procumbentes*, *Caulorrhizae* и *Heteranthae* (Bogomaz et al., 2024).

Всего сейчас известно 23 природно-трансгенных вида из этого рода. Велика вероятность того, что в ближайшее время перечень будет пополнен, поскольку изученные пГМО образуют монофилетическую группу, общий предок которой был трансформирован до того, как изучаемые секции дивергировали. Во всех исследованных видах был обнаружен гомолог гена кукумопинсинтазы (*cus*). В дополнение к *cus*-подобному гену виды с геномом В содержали остатки гена *mas2'*, виды с геномом PR – остатки гена *mas1'*, *A. macedoi* содержал остатки гена *ags*, а *A. pusilla* – остатки как генов *mas2'*, так и *ags* (Bogomaz et al., 2024). Все эти гены кодируют ферменты, относящиеся к одному и тому же биосинтетическому пути. Они катализируют цепочку реакций, приводящих к синтезу агропина, и обнаруживаются сгруппированными вместе в одной и той же агробактериальной Т-ДНК (Ellis et al., 1984). Общий предок видов *Arachis*, вероятно, был трансформирован штаммом, содержащим все три гена, но в какой-то момент эти гены перестали обеспечивать селективные преимущества своим хозяевам, накопили мутации и были утрачены, оставшись в виде отдельных фрагментов у представителей разных клад.

Совершенно иная картина характерна для гомолога гена кукумопинсинтазы. Он сохранился интактным у большинства изученных видов. У культурного арахиса, являющегося тетраплоидом с геномами А и В, *cus*-подобный ген присутствует в обоих геномах, но в геноме А он интактный, а в геноме В – мутантный (Matveeva, Otten, 2019). Более детальные исследования показали, что среди 29 описанных аллелей гена из генома А только три содержали мутации, несовместимые с функцией (Bogomaz et al., 2024). Культурный арахис делится на два подвида: *hypogaea* и *fastigiata* (Krapovickas, Gregory, 2007; Bertioli et al., 2011). Наиболее распространенная аллель А *cus*-подобного гена обнаружена у представителей обоих подвигов, а также у *A. duranensis*, что подтверждает их близкое родство. Однако у вида *A. monticola* эта аллель пока не выявлена, а его прочие аллели были равномерно распределены по отдельным субкладам внутри клады, содержащей аллели А генома культурного арахиса и родственных ему видов (Bogomaz et al., 2024), подтверждая тесное родство *A. monticola* и *A. hypogaea*, описанное и другими авторами (Tian et al., 2021). На основе данных, полученных с использованием *cus*-подобного гена как филогенетического маркера, нельзя исключать, что генетический материал *A. paraguariensis* Chodat & Hassl. был вовлечен в формирование по крайней мере некоторых разновидностей *A. hypogaea*. Данные других ученых подтверждают тесную связь между *A. paraguariensis* и *A. duranensis* (предковый вид культурного арахиса) (Moretzsohn et al., 2013).

Вместе с тем филогенетические исследования арахиса на основе *cus*-подобного гена показали, что наиболее четкая клада на филогенетическом древе представлена

мутантными аллелями из генома В. Эти последовательности быстрее дивергируют и являются более удобным материалом для изучения филогении, чем те, в отношении которых действует стабилизирующий отбор.

Таким образом, на примере рода *Arachis* были продемонстрированы некоторые ограничения использования клТ-ДНК в филогенетических исследованиях.

Филогенетические связи генов Т-ДНК агробактерий и пГМО

В предыдущих разделах мы рассмотрели вопросы, связанные с изучением филогении растений с применением Т-ДНК как молекулярного маркера. Однако подобный маркер может быть использован и для прослеживания родства между клТ-ДНК пГМО и Т-ДНК ныне известных штаммов агробактерий (Suzuki et al., 2002; Matveeva, Otten, 2021). В одной из работ нашей группы (Matveeva, Otten, 2021) были построены филогенетические деревья на основе отдельных генов синтеза опинов из всех известных к 2021 г. пГМО, а также охарактеризованных на тот момент штаммов ризобий. В результате было показано, что у параспонии *Parasponia andersonii* Planch. клТ-ДНК, содержащие гомологи гена *susL*, получены от различных штаммов агробактерий на разных этапах эволюции. Аналогичная картина была характерна для хурмы *Diospyros lotus* L. В то же время клТ-ДНК, содержащие гомологи микимопинсинтазы, скорее всего, были получены разными видами табака *Nicotiana* L. и льнянками *Linaria* Mill. от одного или очень близкородственных штаммов (Matveeva, Otten, 2021). Эти наблюдения позволяют лучше понять биоразнообразие агробактерий и подойти ближе к пониманию механизмов их хозяйской специфичности (Anderson, Moore, 1979), которая часто обусловлена особенностями структуры и функционирования *vir*-генов, наследуемых сцепленно с Т-ДНК в составе Ti(Ri)-плазмид. Изучение вопросов хозяйской специфичности важно для оптимизации протоколов генетической трансформации растений.

Заключение

Таким образом, клТ-ДНК помогают уточнить многие спорные моменты в филогенетических исследованиях. Вставки различных Т-ДНК маркируют эволюционные события, указывая нам на группы видов, имеющих общего предка. Инвертированные повторы могут дать информацию о возрасте этого предка и выстроить порядок попадания независимых Т-ДНК в геномы растений. Изучение тонкого полиморфизма клТ-ДНК с учетом аллельных состояний маркера позволяет отслеживать микроэволюционные события, последствия актов гибридизации при незавершенном видообразовании. К настоящему времени молекулярные маркеры на основе клТ-ДНК были успешно использованы при изучении родов *Nicotiana*, *Camellia*, *Vaccinium* и *Arachis*. В случае рода *Nicotiana* с помощью клТ-ДНК удалось маркировать и датировать основные этапы эволюции в пределах секции *Tomentosae*. У *Camellia* главным итогом использования маркера была четкая демонстрация незавершенного видообразования в пределах секции *Thea*, у представителей рода *Vaccinium* маркер позволил подтвердить некоторые классические представления о системе рода, которые шли вразрез с данными

на основе ITS, но согласовывались с данными NGS на небольшой выборке видов. У арахиса изучение клТ-ДНК позволило четко продемонстрировать различные эволюционные судьбы трансгенов в случае стабилизирующего отбора и без него, а также наметить некоторые недостатки разрешающей способности маркера, находящегося под сильным давлением стабилизирующего отбора.

Список литературы / References

- Матвеева Т.В. Зачем растениям агробактериальные гены? *Экологическая генетика*. 2021;19(4):365-375. doi 10.17816/ecogen89905 [Matveeva T.V. Why do plants need agrobacterial genes? *Ecol Genet*. 2021;19(4):365-375. doi 10.17816/ecogen89905]
- Матвеева Т.В., Павлова О.А., Богомаз Д.И., Демкович А.Е., Лутова Л.А. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений. *Экологическая генетика*. 2011;9(1):32-43. doi 10.17816/ecogen9132-43 [Matveeva T.V., Pavlova O.A., Bogomaz D.I., Demkovich A.E., Lutova L.A. Molecular markers for plant species identification and phylogenetics. *Ecol Genet*. 2011;9(1):32-43. doi 10.17816/ecogen9132-43 (in Russian)]
- Хафизова Г.В., Матвеева Т.В. Полиморфизм последовательностей ДНК агробактериального происхождения в сортах *Nicotiana tabacum*. *Генетика*. 2020;56(10):1215-1217. doi 10.31857/S0016675820100057 [Khafizova G.V., Matveeva T.V. Polymorphism in sequences of agrobacterial origin in *Nicotiana tabacum* cultivars. *Russ J Genet*. 2020;56(10):1215-1217. doi 10.1134/S1022795420100051]
- Anderson A., Moore L. Host specificity in the genus *Agrobacterium*. *Phytopathology*. 1979;69(4):320-323. doi 10.1094/Phyto-69-320
- Bahramnejad B., Naji M., Bose R., Jha S. A critical review on use of *Agrobacterium rhizogenes* and their associated binary vectors for plant transformation. *Biotechnol Adv*. 2019;37(7):107405. doi 10.1016/j.biotechadv.2019.06.004
- Becker A.L., Crowl A.A., Luteyn J.L., Chanderbali A.S., Judd W.S., Manos P.S., Soltis D.E., Smith S.A., Goncalves D.J.P., Dick C.W., Weaver W.N., Soltis P.S., Cellinese N., Fritsch P.W. A global blueberry phylogeny: evolution, diversification, and biogeography of Vacciniaceae (Ericaceae). *Mol Phylogenet Evol*. 2024;201:108202. doi 10.1016/j.ympev.2024.108202
- Bertioli D.J., Seijo G., Freitas F.O., Valls J.F.M., Leal-Bertioli S.C.M., Moretzsohn M.C. An overview of peanut and its wild relatives. *Plant Genet Resour*. 2011;9(1):134-149. doi 10.1017/S1479262110000444
- Bogomaz O.D., Bemova V.D., Mirgorodskii N.A., Matveeva T.V. Evolutionary fate of the opine synthesis genes in the *Arachis* L. genomes. *Biology (Basel)*. 2024;13(8):601. doi 10.3390/biology13080601
- Brandle J., Bai D. Biotechnology: uses and applications in tobacco improvement. In: Davis D.L., Nielsen M.T. (Eds) Tobacco: Production, Chemistry and Technology. Wiley, 1999;49-65
- Browning S.R., Browning B.L. Haplotype phasing: existing methods and new developments. *Nat Rev Genet*. 2011;12(10):703-714. doi 10.1038/nrg3054
- Camp W.H. The North American blueberries with notes on other groups of Vacciniaceae. *Brittonia*. 1945;5(3):203-275. doi 10.2307/2804880
- Camp W.H., Gilly C.L. The structure and origin of species. *Brittonia*. 1943;4(3):323-385. doi 10.2307/2804896
- Carr I.M., Robinson J.I., Dimitriou R., Markham A.F., Morgan A.W., Bonthron D.T. Inferring relative proportions of DNA variants from sequencing electropherograms. *Bioinformatics*. 2009;25(24):3244-3250. doi 10.1093/bioinformatics/btp583
- Chen K., Dorlhac de Borne F., Szegedi E., Otten L. Deep sequencing of the ancestral tobacco species *Nicotiana tomentosiformis* reveals multiple T-DNA inserts and a complex evolutionary history of natural transformation in the genus *Nicotiana*. *Plant J*. 2014;80(4):669-682. doi 10.1111/tpj.12661
- Chen K., Dorlhac de Borne F., Sierro N., Ivanov N.V., Alouia M., Koechler S., Otten L. Organization of the TC and TE cellular T-DNA

- regions in *Nicotiana otophora* and functional analysis of three diverged TE-6b genes. *Plant J.* 2018;94(2):274-287. doi 10.1111/tpj.13853
- Chen K., Zhurbenko P., Danilov L., Matveeva T., Otten L. Conservation of an *Agrobacterium* cT-DNA insert in *Camellia* section *Thea* reveals the ancient origin of tea plants from a genetically modified ancestor. *Front Plant Sci.* 2022;13:997762. doi 10.3389/fpls.2022.997762
- Chen K., Liu H., Blevins T., Hao J., Otten L. Extensive natural *Agrobacterium*-induced transformation in the genus *Camellia*. *Planta.* 2023;258(4):81. doi 10.1007/s00425-023-04234-9
- Christey M.C. Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 2001;37:687-700. doi 10.1007/s11627-001-0120-0
- Dehairs J., Talebi A., Cherifi Y., Swinnen J.V. CRISP-ID: decoding CRISPR mediated indels by Sanger sequencing. *Sci Rep.* 2016;6: 28973. doi 10.1038/srep28973
- Diaz-Garcia L., Rodriguez-Bonilla L., Rohde J., Smith T., Zalapa J. Pacbio sequencing reveals identical organelle genomes between American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) and a wild relative. *Genes (Basel).* 2019;10(4):291. doi 10.3390/genes10040291
- Doronina L., Feigin C.Y., Schmitz J. Reunion of Australasian possums by shared SINE insertions. *Syst Biol.* 2022;71(5):1045-1053. doi 10.1093/sysbio/syac025
- Ellis J.G., Ryder M.M., Tate M.E. *Agrobacterium tumefaciens* T_R-DNA encodes a pathway for agropine biosynthesis. *Mol Gen Genet.* 1984; 195:466-473. doi 10.1007/BF00341448
- Fricano A., Bakaher N., Del Corvo M., Piffanelli P., Donini P., Stella A., Ivanov N.V., Pozzi C. Molecular diversity, population structure, and linkage disequilibrium in a worldwide collection of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) germplasm. *BMC Genet.* 2012;13:18. doi 10.1186/1471-2156-13-18
- Furner I.J., Huffman G.A., Amasino R.M. An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana*. *Nature.* 1986;319: 422-427. doi 10.1038/319422a0
- Gaut B.S., Mortont B.R., McCaig B.C., Clegg M.T. Substitution rate comparisons between grasses and palms: synonymous rate differences at the nuclear gene *Adh* parallel rate differences at the plastid gene *rbcL* (orthology/nucleotide substitution rates/molecular clock). *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(19):10274-10279. doi 10.1073/pnas.93.19.10274
- Gelvin S.B. Plant DNA repair and *Agrobacterium* T-DNA integration. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16):8458. doi 10.3390/ijms22168458
- Hancock J.F., Lyrene P., Finn C.E., Vorsa N., Lobos G.A. Blueberries and cranberries. In: Hancock J.F. (Ed.) *Temperate Fruit Crop Breeding*. Springer, 2008;115-150. doi 10.1007/978-1-4020-6907-9_4
- Hansen G., Larribe M., Vaubert D., Tempe J., Biermann B.J., Montoya A.L., Chilton M.-D., Brevet J. *Agrobacterium rhizogenes* pRi8196 T-DNA: mapping and DNA sequence of functions involved in mannopine synthesis and hairy root differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88(17):7763-7767. doi 10.1073/pnas.88.17.7763
- Haubold B., Wiehe T. Statistics of divergence times. *Mol Biol Evol.* 2001; 18(7):1157-1160. doi 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003902
- Intrieri M.C., Buiatti M. The horizontal transfer of *Agrobacterium rhizogenes* genes and the evolution of the genus *Nicotiana*. *Mol Phylogenet Evol.* 2001;20(1):100-110. doi 10.1006/mpev.2001.0927
- Jouanin L. Restriction map of an agropine-type Ri plasmid and its homologies with Ti plasmids. *Plasmid.* 1984;12(2):91-102. doi 10.1016/0147-619x(84)90055-6
- Kawash J., Colt K., Hartwick N.T., Abramson B.W., Vorsa N., Polashock J.J., Michael T.P. Contrasting a reference cranberry genome to a crop wild relative provides insights into adaptation, domestication, and breeding. *PLoS One.* 2022;17(3):e0264966. doi 10.1371/journal.pone.0264966
- Khafizova G.V., Sierro N., Ivanov N.V., Sokornova S.V., Polev D.E., Matveeva T.V. *Nicotiana noctiflora* Hook. genome contains two cellular T-DNAs with functional genes. *Plants (Basel).* 2023;12(22): 3787. doi 10.3390/plants12223787
- Knapp S., Chase M.W., Clarkso J.J. Nomenclature changes and a new sectional classification in *Nicotiana* (Solanaceae). *Taxon.* 2004; 53(1):73-82. doi 10.2307/4135490
- Koppolu R., Upadhyaya H.D., Dwivedi S.L., Hoisington D.A., Varshney R.K. Genetic relationships among seven sections of genus *Arachis* studied by using SSR markers. *BMC Plant Biol.* 2010; 10:15. doi 10.1186/1471-2229-10-15
- Krapovickas A., Gregory W.C. Taxonomy of the genus *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia.* 2007;16(Supl.):1-205. doi 10.30972/bon.160158
- Kron K., Powell E., Lutey J. Phylogenetic relationships within the blueberry tribe (Vaccinieae, Ericaceae) based on sequence data from MATK and nuclear ribosomal ITS regions, with comments on the placement of *Satyria*. *Am J Bot.* 2002;89(2):327-336. doi 10.3732/ajb.89.2.327
- Kuritzin A., Kischka T., Schmitz J., Churakov G. Incomplete lineage sorting and hybridization statistics for large-scale retroposon insertion data. *PLoS Comput Biol.* 2016;12(3):e1004812. doi 10.1371/journal.pcbi.1004812
- Leisner C.P., Kamileen M.O., Conway M.E., O'Connor S.E., Buell C.R. Differential iridoid production as revealed by a diversity panel of 84 cultivated and wild blueberry species. *PLoS One.* 2017; 12(6):e0179417. doi 10.1371/journal.pone.0179417
- Leitch I.J., Hanson L., Lim K.Y., Kovarik A., Chase M.W., Clarkson J.J., Leitch A.R. The ups and downs of genome size evolution in polyploid species of *Nicotiana* (Solanaceae). *Ann Bot.* 2008;101(6): 805-814. doi 10.1093/aob/mcm326
- Lewis R.S., Nicholson J.S. Aspects of the evolution of *Nicotiana tabacum* L. and the status of the United States *Nicotiana* germplasm collection. *Genet Resour Crop Evol.* 2007;54:727-740. doi 10.1007/s10722-006-0024-2
- Lynch M., Conery J.S. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science.* 2000;290(5494):1151-1155. doi 10.1126/science.290.5494.1151
- Martin M., Patterson M., Garg S., Fischer S., Pisanti N., Klau G.W., Schöenhuth A., Marschall T. WhatsHap: fast and accurate read-based phasing. *bioRxiv.* 2016. doi 10.1101/085050
- Matveeva T. New naturally transgenic plants: 2020 update. *Bio Comm.* 2021;66(1):36-46. doi 10.21638/SPBU03.2021.105
- Matveeva T.V., Otten L. Widespread occurrence of natural genetic transformation of plants by *Agrobacterium*. *Plant Mol Biol.* 2019; 101(4-5):415-437. doi 10.1007/s11103-019-00913-y
- Matveeva T.V., Otten L. Opine biosynthesis in naturally transgenic plants: genes and products. *Phytochemistry.* 2021;189:112813. doi 10.1016/j.phytochem.2021.112813
- Meyer A.D., Ichikawa T., Meins F. Horizontal gene transfer: regulated expression of a tobacco homologue of the *Agrobacterium rhizogenes* *rolC* gene. *Mol Gen Genet.* 1995;249(3):265-273. doi 10.1007/BF00290526
- Min T.L., Bartholomew B. Theaceae. In: Wu Z.Y., Raven P.H. (Eds) *Flora of China*. Vol. 12. St Louis: Science Press, Beijing & Missouri Botanical Garden Press, 2007;323-450
- Mohajjel-Shoja H., Clément B., Perot J., Alioua M., Otten L. Biological activity of the *Agrobacterium rhizogenes*-derived *trpC* gene of *Nicotiana tabacum* and its functional relation to other *plast* genes. *Mol Plant Microbe Interact.* 2011;24(1):44-53. doi 10.1094/MPMI-06-10-0139
- Moon H.S., Nifong J.M., Nicholson J.S., Heineman A., Lion K., Van der Hoeven R., Lewis R.S. Microsatellite-based analysis of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) genetic resources. *Crop Sci.* 2009;49(6): 2149-2159. doi 10.2135/cropsci2009.01.0024
- Moretzsohn M.C., Gouvea E.G., Inglis P.W., Leal-Bertioli S.C.M., Valls J.F.M., Bertioli D.J. A study of the relationships of cultivated peanut (*Arachis hypogaea*) and its most closely related wild species using intron sequences and microsatellite markers. *Ann Bot.* 2013; 111(1):113-126. doi 10.1093/aob/mcs237
- Nester E.W. *Agrobacterium*: nature's genetic engineer. *Front Plant Sci.* 2015;5:730. doi 10.3389/fpls.2014.00730

- Otten L. Natural *Agrobacterium*-mediated transformation in the genus *Nicotiana*. In: Ivanov N.V., Siervo N., Peitsch M.C. (Eds) The Tobacco Plant Genome. Compendium of Plant Genomes. Cham: Springer, 2020;195-209. doi 10.1007/978-3-030-29493-9_12
- Powell E., Kron K. Molecular systematics of the northern Andean blueberries (*Vaccinieae*, *Vaccinioideae*, *Ericaceae*). *Int J Plant Sci.* 2003;164(6):987-995. doi 10.1086/378653
- Ren N., Timko M.P. AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species. *Genome.* 2001;44(4):559-571. doi 10.1139/g01-060
- Rossi L., Bindler G., Pijnenburg H., Isaac P.G., Giraud-Henry I., Mahe M., Gadani F. Potential of molecular marker analysis for variety identification in processed tobacco. *Plant Varieties Seeds.* 2001;14(2):89-102
- Schell J., Van Montagu M. The Ti-plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*, a natural vector for the introduction of *nif* genes in plants? In: Genetic Engineering for Nitrogen Fixation. Basic Life Sciences. Vol. 9. Springer, 1977;159-179. doi 10.1007/978-1-4684-0880-5_12
- Schlautman B., Covarrubias-Pazarán G., Fajardo D., Steffan S., Zalapa J. Discriminating power of microsatellites in cranberry organelles for taxonomic studies in *Vaccinium* and *Ericaceae*. *Genet Resour Crop Evol.* 2017;64(3):451-466. doi 10.1007/s10722-016-0371-6
- Schrinner S.D., Mari R.S., Ebler J., Rautiainen M., Seillier L., Reimer J.J., Usadel B., Marschall T., Klau G.W. Haplotype threading: accurate polyploid phasing from long reads. *Genome Biol.* 2020; 21(1):252. doi 10.1186/s13059-020-02158-1
- Shedlock A.M., Okada N. SINE insertions: powerful tools for molecular systematics. *BioEssays.* 2000;22(2):148-160. doi 10.1002/(SICI)1521-1878(200002)22:2<148::AID-BIES6>3.0.CO;2-Z
- Siervo N., Battey J.N., Ouadi S., Bakaher N., Bovet L., Willig A., Goepfert S., Peitsch M.C., Ivanov N.V. The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. *Nat Commun.* 2014;5(1):3833. doi 10.1038/ncomms4833
- Singer K. The mechanism of T-DNA integration: some major unresolved questions. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2018;418:287-317. doi 10.1007/82_2018_98
- Snyder M., Adey A., Kitzman J.O., Shendure J. Haplotype-resolved genome sequencing: experimental methods and applications. *Nat Rev Genet.* 2015;16(6):344-358. doi 10.1038/nrg3903
- Soltis D.E., Mavrodiev E.V., Doyle J.J., Rauscher J., Soltis P.S. ITS and ETS sequence data and phylogeny reconstruction in allopolyploids and hybrids. *Syst Bot.* 2008;33(1):7-20. doi 10.1600/036364408783887401
- Stalker H.T. Utilizing wild species for peanut improvement. *Crop Sci.* 2017;57(3):1102-1120. doi 10.2135/cropsci2016.09.0824
- Sultana N., Menzel G., Heitkam T., Kojima K., Bao W., Serçe S. Bioinformatic and molecular analysis of satellite repeat diversity in *Vaccinium* genomes. *Genes (Basel).* 2020;11(5):527. doi 10.3390/genes11050527
- Sun X., Jiao C., Schwaninger H., Chao C.T., Ma Y., Duan N., Khan A., Ban S., Xu K., Cheng L., Zhong G., Fei Z. Phased diploid genome assemblies and pan-genomes provide insights into the genetic history of apple domestication. *Nat Genet.* 2020;52(12):1423-1432. doi 10.1038/s41588-020-00723-9
- Suzuki K., Yamashita I., Tanaka N. Tobacco plants were transformed by *Agrobacterium rhizogenes* infection during their evolution. *Plant J.* 2002;32(5):775-787. doi 10.1046/j.1365-313X.2002.01468.x
- Tanaka H., Hori T., Yamamoto S., Toyoda A., Yano K., Yamane K., Itoh T. Haplotype-resolved chromosomal-level assembly of wasabi (*Eutrema japonicum*) genome. *Sci Data.* 2023;10(1):441. doi 10.1038/s41597-023-02356-z
- Tepfer D. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. *Physiol Plant.* 1990;79(1):140-146. doi 10.1111/j.1399-3054.1990.tb05876.x
- Tian X., Shi L., Guo J., Fu L., Du P., Huang B., Wu Y., Zhang X., Wang Z. Chloroplast phylogenomic analyses reveal a maternal hybridization event leading to the formation of cultivated peanuts. *Front Plant Sci.* 2021;12:804568. doi 10.3389/fpls.2021.804568
- Tiley G.P., Crowl A.A., Manos P.S., Sessa E.B., Solis-Lemus C., Yoder A.D., Burleigh J.G., Smith S. Benefits and limits of phasing alleles for network inference of allopolyploid complexes. *Syst Biol.* 2024;73(4):666-682. doi 10.1093/sysbio/syae024
- Tong Z., Fang D., Chen X., Jiao F., Zhang Y., Li Y., Xiao B. Genome-wide association study of leaf chemistry traits in tobacco. *Breed Sci.* 2020;70(3):253-264. doi 10.1270/jsbbs.19067
- Tzfira T., Li J., Lacroix B., Citovsky V. *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends Genet.* 2004;20(8):375-383. doi 10.1016/j.tig.2004.06.004
- Vorsa N., Zalapa J. Domestication, genetics, and genomics of the American cranberry. In: Goldman I. (Ed.) Plant Breeding Reviews. Vol. 43. John Wiley & Sons, Inc., 2019;279-315. doi 10.1002/9781119616801.ch8
- Wang H., Guo X., Hu X., Li T., Fu X., Liu R. Comparison of phytochemical profiles, antioxidant and cellular antioxidant activities of different varieties of blueberry (*Vaccinium* spp.). *Food Chem.* 2017; 217:773-781. doi 10.1016/j.foodchem.2016.09.002
- Wang Y., Zhao Y., Bollas A., Wang Y., Au K.F. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nat Biotechnol.* 2021; 39(11):1348-1365. doi 10.1038/s41587-021-01108-x
- Wenger A.M., Peluso P., Rowell W.J., Chang P., Hall R.J., Conception G.T., Ebler J., ... Li H., Koren S., Carroll A., Rank D.R., Hunkapiller M.W. Accurate circular consensus long-read sequencing improves variant detection and assembly of a human genome. *Nat Biotechnol.* 2019;37(10):1155-1162. doi 10.1038/s41587-019-0217-9
- White F.F., Ghidossi G., Gordon M.P., Nester E.W. Tumor induction by *Agrobacterium rhizogenes* involves the transfer of plasmid DNA to the plant genome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982;79(10):3193-3197. doi 10.1073/pnas.79.10.3193
- White F.F., Garfinkel D.J., Huffman G.A., Gordon M.P., Nester E.W. Sequence homologous to *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in the genomes of uninfected plants. *Nature.* 1983;301:348-350. doi 10.1038/301348a0
- White F., Taylor B., Huffman G., Gordon M., Nester E. Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *J Bacteriol.* 1985;164(1): 33-44. doi 10.1128/jb.164.1.33-44.1985
- Wu Q., Tong W., Zhao H., Ge R., Li R., Huang J., Li F., Wang Y., Mallano A.I., Deng W., Wang W., Wan X., Zhang Z., Xia E. Comparative transcriptomic analysis unveils the deep phylogeny and secondary metabolite evolution of 116 *Camellia* plants. *Plant J.* 2022;111(2): 406-421. doi 10.1111/tbj.15799
- Xie X., Ma X., Liu Y.G. Decoding Sanger sequencing chromatograms from CRISPR-induced mutations. *Methods Mol Biol.* 2019;1917: 33-43. doi 10.1007/978-1-4939-8991-1_3
- Yukawa M., Tsudzuki T., Sugiura M. The chloroplast genome of *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana tomentosiformis*: complete sequencing confirms that the *Nicotiana sylvestris* progenitor is the maternal genome donor of *Nicotiana tabacum*. *Mol Genet Evol.* 2006; 27(4):367-373. doi 10.1007/s00438-005-0092-6
- Zalapa J.E., Bougie T.C., Bougie T.A., Schlautman B.J., Wiesman E., Guzman A., Fajardo D.A., Steffan S., Smith T. Clonal diversity and genetic differentiation revealed by SSR markers in wild *Vaccinium macrocarpon* and *Vaccinium oxycoccos*. *Ann Appl Biol.* 2015; 166(2):196-207. doi 10.1111/aab.12173
- Zhang X., Wu R., Wang Y., Yu J., Tang H. Unzipping haplotypes in diploid and polyploid genomes. *Comput Struct Biotechnol J.* 2020; 18:66-72. doi 10.1016/j.csbj.2019.11.011
- Zhidkin R., Zhurbenko P., Bogomaz O., Gorodilova E., Katsapov I., Antropov D., Matveeva T. Biodiversity of *roIB/C*-like natural transgene in the genus *Vaccinium* L. and its application for phylogenetic studies. *Int J Mol Sci.* 2023;24(8):6932. doi 10.3390/ijms24086932

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 04.12.2024. После доработки 19.05.2025. Принята к публикации 26.05.2025.

doi 10.18699/vjgb-25-94

A new molecular marker including parts of conservative histone H3 and H4 genes and the spacer between them for phylogenetic studies in dragonflies (Insecta, Odonata), extendable to other organisms

A.V. Mglinets ¹, V.S. Bulgakova¹, O.E. Kosterin ^{1, 2} ¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia kosterin@bionet.nsc.ru

Abstract. In spite of recent substantial progress in genomic approaches, there is still a need for molecular markers convenient for Sanger sequencing and providing good phylogenetic reconstructions at short evolutionary distances. A new molecular marker, the histone H3–H4 region, containing partial coding sequences of the genes for histones H3 and H4 and the non-coding spacer between them, is proposed. This marker is potentially useful for molecular phylogenetic studies at the generic, species, and even intra-species level in insects and some other organisms, even from other phyla. The highly conserved histone-coding sequences ensure the universality of primers and the ease of primary alignment, while the highly variable non-coding spacer provides enough variation for analyses at short evolutionary distances. In insects, the histone genes reside in the histone repeat which is tandemly repeated in dozens to hundred copies forming the so-called histone cluster. This ensures a high concentration of the template for the marker in genomic DNA preparations. However, the order and orientation of the histone genes in the histone repeat is variable among orders, which puts some limitations on the use of the proposed marker. The marker efficacy is hereby shown for Odonata (dragonflies and damselflies), where it provided good resolution at the family, genus and species levels. The new marker also provided an interesting pattern in the relationship of two *Sympetrum* species, *S. croceolum* and *S. uniforme*, showing the sequences of the latter as a branch nested among those of the former. The same combination of the proposed original primers should also work in Diptera.

Key words: histone repeat; histone H3; histone H4; intergenic spacer; Odonata; dragonflies; insects; molecular marker; phylogenetic studies

For citation: Mglinets A.V., Bulgakova V.S., Kosterin O.E. A new molecular marker including parts of conservative histone H3 and H4 genes and the spacer between them for phylogenetic studies in dragonflies (Insecta, Odonata), extendable to other organisms. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(6):868-882. doi 10.18699/vjgb-25-94

Funding. The work was supported by the project FWNR-2022-0019 of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS. DNA sequencing was performed at the SB RAS Genomics Core Facility, Novosibirsk. Assembly of sequences from the SRA archive was performed at the Siberian SuperComputer Computational Facility, Novosibirsk.

Acknowledgements. The authors are grateful to V.V. Dubatolov for providing the specimens of *S. croceolum* and *S. uniforme* from the Far East of Russia and to the reviewers for their valuable comments.

Новый молекулярный маркер для филогенетических исследований стрекоз (Insecta, Odonata), включающий части консервативных генов гистонов H3 и H4 и спейсер между ними, применимый и к другим организмам

А.В. Мглинец ¹, В.С. Булгакова¹, О.Э. Костерин ^{1, 2} ¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия kosterin@bionet.nsc.ru

Аннотация. Несмотря на значительный прогресс в геномных исследованиях, до сих пор существует потребность в молекулярных маркерах, удобных для секвенирования по Сэнгеру и позволяющих делать филогенетические реконструкции на коротких эволюционных дистанциях. Предложен новый молекулярный маркер, район генов гистонов H3 и H4, содержащий части кодирующих последовательностей генов гистонов H3 и H4 и некодирующий спейсер между ними. Он может быть удобен для молекулярно-филогенетических исследований на родовом, видовом и даже внутривидовом уровне у насекомых и некоторых других групп, в том числе из других типов. Высококонсервативные кодирующие последовательности гистоновых генов обеспечивают уни-

версальность праймеров и однозначность первичного выравнивания, тогда как переменный некодирующий спейсер содержит достаточно изменчивости для анализа на коротких эволюционных дистанциях. У насекомых гены гистонов находятся в гистоновом повторе, tandemно повторенном в десятках или сотнях копий в так называемом гистоновом кластере. Это обеспечивает высокую концентрацию матрицы для нового маркера в препаратах геномной ДНК. Однако порядок и ориентация конкретных генов у разных отрядов изменчива, что налагает определенные ограничения на использование предлагаемого маркера. В нашей работе эффективность маркера продемонстрирована на материале отряда стрекоз (Odonata), где он хорошо разрешил семейства, роды и виды. Новый маркер также выявил интересный паттерн взаимоотношения двух видов рода *Sympetrum*, *S. croceolum* и *S. uniforme*, показав последовательности последнего в качестве ветви среди последовательностей первого. Та же комбинация разработанных нами оригинальных праймеров будет работать и в отряде двукрылых (Diptera).

Ключевые слова: гистоновый повтор; гистон H3; гистон H4; межгенный спейсер; Odonata; стрекозы; насекомые; молекулярный маркер; филогенетические исследования

Introduction

Analysis of DNA variation is a powerful tool in reconstructing phylogenetic history of living creatures, so the use of molecular methods has provided a profound progress in phylogenetic analysis, with applications in taxonomy, paleobiology, paleogeography and evolutionary theory. Particular sequences used for this purpose, traditionally called ‘phylogenetic markers’, differ in their rate of fixation of mutations thus permitting phylogenetic resolution at different time scales, with resolution of most recent divergences being possible with most variable markers; for those applied to Odonata see Y.C. Cheng et al. (2018).

Mitochondrial DNA in animals is on average more variable than nuclear DNA, so the popular mitochondrial marker cytochrome oxidase I (*COI*) is widely used for barcoding of animals (Ballard, Whitlock, 2004; Avise, 2009). However, the phylogenies reconstructed from mitochondrial markers quite frequently meet serious problems. They often contradict both phylogenies reconstructed from nuclear markers and traditional taxonomy based on morphology. In some groups of organisms (Cheng Z. et al., 2023), including the family Coenagrionidae in Odonata (Dow et al., 2019; Deng et al., 2021; Galimberti et al., 2021; Geiger et al., 2021), mitochondria seem to ‘live a life of their own’. The most drastic patterns were revealed in *Coenagrion* Kirby, 1890, where mitochondrial haplotypes cross species barriers but seem unable to cross the Hybraltar Strait (Ferreira et al., 2016; Galimberti et al., 2021; Geiger et al., 2021), and in *Ischnura elegans* (Vander Linden, 1820) where the Japanese population appeared to be strongly divergent from the continental ones (Deng et al., 2021). Such drastic patterns can hardly be explained by incomplete lineage sorting or introgressive hybridisation, the phenomena usually supposed to explain such cases. The reason could be co-selection of mitochondria with strains of the intra-cellular bacterial endosymbiont *Wolbachia* Hertig, 1826 (Deng et al., 2021). Horizontal transfer of mitochondria via an unknown agent is also postulated but not proved (Gurdon et al., 2016). Another problem of using markers based on mitochondrial DNA is the sporadic occurrence of mtDNA fragments adopted by the nuclear genome (NUMT), which are variably divergent from the actual mtDNA and may result in false phylogenetic results; for examples in Odonata, see Ožana et al. (2022) or Lorenzo-Carballea et al. (2022). For the purpose of revealing evolutionary history at short time distances, microsatellite or SSR markers have been popular for a long time and applied also to Odonata (e.g. Lowe et al.,

2008). These are tracts of very short (one to few nucleotides) repeats with the number of copies frequently changing because of slippage mispairing and unequal crossing over. Such markers suffer from a high rate of homoplasy, when different events of copy number change result in the same alleles, here understood as particular numbers of repeats, but are still the marker of choice for population genetic studies.

The modern next-generation high-throughput sequencing and genomic approaches offer ample phylogenetic data (for examples in Odonata, see Futahashi et al., 2015; Bybee et al., 2021; Kohli et al., 2021), potentially useful for analysis even at short evolutionary distances, but are expensive and more demanding in sample preparation. Although the prices are getting lower, these technologies still remain unaffordable for many researchers in countries which harbour the richest biodiversity. Therefore, there is still a need for easily analysed and cheap nuclear markers based on Sanger sequencing which would provide good resolution at the species level and could be useful at least for fast preliminary tests revealing the evolutionary history of populations, subspecies and closely related species. Besides, such markers make it possible to analyse regular collection specimens, not specially collected for DNA analysis.

Non-coding sequences, the variability of which is mainly determined by physical properties of DNA replication, are useful candidates for variable phylogenetic markers. Their use is limited by possibility of working out universal primers, which could be achieved by involvement of bordering conserved sequences. Besides, non-coding sequences demonstrate a high rate of indels, which bring about difficulties as to their alignment. Of such markers, the so-called *ITS* region including internal spacers between the conserved ribosomal RNA genes, *ITS1* and *ITS2*, is the most popular among nuclear markers; for its use in Odonata, see Hovmöller and Johansson (2004), Dumont et al. (2010), Karube et al. (2012), Schneider et al. (2023). The highly repetitive nature of the nucleolus organiser provides an advantage of high concentration of the template in preparations of genomic DNA and a disadvantage of possible heterozygosity as well as cis-heterogeneity between individual repeat copies (Hovmöller, Johansson, 2004).

Recently, a useful approach has been proposed, focusing on introns of nuclear genes (Ferreira et al., 2014). The primary structure of introns has scarce adaptive constraints save mutations affecting splicing. At the same time, the bordering exons are usually conserved enough to allow for universal primers design. These markers have a disadvantage of low concen-

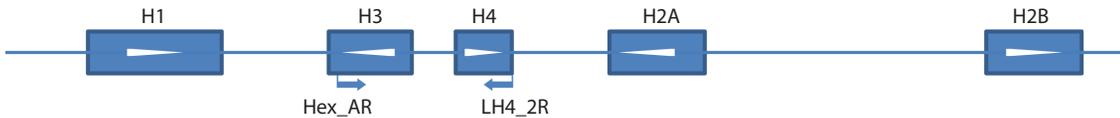


Fig. 1. Positions of the primers used to amplify the histone H3–H4 region in the histone repeat as exemplified by a fragment of the assembly of the *Ischnura elegans* genome (NW_025791746). White arrowheads indicate the direction of transcription.

tration of template genomic DNA, since the genes involved are unique and present in the genome only in two copies, so they may be less readily amplifiable from specimens with somewhat degraded DNA as compared to the highly repeated sequences of the *ITS* region.

In the present work, we propose and test the usability of a new phylogenetic marker, the spacer between the genes of the conservative core histones H3 and H4 and partial coding sequences of these histones, which we designate as the *histone H3–H4 region*. It resembles the popular *ITS* region mentioned above.

In animals, the genes for five histones (H1, H2A, H2B, H3, H4) are included into the so-called histone repeat, tandemly repeated copies of which form the histone cluster (Eirín-López et al., 2009). Several important circumstances should be noted in this respect:

- (i) Histones H3 and H4 are among the most conserved proteins in eukaryotes (Stein et al., 1984; Doenecke et al., 1997; Eirín-López et al., 2009), so their coding sequences allow primers of very broad applicability across taxonomic groups.
- (ii) In insects, genes of these two histones are disposed in the histone repeat relatively close to each other (Eirín-López et al., 2009). The order of histone genes and orientation of their reading frames is variable among different insect orders. For instance, their order is H1, H3, H4, H2A, H2B in *Drosophila melanogaster* (Goodenough, 1984: p. 304; Eirín-López et al., 2009) and in all Odonata species tested in this work (Fig. 1). Although this variation may also take place at lower taxonomical levels and is sometimes observed even in different copies of the histone repeat in the same chromosome, in all species of Odonata tested by us (see below) we obtained a PCR product using the same primer pair matching histones H3 and H4. So the original primers we suggest are useful at least across dragonflies and damselflies.
- (iii) The spacer between H3 and H4 histone genes is non-coding and therefore is expected to undergo neutral evolution, hence being a kind of molecular clock.
- (iv) Insects have hundreds of copies of the histone repeat (Stein et al., 1984; Solovyev et al., 2022), which facilitates amplification from total genomic DNA preparations, but may also bring about problems related to cis- (within-cluster) and trans- (allelic, between homologous chromosomes) heterogeneity.
- (v) Most insects have only one histone cluster, whereas in some of them and in other animal groups there is a number of paralogous clusters (Eirín-López et al., 2009). A single histone cluster is an advantage since this avoids trans-cluster heterogeneity which would complicate an analysis. To develop and test the marker, we chose the order Odonata and designed original primers which worked in all tested spe-

cies. We tested its resolution at different taxonomical levels, by sequencing amplicons from representatives of different families (Calopterygidae, Coenagrionidae, Aeshnidae, Gomphidae, Corduliidae, and Libellulidae), from several species of some genera and from a number of specimens of some *Sympetrum* spp. The latter involved a series of three species from the same *danae* species group (Pilgrim, Dohlen, 2012), namely *S. croceolum* (Selys, 1883), *S. danae* (Sulzer, 1776) and *S. uniforme* (Selys, 1883), including those collected in the same populations.

Materials and methods

Material. The specimens of *S. croceolum*, *S. danae*, *S. flaveolum* (Linnaeus, 1758), and *S. uniforme* were preserved in 96 % ethanol, other specimens were treated overnight with acetone and then dried out. The species and specimens from which the histone H3–H4 region was sequenced in the course of this study and the GenBank accession numbers of these sequences are enumerated (in parentheses) in the Table.

Sequences from public databases. To expand our sample, we downloaded sequences of the H3–H4 region from the Whole Genome Sequence datasets available in public databases of 16 more Odonata species: *Hetaerina americana* (Fabricius, 1798), *H. titia* (Drury, 1773) (Calopterygidae), *Argia fumipennis* (Burmeister, 1839), *Ceriagrion tenellum* (De Villiers, 1789), *Ischnura elegans*, *I. senegalensis* (Rambur, 1842) *Pseudagrion microcephalum* (Rambur, 1842), *Pyrrhosoma nymphula* (Sulzer, 1776) (Coenagrionidae), *Platycnemis pennipes* (Pallas, 1771), *Prodasineura notostigma* (Selys, 1860) (Platycnemididae), *Tanypteryx hageni* (Selys, 1879), *Tachopteryx thoreyi* (Selys, 1889), *Uropetala carovei* (White in Dieffenbach, 1843) (Petaluridae), *Brachytron pratense* (Müller, 1764) (Aeshnidae), *Pachydiplax longipennis* (Burmeister, 1839), *Pantala flavescens* (Fabricius, 1798), (Libellulidae).

Besides, the histone H3–H4 region was assembled from SRA archives available at GenBank, with the use of the MIRA software (Chevreux et al., 1999) for the following 20 species: *Archilestes grandis* (Rambur, 1842) (Lestidae), *Calopteryx splendens* (Harris, 1780), *Hetaerina vulnerata* (Hagen in Selys, 1853), *Mnais tenuis* (Oguma, 1913), *Neurobasis kaupi* (Brauer, 1867) (Calopterygidae), *Agriocnemis femina* (Brauer, 1868) (Coenagrionidae), *Anax parthenope* (Selys, 1839), *A. strenuus* (Hagen, 1867) (Aeshnidae), *Gomphus vulgatissimus* (Linnaeus, 1758), *Lanthus parvulus* (Selys, 1854), *Onychogomphus forcipatus* (Linnaeus, 1758), *Ophiogomphus mainensis* (Packard in Walsh, 1863) (Gomphidae), *Cordulegaster boltonii* (Donovan, 1807) (Cordulegastridae), *Macromia manchurica* (Asahina, 1964) (Macromiidae), *Ladona fulva* (Müller, 1764), *Leucorrhinia albifrons* (Burmeister, 1839), *Libellula angelina* (Selys, 1883), *L. quadrimaculata* (Linnaeus, 1758), *Nannophya pygmaea* (Rambur, 1842), *Orthemtrum coerulescens* (Fabricius, 1798) (Libellulidae). The

Species (by families) and specimens sequenced for the histone H3–H4 region, their origin and the GenBank accession numbers of the sequences. Coordinates are given in decimal degree format

Species name	Locality	Latitude (N)	Longitude (E)	Date	Specimens, their codes (if any) and accession numbers of their sequences
Calopterygidae					
<i>Atrocalopteryx atrata</i> (Selys, 1853)	Russia, Khabarovskiy Kray, 44 km SE of Khabarovsk, Chirki	48.19	134.68	15.07.2014	1 ♂ (PQ498535)
Coenagrionidae					
<i>Coenagrion johanssoni</i> (Wallengren, 1894)	Russia, Khabarovskiy Kray, 44 km SE of Khabarovsk, Chirki	48.19	134.68	15.07.2014	1 ♂ (PQ498539)
Aeshnidae					
<i>Aeshna juncea</i> (Linnaeus, 1758)	Russia, Khabarovskiy Kray, 28 km SE of Khabarovsk, Bychikha village	48.30	134.83	9.07.2014	1 ♂ (PQ498536)
Gomphidae					
<i>Nihonogomphus ruptus</i> (Selys in Hagen, 1858)	Russia, Khabarovskiy Kray, 44 km SE of Khabarovsk, Chirki ranger station	48.19	134.68	15.07.2014	1 ♂ (PQ498542)
Corduliidae					
<i>Cordulia aenea</i> (Linnaeus, 1758)	Russia, Novosibirsk, Academy Town	54.8473	83.1072	1.07.2015	1 ♂ (PQ498537)
<i>Somatochlora arctica</i> (Zetterstedt, 1840)	Russia, Novosibirsk, Academy Town, Zvezda Beach	54.8314	83.0538	30.06.2015	1 ♀ (PQ498546)
<i>Somatochlora graeseri</i> Selys, 1887	Russia, Primorskiy Kray, Khanka District, Lake Khanka W bank 2 km N of Platono-Aleksandrovskoe village	45.062	131.995	4.07.2014	1 ♀ (PQ498561)
Macromiidae					
<i>Macromia amphigena fraenata</i> Martin, 1906	Russia, Khabarovskiy Kray, 44 km SE of Khabarovsk, Chirki	48.19	134.68	15.07.2014	1 ♂ (PQ498540)
Synthemistidae <i>sensu lato</i>					
<i>Macromidia rapida</i> Martin, 1907	Cambodia, Mondulkiri Province, a left tributary of the Monorom Waterfall River, 3.5 km SE of Sen Monorom	12.441	107.159	13.06.2014	1 ♂ (PQ498541)
Cordulegastridae					
<i>Cordulegaster picta</i> Selys, 1854	Russia, Krasnodarskiy Kray, Kabardinka village, the Krasnaya Shchel' Valley	44.671	37.918	30.07.2015	1 ♀ (PQ498538)
Libellulidae					
<i>Orthetrum albistylum</i> (Selys, 1848)	Russia, Primorskiy Kray, Khanka District, Lake Khanka W bank 2 km N of Platono-Aleksandrovskoe village	45.062	131.995	4.07.2014	1 ♀ (PQ498543)
<i>Orthetrum glaucum</i> (Brauer, 1865)	Cambodia, Mondulkiri Province, a brook downstream of the Buu Sraa Waterfall	12.570	107.418	10.06.2014	1 ♂ (PQ498544)
<i>Rhyothemis phyllis</i> (Sulzer, 1776)	Cambodia, Kampot Province, a left oxbow of the Kampot River downstream of Tek Chhou Rapids	10.672	104.137	21.08.2011	1 ♀ (PQ498545)
<i>Sympetrum arenicolor</i> Jödicke, 1994	Iran, Lorestan, Khorramabad County, 3.2 km NNW Pasil village	33.33	48.88	26.05.2017	1 ♂ (PQ498547)
<i>Sympetrum cordulegaster</i>	Russia, Khabarovskiy Kray, 28 km SE of Khabarovsk, a pond S of Bychikha village	48.292	134.829	21-22.08.2016	1 ♂ (PQ498588)

Table (end)

Species name	Locality	Latitude (N)	Longitude (E)	Date	Specimens, their codes (if any) and accession numbers of their sequences
<i>Sympetrum croceolum</i> (Selys, 1883)	Russia, Khabarovskiy Kray, Amursk District, Bolon'skiy Nature Reserve, Kirpu ranger station	49.506	136.028	15.09.2016	10 ♂♂ (Sc-1 – Sc-10; PQ498574– PQ498582)
	Russia, Khabarovskiy Kray, 28 km SE of Khabarovsk, Bychikha village	48.292	134.829	21-22.08.2016	2 ♀♀ (Sc-31, Sc-32; Q498583, PQ498586)
	Russia, Altai Republic, Mayma District, Lake Manzherok SE bank	51.82	85.81	16.09.2016	2 ♂♂ (Sc-41, Sc-42; PQ498584, PQ498585)
<i>Sympetrum danae</i> (Sulzer, 1776)	Russia, Novosibirsk, Academy Town, Botanical Garden	54.825	83.114	8.10.2015	12 ♂♂ (Sd-1, Sd-3 – Sd-12; PQ498549– PQ498557)
<i>Sympetrum flaveolum</i> (Linnaeus, 1758)	Russia, Novosibirsk, Academy Town, Botanical Garden	54.825	83.114	8.10.2015	1 ♂ (Sf-1; PQ498558), 1 ♀ (Sf-2; PQ498559)
	Russia, Primorskiy Kray, Lake Khanka W bank just N of Platono-Aleksandrovskoe village env.	45.06	131.99	4.07.2014	1 ♀ (Sf-3; PQ498560)
<i>Sympetrum fonscolombii</i> (Selys, 1840)	Iran, Esfahan Province, Golpayegan City, the Ghomrood (Anaarbar) River	33.46	50.26	21.05.2017	1 ♂ (No. 1)
	Russia, Krasnodarskiy Kray, Bol'shoy Utrish village env.	44.76	37.39	5.08.2015	1 ♂ (No. 2; PQ498589)
<i>Sympetrum pedemontanum</i> (Müller in Allioni, 1766)	Russia, Novosibirsk, a glade in a pine forest between Nizhnyaya El'tsovka and Pravye Chyomu estates	54.864	83.051	4.08.2018	1 ♂ (PQ498591)
<i>Sympetrum sanguineum</i> (Müller, 1764)	Russia, Novosibirsk Province, Kyshtovka District, a roadside swamp in the Kyshtovka village NW suburbs	56.579	76.603	14.07.2015	1 ♂ (Ss-1, PQ498590)
	Russia, Krasnodarskiy Kray, Lake Krugloe	44.677	37.594	10.06.2016	1 ♂ (Ss-2)
<i>Sympetrum striolatum</i> (Charpentier, 1840)	Iran, Lorestan, Borujerd County, Chenar Chashmah	33.798	48.905	25.05.2017	1 ♂ (PQ498592)
<i>Sympetrum vulgatum</i> (Linnaeus, 1758)	Russia, Krasnodarskiy Kray, Kabardinka village env., Krasnaya Shchel' Valley	44.672	37.922	6.07.2016	1 ♂ (PQ498593)
<i>Sympetrum uniforme</i> (Selys, 1883)	Russia, Khabarovskiy Kray, 28 km SE of Khabarovsk, Bychikha village	48.292	134.829	21- 22.08.2016	5 ♂♂, 4 ♀♀ (Su-21–Su-29; PQ498565– PQ498573)
	Russia, Khabarovskiy Kray, Amursk District, Bolon'skiy Nature Reserve, Kirpu ranger station	49.506	136.028	15.09.2016	1 ♂ (Su-1; PQ498563), 1 ♀ (Su-2; PQ498564)

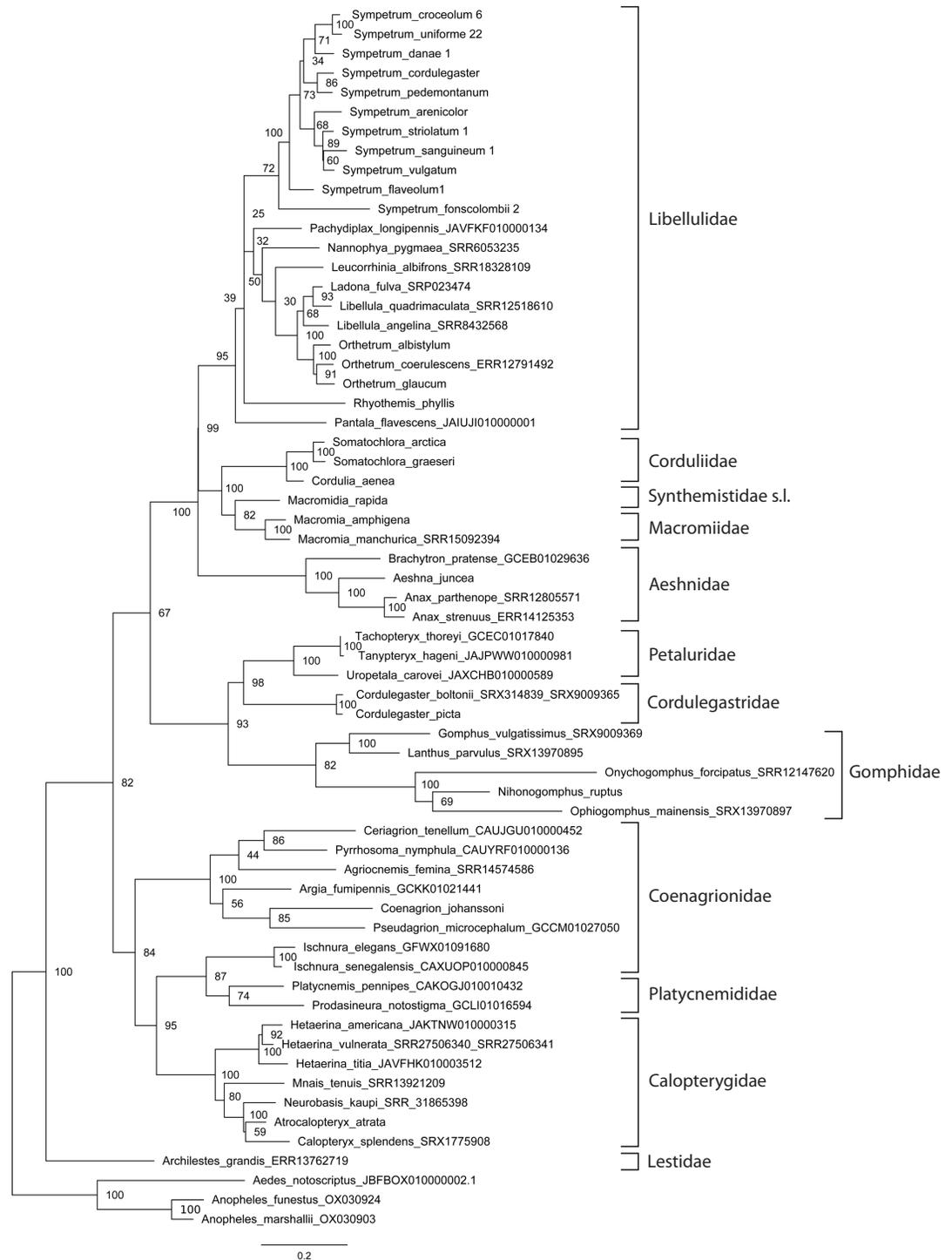


Fig. 2. Phylogenetic tree of the studied species of Odonata reconstructed with Maximum Likelihood method from the histone H3–H4 region sequences. Bootstrap values are shown at the respective nodes. Three species of Diptera, Culicidae serve as the outgroup.

accession numbers of the database entries used as sources of these sequences are indicated at species names in Figures 2 and 3.

Primer design. We designed 14 original primers to match different parts of insect histone genes coding for H1, H2B, H3, H4, comprising the histone gene cluster. At the start of the present work we did not know the precise order and orienta-

tion of the histone genes in the cluster, so we tested different primer combinations to select primer pair(s) which would produce an amplification product containing the fragments of the genes of histone H3 and H4 and the spacer between them. We found out that the pair of primers Hex_AR matching the 3' portion of the H3 gene (in the orientation opposite to that of transcription) and LH4_2R matching the 3' portion of the

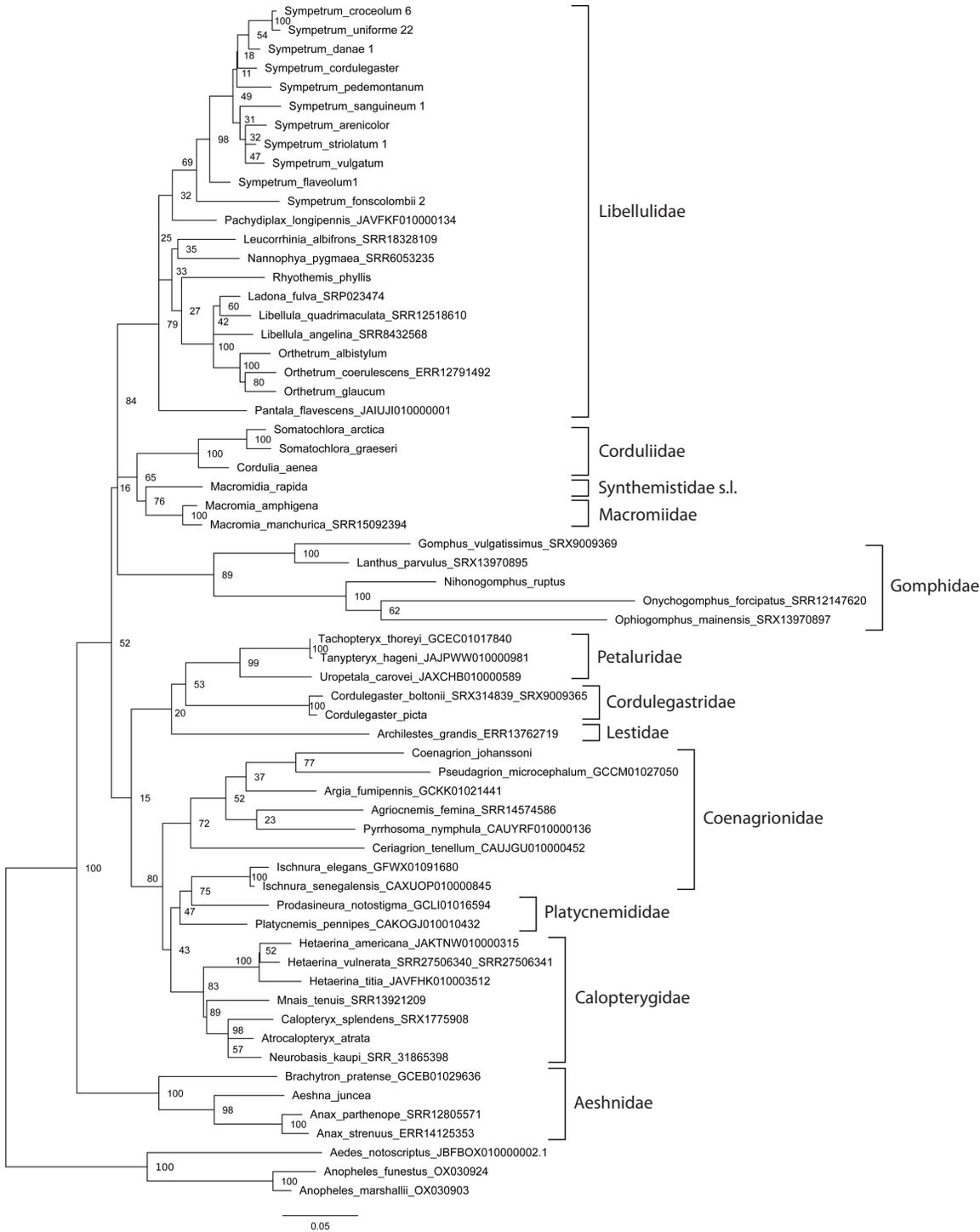


Fig. 3. Phylogenetic tree of the studied Odonata species reconstructed with the Maximum Likelihood method from fragments of the coding sequences of histone H3 and histone H4 genes involved into the proposed 'histone H3–H4 region' marker. Bootstrap values are shown at the respective nodes.

H4 gene (also in the orientation opposite to that of transcription) (Fig. 1) produced the expected product, indicating that the H3 and H4 genes were oriented anti-parallel as to their reading frames, with 5' ends of their coding chains oriented towards each other (Fig. 1). The primer sequences are as follows:

Hex_AR: 5' atacccttgggcatgatggtgac (forward)
LH4_2R: 5' ttaaccgccgaaccgtacagggt (reverse).

The primer LH4_2R, matching the coding region of the histone H4 of the moth *Bombyx mori* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Bombycidae) (GenBank accession AADK01010708), was worked out in the course of our previous study of the variation of the histone H1 gene in some Lepidoptera (Solovyev et al., 2015), although this particular primer was not mentioned in the cited work and is published here for the first time.

The Hex_AR primer was worked out to match the coding sequences of the histone H3 gene of *Ophiogomphus severus* (Hagen, 1874) (Odonata: Gomphidae) taken from GenBank (accession AY125228).

The coding sequences of histones H3 and H4 are well conserved (Stein et al., 1984; Doenecke et al., 1997; Eirín-López et al., 2009), so the primers worked out to match a particular sequence, one of which was from Odonata and the other from Lepidoptera, worked well for all tested species of Odonata.

DNA isolation, sequencing and analysis. Dragonfly legs were homogenized in a mortar in 0.2 ml of isolation buffer (0.1 Tris-HCl, pH 8.0; 0.05 M EDTA; 1.25 % SDS; 0.5 M NaCl) with Al₂O₃ as grinding particles, then mixed with 0.8 ml of the same buffer. The mixture was incubated for 1 h at 55 °C, then 350 µl of 5 M potassium acetate was added, the mixture was incubated for 30 min on ice and centrifuged at 16.1 g for 10 min. The supernatant was transferred to fresh tubes, mixed with 0.6 ml of isopropanol, incubated at room temperature for 1 h and centrifuged at 12.2 g for 10 min. The precipitate was washed twice with 0.1 ml 70 % ethanol with subsequent centrifugation at 12.2 g for 5 min, dried at 50 °C for 5 min and dissolved in 50 µl of deionized water.

PCR reaction was carried out in a volume of 20 µl with 2 µl of 10× ammonium sulphate buffer, 2 µl of 25 mM MgCl₂, 0.3 µl of the Hot Start Taq polymerase produced by SIBENZYME company, Novosibirsk (5 U/µl), 0.15 µl BSA (10 mg/ml), 1 µl of forward and reverse primers (10 pM) each, 2 µl of 2 mM dNTPs, 2 µl of diluted DNA (20–60 ng) and 10.55 µl of deionised water. For PCR, BIO-RAD MyCycler thermal cycler was used, with the reaction parameters as follows: denaturation at 95 °C for 3 min followed by 32 cycles including denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 25 s, elongation at 72 °C for 45 s. The PCR products were purified with Invisorb® Spin Filter PCRapid Kit and Sanger sequenced using Big Dye Terminators version 3.0 or 1.1 at SB RAS Genomic Core Facility.

Raw trace files were visualized and translated into nucleotide sequences with the use of the Gap4 software (Staden et al., 2003). The sequences were aligned with ClustalW (Larkin et al., 2007) using the MEGA 6.0 software package (Tamura et al., 2013) with default parameters. For a separate analysis of the non-coding spacer between the histone H3 and H4 genes, the relevant part of the alignment of the entire histone H3–H4 region was used, since separate alignment of the spacer sequences as such is less reliable.

The phylogenetic relationships were reconstructed with the Maximum Likelihood method using MEGA 6.0, with Kimura 2-parameter substitution model, as default in the package; rate among sites: gamma-distributed with invariant sites. Bootstrap values from 100 replications were calculated. The sequences of the histone H3–H4 region of three species of Diptera, *Aedes notoscriptus* (Skuse, 1889), *Anopheles funestus* (Giles, 1900) and *A. marshalli* (Theobald, 1903) from GenBank, were used as the outgroup for the order Odonata-wide phylogenetic reconstruction (Figs 2–4), because in Diptera we found the same order and orientation of the genes of histones H3 and H4.

The uncorrected p-distances between different alleles of the histone H3–H4 regions within species of *Sympetrum* were calculated with the MEGA 6.0 software (the entire matrix is not shown).

Results

The histone H3–H4 region was successfully amplified with the above suggested primer pair and sequenced from DNA isolated from specimens of Odonata enumerated in the Table, 59 individuals of 24 species. Together with the 36 sequences adopted from public databases, this comprised a sample of 95 sequences of 60 species.

The sequences of the histone H3–H4 region contained parts of the conservative coding sequences of the genes of histones H3 (351 b.p.) and H4 (288 b.p.) and the spacer between them of a variable length of about 250 b.p. All substitutions revealed in the coding sequence fragments were synonymous except for the substitution T > A in the first position of the second codon of the histone H4 gene, which changes threonine to serine, in both sequenced specimens of *S. fonscolombii* (Selys, 1840) (not shown). As expected, the sequences of bordering coding sequences were unambiguously aligned. At the same time the spacer is expectedly hyper-variable and exhibits a high rate of indels, so its alignment was much less certain and retained some ambiguity. The alignment involving one sequence per each studied species, including the outgroup, used for reconstruction of the phylogenetic tree of Figure 2, was 1019 b.p. long and had 583 (57 %) variable sites, 529 (52 %) parsimoniously informative sites and 42 (4 %) singletons. These numeric estimates, however, are conventional and should be taken with caution because of uncertainty of the alignment of the non-coding sequence of evolutionary distant species.

One specimen of *S. sanguineum* (Müller, 1764) (Ss-2), one specimen of *S. fonscolombii* (No. 1), and one specimen of *S. uniforme* (Su-23) appeared to be heterogeneous containing reads with and without deletion of a number of nucleotides in the spacer. One of those indels found in *S. sanguineum* (Ss-2) concerned just one base pair; so we were able to infer both sequence variants from the chromatogram but used for further analysis only one of them, chosen randomly. Indels found in the other two species were longer, about 5 and 10 b.p. Although the sequences beyond the deleted region could be reconstructed, we preferred to exclude these specimens from further analyses.

In some positions, the chromatograms revealed two peaks of comparable height suggesting within-specimen heterogeneity for nucleotides occupying these positions. Those positions reflected either heterozygosity for different alleles or cis-heterogeneity for the histone repeat along a histone cluster, quite expectable in the case of repeated units. Such positions made uncertain the exact number of unique alleles found in a species. A few chromatograms did not resolve nucleotides in a number of positions adjacent to the primers; we nevertheless involved the shortened, well resolved sequences into phylogenetic reconstructions.

First, we reconstructed a phylogenetic tree based on the sequence of the H3–H4 region from one representative of each involved species, both newly sequenced and available or reconstructed from public databases (Fig. 2). The tree was rooted with the sequences of mosquitoes *Anopheles* and *Aedes* used as the outgroup. The overall tree topology well corresponded to the family system of Odonata (Dijkstra et al., 2013), except for the odd position of the genus *Ischnura*, which is attributed to Coenagrionidae but clustered with Platythemidae, although with a weak bootstrap support of 83.

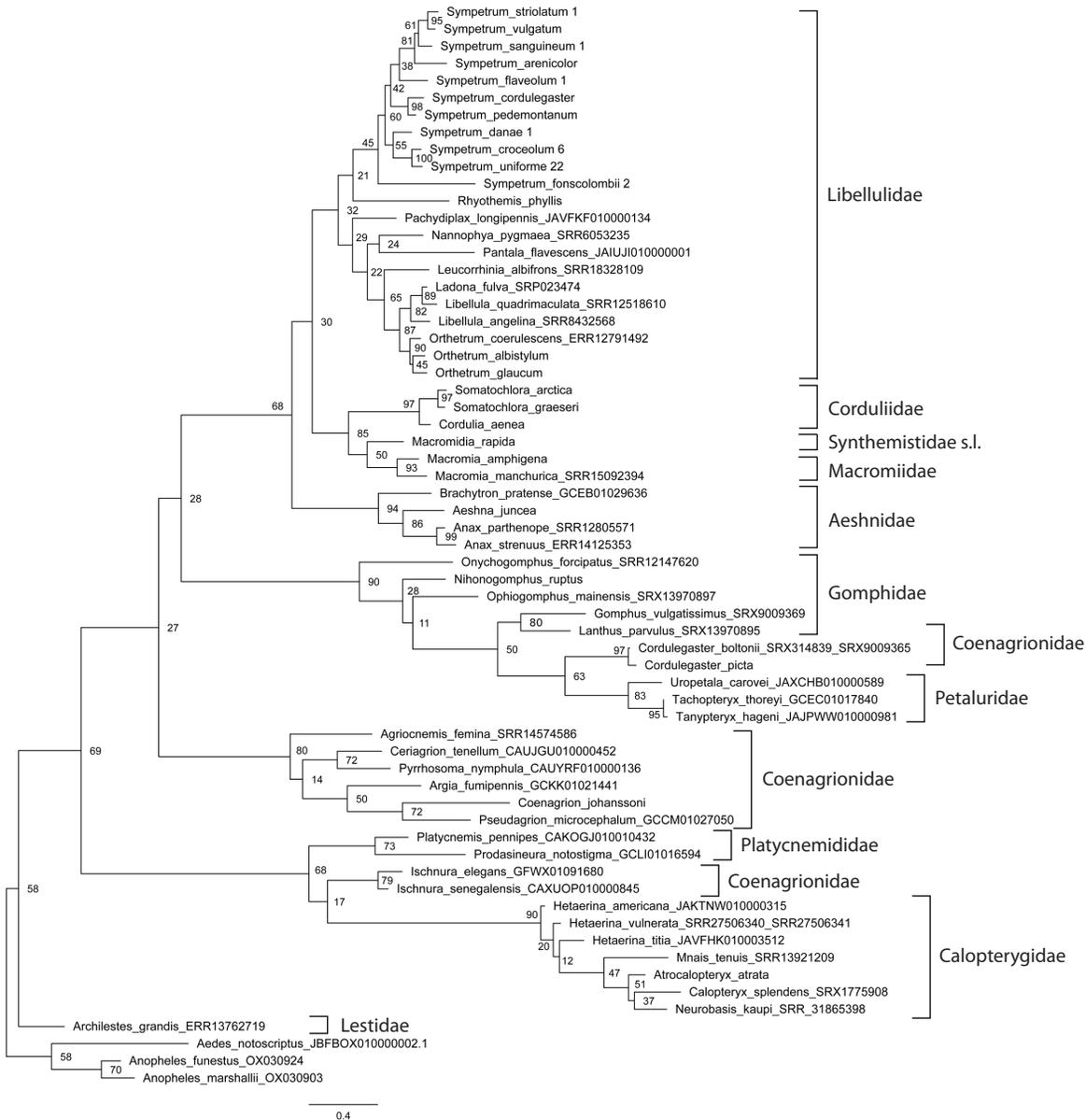


Fig. 4. Phylogenetic tree of the studied Odonata species reconstructed with the Maximum Likelihood method from the intergenic spacer between histone H3 and histone H4 genes. Bootstrap values are shown at the respective nodes.

Our tree included 10 currently recognised families of Odonata (Dijkstra et al., 2013) represented by several species. Seven of them were revealed as monophyletic clades well supported by high bootstrap values: Libellulidae (95), Corduliidae (100), Macromiidae (100), Aeshnidae (100), Petaluridae (100), Cordulegastriidae (100) and Calopterygidae (100). Two families appeared monophyletic with weak support: Gomphidae (82) and Platynemididae (74). The cluster of Coenagrionidae without *Ischnura* had the highest support of 100. Even representatives of the three families (Corduliidae, Macromiidae and Synthemistidae s. l.), previously considered in the family Corduliidae in the broad sense, also grouped in a cluster with the maximum support of 100.

Archilestes grandis is the only involved representative of Lestidae, the family considered to retain most plesiomorphic characters among Odonata (Dijkstra et al., 2013). Hence

its position as the most basal branch of Odonata was rather expected. If we were to exclude this branch formally attributed to Zygoptera, both suborders Anisoptera and Zygoptera would appear monophyletic but weakly supported (67 and 84, respectively).

The tree of Figure 2 includes nine genera represented by more than one species. Seven of them (*Orthetrum* Newmann, 1833, *Somatochlora*, *Macromia* Rambur, 1842, *Anax* Leach in Breuster, 1815, *Cordulegaster* Leach in Breuster, 1815, *Ischnura* Charentier, 1840, *Hetaerina* Hagen in Selys, 1853) had the highest support of 100. The genus *Sympetrum*, represented by 11 species, formed a monophyletic cluster with weak support (72). However, if we were to exclude the problematic (see below) divergent species *S. fonscolombii*, the remained 10 species would cluster together with the maximum support of 100. The genus *Libellula* Linnaeus, 1758 would

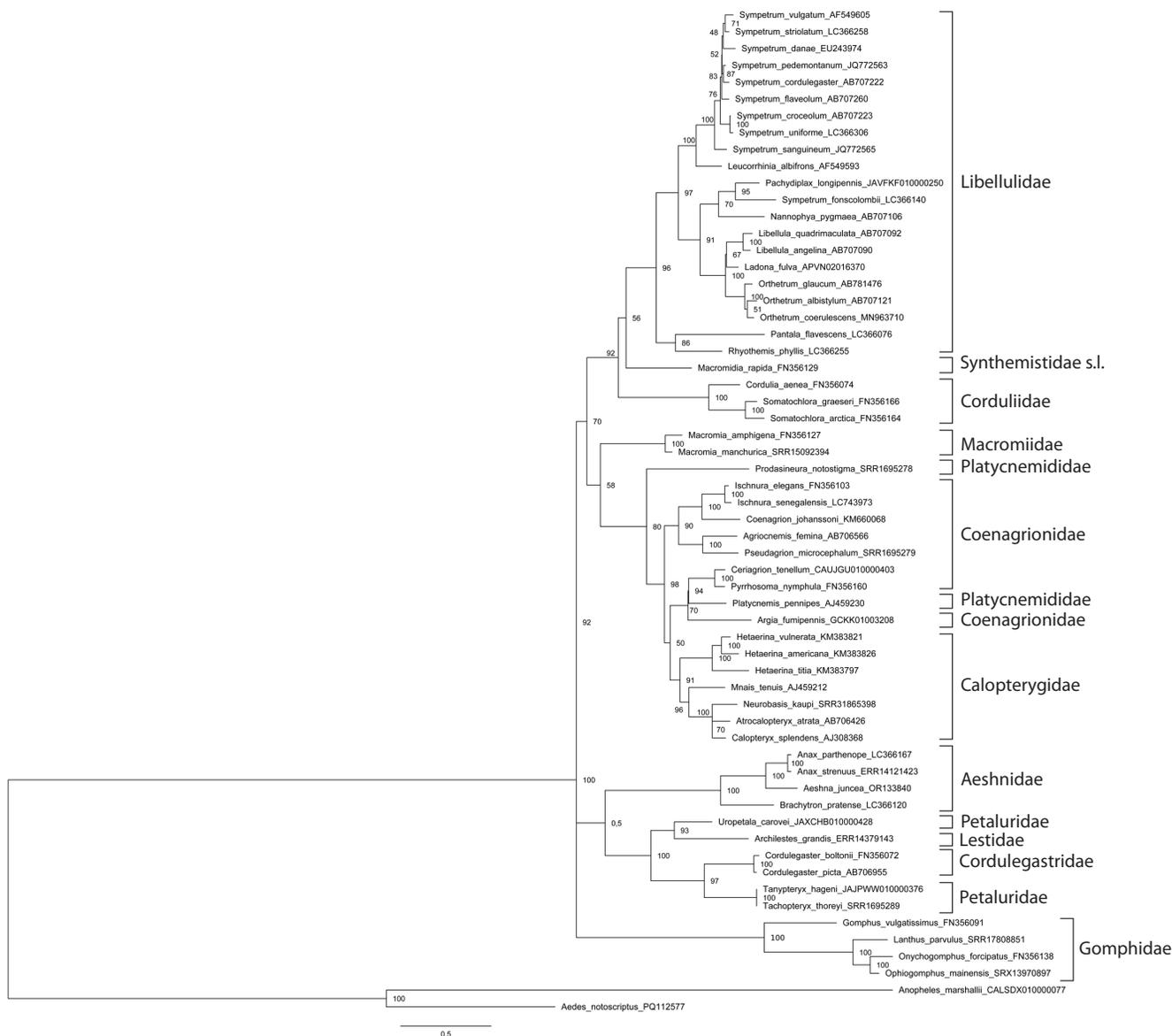


Fig. 5. Phylogenetic tree of the species of Odonata as in Figure 2 (with two omissions) reconstructed with the Maximum Likelihood method from the *ITS* region sequences adopted from GenBank. Bootstrap values are shown at the respective nodes. Two species of Diptera, Culicidae serve as the outgroup.

become monophyletic but weakly supported (68) if we were to assume *Ladona* Needham, 1897 to be its synonym, as it is often considered.

It was interesting to evaluate separate inputs into this phylogenetic resolution of the histone coding sequences and spacer, so we reconstructed phylogenetic trees based on these two components separately (Figs 3, 4). In both trees, terminal branches uniting close species or genera are mainly well supported. The support of families is somewhat lower than in the tree based on the entire histone H3–H4 region (Fig. 2), with the values in the tree based on the concatenated coding sequences of both histone genes (Fig. 3) being in general higher than in the tree based on the non-coding spacer (Fig. 4). The principal topology of the tree based on the spacer sequences (Fig. 4) remained similar to that of the tree based on the entire H3–H4 region (Fig. 2), but is not supported. The overall topology with respect to positions of families of the tree based on the coding

sequences (Fig. 3) is different, does not reflect dichotomy for the two suborders and is even less supported than in the spacer tree (Fig. 4). This can be attributed to saturation of conservative histone gene sequences by synonymous substitutions at long evolutionary distances. Altogether, we may conclude that both parts of the histone H3–H4 region have their input into its resolving power, but the best result is produced by the two parts taken together.

As stated above, the phylogenetic marker proposed here, the histone H3–H4 region, is similar to the popular *ITS* region containing rRNA genes and two non-coding spacers between them. To compare phylogenetic resolution of these two markers, we reconstructed a phylogenetic tree based on the *ITS* region sequences adopted from GenBank, which contains the same species except for *N. ruptus* and *S. arenicolor* (Fig. 5). The alignment of these sequences was 1048 b.p. long and had 878 (84 %) variable sites, 529 (71 %) parsimoniously

of different specimens of a species clustered together with the maximum support or nearly so, and cases of tight clustering of different species corresponded to the notion of their relatedness based on morphology.

It is noteworthy that the sequences of two specimens of *S. croceolum* from its West Siberian isolate (specimens Sc-41 and Sc-42) (Kosterin, 2002) did not show divergence from those from the main Far Eastern range of the species (the rest of the specimens) but were nested among them.

Discussion

The marker proposed

We may conclude that the phylogenetic information provided by the proposed marker well resolved the overall phylogenetic relationships of Odonata at taxonomic levels of families, genera and species (Fig. 2), with few notable exceptions, which could actually reflect weak points of the currently accepted taxonomic system (Dijkstra et al., 2013).

The high conservation of the histone H3 and H4 proteins is paralleled by the high conservation of their coding sequences, the variation of which is nearly confined to synonymous substitutions (Stein et al., 1984; Doenecke et al., 1997; Eirín-López et al., 2009). This allowed us to design primers highly specific to these particular genes but of a very broad applicability to biological objects. It is noteworthy that the substitutions in the histone coding sequence, the overwhelming majority of which are synonymous, provide enough variation for satisfactory resolution of phylogenetic relations between the studied species (Fig. 3). Because of this, the histone H3 gene coding sequence has been broadly used as a phylogenetic marker for short evolutionary distances, e. g. in Odonata by Carle et al. (2015), with conserved positions permitting universal primers whereas the phylogenetic signal being mostly provided by synonymous substitutions.

The marker proposed here, the histone H3–H4 region, has an advantage of possibility to design highly universal primers matching the most conserved eukaryotic coding regions, those of histones H3 and H4. Note that we used the LH4_2R primer designed to match the sequence of a lepidopteran, *B. mori*. The amplified fragment contains most of the coding region of histone H4 and about a half of that of histone H3, and ca 250 b.p. long spacer between them. No significant adaptive constraint is expected for variation of the spacer, except for the origins of transcription of both genes (in opposite directions, with the transcribed sequences not overlapping), which the spacer contains judging from transcriptome data in public databases (not shown). Hence, the spacer enjoys mostly a neutral regime of evolution and may serve as a molecular clock.

The histone H3–H4 region includes both highly conserved coding sequences and a neutrally variable non-coding spacer, and is tandemly repeated; this makes the proposed phylogenetic marker similar in biological and technical respects to such a popular nuclear marker as the ITS region of the nucleolus organiser (for its use in Odonata, see Hovmöller, Johansson, 2004; Dumont et al., 2010; Schneider et al., 2023) including the internal spacers *ITS1* and *ITS2* and the functional 5.8 S rRNA between them. The length of ca 250 b.p. of the spacer in the marker proposed here is comparable to ca 200 b.p. of *ITS1* and ca 160 b.p. of *ITS2* (these figures are for Odonata).

Both markers, the *ITS* and the histone H3–H4 region, have comparable lengths (ca 900 b.p.) and suffer from the same drawback of certain ambiguity of alignment because of frequent indels. Both are encoded by the nuclear genome but functionally unrelated. Hence the histone H3–H4 region can be used for the same purposes as the *ITS* region. Moreover, comparison of phylogenetic resolution of Odonata at the family level (Figs 2, 5) showed that the H3–H4 region adequately resolved the phylogeny of the Odonata families (Fig. 2) while the *ITS* region rather failed to do this (Fig. 5), so the use of the former is preferable at this level.

Therefore, the use of the histone H3–H4 region can update the traditional analysis of the *ITS* region with about the same amount of independent phylogenetic information of the same nature. A joint analysis of both similar but unrelated nuclear markers, the *ITS* and H3–H4 regions (by their concatenation or, better, involving software specially designed for simultaneous analysis of different markers), is expected to provide a more robust phylogenetic inference than the analysis of *ITS* alone. Judging by the phylogenetic trees obtained (Figs 2, 6), the use of the histone H3–H4 region as a phylogenetic marker is highly recommendable at the levels of species and genera. Since it correctly resolves the family structure of the order, with few exceptions, it could also be useful at the level of families as well, but better as an additional marker analysed together with other phylogenetic markers.

Applicability of the new marker beyond Odonata

Because of conservativeness of the histone H3 and H4 genes, the new marker can be used with the primers provided herein for any Odonata and other insects with the same order and orientation of the histone H3 and H4 genes in the histone repeat. Our investigation of public databases revealed the same order and orientation of these two genes in the histone repeat in a number of species of Diptera. In the present study, they are exemplified by such genera as *Aedes* Meigen, 1818 and *Anopheles* Meigen, 1818, used as the outgroup in the phylogenetic trees of Figures 2–4. The same order was found in *D. melanogaster* (Goodenough, 1984), which represents another suborder of Diptera. Besides, the same was found in the *Formica* Linnaeus, 1758 ants representing Hymenoptera.

For the use of the marker proposed here in insects with other order or orientations of these genes, other relevant primers have to be worked out. For example, in Lepidoptera, where the genes of histones H3 and H4 have parallel orientation, the same LH4-2R primer can be used in combination with a primer of the sequence which is a reverse complement of that of the Hex-AR primer. In this case, the portion of the coding sequence of the H3 gene will be smaller, 37 b.p., and the spacer will be somewhat longer – about 900–1400 b.p.

Histone genes are organised in tandem repeats in a broad range of large groups of organisms such as amphibians, fish, echinoderms, arthropods and annelids (Eirín-López et al., 2009). Among the examples given by Eirín-López et al. (2009), beyond insects, the genes of histones H3 and H4 are adjacent in the histone repeat in the rainbow trout (fish), *Xenopus* spp. (amphibians), starfish (species not indicated, echinoderms), *Asellus aquaticus* (Linnaeus, 1758) (crustacean) and three species from different genera of annelids (Eirín-López et al., 2009: Fig. 8.2). All these groups are potential targets



Fig. 7. Males of *Sympetrum croceolum* (top – Russia, Novosibirsk Academy Town env., 24.08.2023) and *S. uniforme* (bottom – Russia, Primorye, Gornye Klyuchi env., Draguchina Arm of the Ussuri River, 30.07.2020) in nature. Photos by O. Kosterin.

for the use of versions of the marker proposed here based on the coding sequences of the histone H3 and H4 genes and the spacer between them, taking into account orientation of the two genes. Moreover, among the organisms mentioned, the crustacean *A. aquaticus* and the annelids *Platynereis dumerilii* (Audouin, Milne-Edwards, 1834) and *Chaetopterus variopedatus* (Reiner, 1804) have the same orientation of the two genes as Odonata (Eirín-López et al., 2009: Fig. 8.2). Taking into account the high conservativeness of the histone H3 and H4 genes, it is not excluded that the marker proposed here is applicable to these objects with the same primers.

Phylogenetic relationships among *Sympetrum* spp.

The analysis of the new marker yielded two rather unexpected results at once, both concerning the species *S. croceolum* and *S. uniforme* (Fig. 6). First, *S. uniforme* appeared to be an inner branch nested inside *S. croceolum*. This result appeared robust regardless of the methods and models of phylogenetic reconstructions (not shown). These species are obviously related but well distinguishable by the morphology of the male genitalia and female vulvar scale, wing coloration (dull,

complete but gradually changing in intensity in *S. uniforme* versus bright but with gaps in *S. croceolum*) (Fig. 7) and size (in the former it is somewhat larger). In East Asia, they usually co-exist in a wide range of lentic habitats (Onishko, Kosterin, 2021), while *S. croceolum* also has an isolated range fragment in the southern West Siberia (Kosterin, 1987; 2002; Popova, Haritonov, 2020). It should be stressed that specimens of *S. uniforme*, identified by external characters, formed a highly supported cluster (Fig. 6). There is no doubt that *S. croceolum* and *S. uniforme* are *bona species*. The phylogenetic pattern obtained, where the sequences of *S. uniforme* are nested inside those of *S. croceolum*, suggests *S. uniforme* being a phyletic descendant of *S. croceolum*, which hence appeared paraphyletic. This contradicts the cladistic approach in systematics and the phylogenetic concept of species. At the same time, this pattern fits well the so-called punctuated equilibria mode of speciation (Eldredge, Gould, 1972), suggesting that speciation takes place for short time periods in evolutionary scale (tens to hundreds of thousand years) in small, isolated populations in the periphery of parental species' ranges, while species exist almost unchanged for millions of years (evolutionary stasis). This concept better fits the basics of evolutionary genetics (Mayr, 1963; Berdnikov, 1999) than the earlier prevailing model of gradual divergent evolution. In the punctuated evolution point of view, species 'propagate' as if being individuals, with younger species often co-existing with their parental species.

In the phylogenetic tree based on the histone H3–H4 region (Fig. 6), two analyzed specimens of *S. croceolum* from its West Siberian isolate (specimens Sc-41 and Sc-42 from Lake Manzherok) lacked supported divergence from specimens from the main Far Eastern range of the species (the rest of the specimens), which is quite remarkable. Specimens from the West Siberian isolate (Kosterin, 2002) differ from the Far Eastern specimens by a much more developed wing amber colour and an appearance of a brown infumation in the wing apical parts and so were for a long time supposed to represent a separate subspecies (Kosterin, 1987; Popova, Haritonov, 2020), which, however, has not been named yet. This lack of divergence at the molecular level suggests the West Siberian isolate to be very young in evolutionary time scale and well fits its hypothetic Holocene age, implying the range split after Atlantic time (Kosterin, 2002), as well as in some nemoral species of Lepidoptera (Dubatolov, Kosterin, 2000; Solovyev et al., 2015, 2022). This, however, does not exclude a subspecies rank of the West Siberian population(s), since subspecies are entities of well-defined geographical variation for some phenotype characters, which implies specific divergence of the genes determining these characters rather than those of the entire genome.

In all phylogenetic reconstructions from sequences of the histone H3–H4 region (Figs 2, 6), *S. fonscolombii* is strongly diverged from the rest of the genus *Sympetrum*. The same result was earlier obtained by Pilgrim and von Dohlen (2012) who undertook a molecular phylogenetic study of *Sympetrum* and related genera based on the joint analysis of the nuclear marker *EF-1a* and *ITS2*, and the mitochondrial genes *16S*, *tRNA valine*, *12S*, and *COI*. This divergent position of *S. fonscolombii* has long ago been recognised at the level of phenotype, resulting in a suggestion to move *S. fonscolombii* to

the genus *Tarnetrum* Needham and Fischer, 1936 (Schmidt, 1987). This genus was erected for two Nearctic species, *Mesothemis corrupta* Hagen 1861, and *M. illota* Hagen, 1861 (mentioned in (Schmidt, 1987) as well as presently considered in combinations *S. illotum* and *S. corruptum*), with *M. illota* (sub. *S. illotum*) indicated as the type species (Needham, Fischer, 1936). However, according to Pilgrim and von Dohlen (2012), *S. corruptum* is quite closely related to *S. fonscolombii* (together with *S. villosum* Ris, 1911 and *Nesogonia blackburni* (McLachlan, 1883)) while *S. illotum* is not. Since the type species of the genus *Tarnetrum* is not closely related to *S. fonscolombii*, this genus is not suitable for the latter species (Dijkstra, Kalkman, 2015). Therefore, the genus *Sympetrum* in the current sense deserves further reconsideration, maybe with erection of a new genus at least for the *fonscolombii*-group *sensu* Pilgrim et al. (2012).

References

- Avise J.C. Phylogeography: retrospect and prospect. *J Biogeogr.* 2009; 36:3-15. doi 10.1111/j.1365-2699.2008.02032.x
- Ballard J.W.O., Whitlock M.C. The incomplete natural history of mitochondria. *Mol Ecol.* 2004;13:729-744. doi 10.1046/j.1365-294x.2003.02063.x
- Berdnikov V.A. Evolution and Progress. Sofia; Moscow: Pensoft, 1999
- Bybee S.M., Kalkman V.J., Erickson R.J., Frandsen P.B., Breinholt J.W., Suvorov A., Dijkstra K.B., ... Abbott J.C., Sanchez Herrera M., Lemmon A.R., Moriarty Lemmon E., Ware J.L. Phylogeny and classification of Odonata using targeted genomics. *Mol Phy Evol.* 2021;160:107115. doi 10.1016/j.ympev.2021.107115
- Carle F.L., Kjer K.M., May M.L. A molecular phylogeny and classification of Anisoptera. *Arthropod Syst Phylo.* 2015;73(2):281-301. doi 10.3897/asp.73.e31805
- Cheng Y.-C., Chen M.-Y., Wang J.-F., Liang A.P., Lin C.-P. Some mitochondrial genes perform better for damselfly phylogenetics: species- and population-level analyses of four complete mitogenomes of *Euphaea* sibling species. *Syst Entomol.* 2018;43(4):702-715. doi 10.1111/syen.12299
- Cheng Z., Li Q., Deng J., Liu Q., Huang X. The devil is in the details: Problems in DNA barcoding practices indicated by systematic evaluation of insect barcodes. *Front Ecol Evol.* 2023;11:1149839. doi 10.3389/fevo.2023.1149839
- Chevreaux B., Wetter T., Suhai S. Genome sequence assembly using trace signals and additional sequence information. In: Computer Science and Biology: Proceedings of the German Conference on Bioinformatics (GCB). 1999;99:45-56
- Deng J., Assandri G., Chauhan P., Futahashi R., Galimberti A., Hansson B., Lancaster L.T., Takahashi Y., Svensson E.I., Douploy A. *Wolbachia*-driven selective sweep in a range expanding insect species. *BMC Ecol Evol.* 2021;21:181. doi 10.1186/s12862-021-01906-6
- Dijkstra K.D.B., Bechly G., Bybee S.M., Dow R.A., Dumont H.J., Fleck G., Garrison R.W., ... Theischinger G., Trueman J.W.H., Van Tol J., Von Ellenrieder N., Ware J. The classification and diversity of dragonflies and damselflies (Odonata). *Zootaxa.* 2013;3703(1): 36-45. doi 10.11646/zootaxa.3703.1.9
- Dijkstra J.P., Kalkman V. Taxonomy. In: Boudot J.P., Kalkman V.J. (Eds). Atlas of the European dragonflies and damselflies. The Netherlands: KNNNV Publishing, 2015;15-25
- Doenecke D., Albig V., Bode C., Drabent B., Franke K., Gavenis K., Witt O. Histones: genetic diversity and tissue-specific gene expression. *Histochem Cell Biol.* 1997;107:1-10. doi 10.1007/s004180050083
- Dow R.A., Butler S.G., Reels G.T., Steinhoff O.M., Stokvis F., Unggang L. Previously unpublished Odonata records from Sarawak, Borneo, part IV: Bintulu Division including the Planted Forest Project and Similajau National Park. *J Int Dragonfly Fund.* 2019;27: 1-66
- Dubatolov V.V., Kosterin O.E. Nemoral species of Lepidoptera (Insecta) in Siberia: a novel view on their history and the timing of their range disjunctions. *Entomol Fennica.* 2000;11(3):141-166. doi 10.33338/ef.84061
- Dumont H.J., Vierstraete A., Vanfleteren J.R. Molecular phylogeny of the Odonata (Insecta). *Syst Entomol.* 2010;35(1):6-18. doi 10.1111/j.1365-3113.2009.00489.x
- Eirín-López J.M., González-Romero R., Dryhurst D., Méndez J., Ausio J. Long-term evolution of histone families: old notions and new insights into their mechanisms of diversification across eukaryotes. In: Pontarotti P. (Ed.). Evolutionary Biology: Concept, Modeling, and Application. Heidelberg: Springer, 2009;139-162. doi 10.1007/978-3-642-00952-5_8
- Eldredge N., Gould S.L. Punctuated equilibria: an alternative to phyletic gradualism. In: Schopf T.J.M. (Ed.). Models in Palaeobiology. San Francisco: Freeman, Cooper & Co., 1972;82-115
- Ferreira S., Lorenzo-Carballa M.O., Torres-Cambas Y., Cordero-Rivera A., Thompson D.J., Watts P.C. New EPIC nuclear DNA sequence markers to improve the resolution of phylogeographic studies of coenagrionids and other odonates. *Int J Odonatol.* 2014;17(2-3): 135-147. doi 10.1080/13887890.2014.950698
- Ferreira S., Boudot J.-P., El Haissoufi M., Alves P.C., Thompson D.J., Watts P.C. Genetic distinctiveness of the damselfly *Coenagrion puella* in North Africa: an overlooked and endangered taxon. *Conserv Genet.* 2016;17:985-991. doi 10.1007/s10592-016-0826-5
- Futahashi R., Kawahara-Miki R., Kinoshita M., Yoshitake K., Yajima S., Arikawa K., Fukatsu T. Extraordinary diversity of visual opsin genes in dragonflies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112(11): E1247-E1256. doi 10.1073/pnas.1424670112
- Galimberti A., Assandri G., Maggioni D., Ramazotti F., Baroni D., Bazzi G., Chiandetti I., ... Ramellini S., Santinelli R., Soldato G., Surdo S., Casiraghi M. Italian odonates in the Pandora's box: a comprehensive DNA barcoding inventory shows taxonomic warnings at the Holarctic scale. *Mol Ecol Resour.* 2021;21(1):183-200. doi 10.1111/1755-0998.13235
- Geiger M., Koblmüller S., Assandri G., Chovanec A., Ekrem T., Fischer I., Galimberti A., ... Sittenthaler M., Stur E., Tończyk G., Zangl L., Moriniere J. Coverage and quality of DNA barcode references for Central and Northern European Odonata. *PeerJ.* 2021; 9:e11192. doi 10.7717/peerj.11192
- Goodenough U. Genetics. Hong Kong: CBS College Publishing, 1984
- Gurdon C., Svab Z., Feng Y., Kumar D., Maliga P. Cell-to-cell movement of mitochondria in plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016; 113(12):3395-3400. doi 10.1073/pnas.1518644113
- Hovmöller R., Johansson F. A phylogenetic perspective on larval spine morphology in *Leucorrhinia* (Odonata: Libellulidae) based on ITS1, 5.8s and ITS2 rDNA sequences. *Mol Phy Evol.* 2004;30(3): 653-662. doi 10.1016/S1055-7903(03)00226-4
- Karube H., Futahashi R., Sasamoto A., Kawashima I. Taxonomic revision of Japanese Odonata species, based on nuclear and mitochondrial gene genealogies and morphological comparison with allied species. Part I. *Tombo.* 2012;54:75-106
- Kohli M., Letsch H., Greve C., Bethoux O., Deregnacourt I., Liu S., Zhou X., ... Rust J., Wappler T., Yu X., Misof B., Ware J. Evolutionary history and divergence times of Odonata (dragonflies and damselflies) revealed through transcriptomics. *iScience* 2021;24(11): 103324. doi 10.1016/j.isci.2021.103324
- Kosterin O.E. Discovery of East-Asiatic dragonfly (Odonata, Libellulidae) at the Manzherock Lake (Altay). In: Cherepanov A.I. (Ed.). Nasekomye, kleshchi i gel'minty. Noveye i maloizvestnye vidy fauny Sibiri. Novosibirsk: Nauka, 1987;57-63 [in Russian]
- Kosterin O.E. Western range limits and isolates of eastern odonate species in Siberia and their putative origins. *Odonatologica.* 2002; 34(3):219-242
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007;23(21):2947-2948. doi 10.1093/bioinformatics/btm404

- Lorenzo-Carballa M.O., Sanmartín-Villar I., Cordero-Rivera A. Molecular and morphological analyses support different taxonomic units for Asian and Australo-Pacific forms of *Ischnura aurora* (Odonata, Coenagrionidae). *Diversity*. 2022;14(8):606. doi 10.3390/d14080606
- Lowe C.D., Harvey I.F., Thompson D.J., Watts P.C. Strong genetic divergence indicates that congeneric damselflies *Coenagrion puella* and *C. pulchellum* (Odonata: Zygoptera: Coenagrionidae) do not hybridise. *Hydrobiologia*. 2008;605:55-63. doi 10.1007/s10750-008-9300-9
- Mayr E. Zoological species and evolution. Cambridge, Massachusetts: The Belknap Press of Harvard University Press, 1963
- Needham J.G., Fischer E. The nymphs of North American libelluline dragonflies. *Trans Am Entomol Soc*. 1936;62(2):107-116
- Onishko V., Kosterin O. Dragonflies of Russia. Illustrated Photo Guide. Moscow: Phytos XXI, 2021 [in Russian]
- Ožana S., Dolný A., Pánek T. Nuclear copies of mitochondrial DNA as a potential problem for phylogenetic and population genetic studies of Odonata. *Syst Entomol*. 2022;47(4):591-602. doi 10.1111/syen.12550
- Pilgrim E.M., von Dohlen C.D. Phylogeny of the dragonfly genus *Sympetrum* (Odonata: Libellulidae). *Org Divers Evol*. 2012;12:281-295. doi 10.1007/s13127-012-0081-7
- Popova O.N., Haritonov A.Y. On the distribution of *Sympetrum croceolum* in the Russian part of its range (Odonata: Libellulidae). *Odonatologica*. 2020;49(1/2):29-49. doi 10.5281/zenodo.3823325
- Schmidt E. Generic reclassification of some Westpalaearctic Odonata taxa in view of their Nearctic affinities. *Adv Odonatol*. 1987;3(1):135-145
- Schneider T., Vierstraete A., Kosterin O.E, Ikemeyer D., Hu F.-S., Snegovaya N., Dumont H.J. Molecular phylogeny of Holarctic Aeshnidae with a focus on the West Palaearctic and some remarks on its genera worldwide (Aeshnidae, Odonata). *Diversity*. 2023;15(9):950. doi 10.3390/d15090950
- Solovyev V.I., Bogdanova V.S., Dubatolov V.V., Kosterin O.E. Range of a Palearctic uraniid moth *Eversmannia exornata* (Lepidoptera: Uraniidae: Epipleminae) was split in the Holocene, as evaluated using histone H1 and COI genes with reference to the Beringian disjunction in the genus *Oreta* (Lepidoptera: Drepanidae). *Org Divers Evol*. 2015;15(2):285-300. doi 10.1007/s13127-014-0195-1
- Solovyev V.I., Dubatolov V.V., Vavilova V.Y., Kosterin O.E. Estimating range disjunction time of the Palearctic Admirals (*Limenitis* L.) with COI and histone H1 genes. *Org Divers Evol*. 2022;22:975-1002. doi 10.1007/s13127-022-00565-9
- Staden R., Judge D.P., Bonfield J.K. Managing sequencing projects in the GAP4 environment. In: Krawetz S.A., Womble D.D. (Eds). Introduction to Bioinformatics. Human Press Inc., 2023;327-224. doi 10.1007/978-1-59259-335-4_20
- Stein G.S., Stein J.L., Marzluft W.F. (Eds). Histone Genes: Structure, Organization, and Regulation. New York: Willey, 1984
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013;30:2725-2729. doi 10.1093/molbev/mst197

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

Received March 19, 2025. Revised April 24, 2025. Accepted April 24, 2025.

doi 10.18699/vjgb-25-95

Complete plastome sequences of *Lonicera* L. species: implications for phylogeny and comparative analysis

S.S. Almerikova ¹, M.M. Yermagambetova ¹, D.Y. Yerbolatov ¹, M.Y. Ishmuratova ², Y.K. Turuspekov ^{1,2} 

¹ Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan

² Karaganda Buketov University, Karaganda, Kazakhstan

 yerlant@yahoo.com

Abstract. *Lonicera* L. is one of the largest and economically significant genera in the family Caprifoliaceae Juss., with a controversial taxonomy. To contribute to its molecular taxonomy, we sequenced the plastomes of *Lonicera* species: *Lonicera caerulea* (two subspecies), *L. tatarica*, and *L. micrantha* – using next-generation sequencing technology and conducted a comparative analysis. Plastome sizes ranged from 153,985 bp in *L. micrantha* to 164,000 bp in *L. caerulea* subsp. *pallasii*, each containing 130 genes, including 85 protein-coding, 37 tRNA, and 8 rRNA genes. Five protein-coding (*rps7*, *rps12*, *ndhB*, *ycf2*, and *ycf15*), 7 tRNA (*trnA-UGC*, *trnI-CAU*, *trnI-GAU*, *trnL-CAA*, *trnN-GUU*, *trnR-ACG*, and *trnV-GAC*), and 4 rRNA (*rrn4.5*, *rrn5*, *rrn16*, and *rrn23*) genes were duplicated. Comparative analysis of *Lonicera* plastome boundaries revealed structural variations in *L. caerulea* subsp. *altaica* and *L. caerulea* subsp. *pallasii*, particularly in *ndhA* gene distribution. Three highly variable, two intergenic (*ycf1-trnN-GUU* and *trnN-GUU-ndhF*) and one genic (*accD*) region were identified. A total of 641 simple sequence repeats were detected in four plastomes. Phylogenetic analyses grouped *Lonicera* samples into two clades corresponding to subgenera *Periclymenum* and *Chamaecerasus*. In this study, the plastid genomes of two subspecies of *L. caerulea* and species *L. micrantha* were sequenced for the first time. The maximum likelihood tree derived from complete plastid genome sequences proved to be the most informative, showing a topology consistent with previous studies. The nucleotide sequences of variable regions (*accD-ycf1-ndhF-trnN-GUU*) demonstrate high potential for use in DNA barcoding and may serve as valuable molecular markers for species phylogenetic studies within the genus *Lonicera*.

Key words: *Lonicera*; Kazakhstan; next-generation sequencing; variable regions; DNA-barcoding markers; simple sequence repeats

For citation: Almerikova S.S., Yermagambetova M.M., Yerbolatov D.Y., Ishmuratova M.Y., Turuspekov Y.K. Complete plastome sequences of *Lonicera* L. species: implications for phylogeny and comparative analysis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(6):883-895. doi 10.18699/vjgb-25-95

Funding. This research has been funded by the Committee of Science of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan (Grant No. BR21882166).

Полные последовательности пластовов видов *Lonicera* L.: значение для филогении и сравнительный анализ

Ш.С. Альмерикова ¹, М.М. Ермагамбетова ¹, Д.Е. Ерболатов ¹, М.Ю. Ишмуратова ², Е.К. Туруспеков ^{1,2} 

¹ Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан

² Карагандинский университет им. академика Е.А. Букетова, Караганда, Казахстан

 yerlant@yahoo.com

Аннотация. Род *Lonicera* L. – один из крупнейших и экономически значимых в семействе Caprifoliaceae Juss., таксономия которого остается спорной. С целью внесения вклада в молекулярную таксономию данного рода мы секвенировали пластомы видов *Lonicera* – *L. caerulea* (два подвида), *L. tatarica* и *L. micrantha* – с использованием технологии секвенирования нового поколения и провели сравнительный анализ. Размеры пластовов варьировали от 153 985 п. н. у *L. micrantha* до 164 000 п. н. у *L. caerulea* subsp. *pallasii*; каждый пластом содержал 130 генов, включая 85 генов, кодирующих белок, 37 тРНК и 8 рРНК генов. Пять белок-кодирующих (*rps7*, *rps12*, *ndhB*, *ycf2* и *ycf15*), 7 тРНК (*trnA-UGC*, *trnI-CAU*, *trnI-GAU*, *trnL-CAA*, *trnN-GUU*, *trnR-ACG* и *trnV-GAC*) и 4 рРНК (*rrn4.5*, *rrn5*, *rrn16* и *rrn23*) гена были дублированы. Сравнительный анализ границ пластовов у видов *Lonicera* выявил структурные вариации у *L. caerulea* subsp. *altaica* и *L. caerulea* subsp. *pallasii*, особенно в распределении гена *ndhA*. Были идентифицированы три высоковариабельные области: две межгенные (*ycf1-trnN-GUU* и *trnN-GUU-ndhF*) и одна генная (*accD*). В четырех пластомах обнаружено всего 641 простая повторяющаяся последовательность (SSR). Филогенетический анализ сгруппировал образцы *Lonicera* в два клада, соответствующих под родам *Periclymenum* и *Chamaecerasus*. В настоящем исследовании впервые секвенированы пластидные геномы двух

подвидов *L. caerulea* и вида *L. micrantha*. Древо, построенное методом maximum likelihood на основе полных последовательностей пластома, оказалось наиболее информативным и продемонстрировало топологию, согласующуюся с предыдущими исследованиями. Нуклеотидные последовательности переменных регионов (*accD-ycf1-ndhF-trnN-GUU*) обладают высоким потенциалом для использования в ДНК-баркодировании и могут служить ценными молекулярными маркерами для филогенетических исследований видов внутри рода *Lonicera*.

Ключевые слова: *Lonicera*; Казахстан; секвенирование нового поколения; переменные регионы; маркеры ДНК-баркодирования; простые повторяющиеся последовательности

Introduction

Lonicera L. is the largest genus in the family Caprifoliaceae Juss., comprising approximately 140 species (Wang G.Q. et al., 2024), which are widely distributed across North America, Europe, Asia, and Africa (Donoghue et al., 2001; Wen, 2001). *Lonicera* species exhibit diverse constituents, including saponins, flavonoids, iridoids, phenolic acids, alkaloidal glycosides, etc. (Lin et al., 2008; Ali et al., 2013; Yang Q.R. et al., 2016; Ni, 2017). Moreover, it exhibits a range of biological activities, including antioxidant, anti-inflammatory, antiviral, anti-hepatoma, and hepatoprotective effects (Yoo et al., 2008; Park et al., 2012; Kong et al., 2017; Ge et al., 2018; Liu M. et al., 2020). Besides their biological activities, species of the *Lonicera* genus also hold significant ornamental value and are widely used in landscaping (Hayes, Peterson, 2020; Varlashchenko et al., 2021).

In Kazakhstan, the genus is represented by 22 species (Abdulina, 1999), two of which are listed in the Red Book of Kazakhstan (Baitulin, Sitpayeva, 2014). The species *Lonicera caerulea* subsp. *altaica* (Pall.) Gladkova, *L. caerulea* subsp. *pallasii* (Ledeb.) Browicz, *L. tatarica* L., and *L. micrantha* Trautv. ex Regel are widely distributed across Kazakhstan. According to the Plants of the World Online (<https://powo.science.kew.org/>) *L. caerulea* subsp. *altaica* is native to a vast range extending from Eastern Europe to Siberia and Mongolia, while *L. caerulea* subsp. *pallasii* is found in Northern and Eastern Europe, Siberia, and Central Asia. *L. tatarica* occurs naturally from Eastern Europe to Central Siberia and northeastern China; in contrast, *L. micrantha* is native to Kazakhstan. These species play a crucial role in the region's floral biodiversity and are of particular ecological and conservation significance. Additionally, they possess medicinal properties and have been traditionally used in folk medicine for various therapeutic applications (Golubev et al., 2022; Boyarskikh, Kostikova, 2023; Taldybay et al., 2024). In Kazakhstan, *Lonicera* species have been studied using botanical (Ametov et al., 2016; Vdovina et al., 2024), phytochemical (Kushnarenko et al., 2016), and biochemical (Vdovina, 2019) assessments.

The phylogenetic relationships within *Lonicera* remain incompletely resolved, presenting ongoing systematic challenges and requiring revisions to its classification (Wang G.Q. et al., 2024). Over time, various classification systems for *Lonicera* have been proposed (Maximowicz, 1877; Rehder, 1903; Nakai, 1938; Hara, 1983). According to A. Rehder (1903), *Lonicera* is divided into two subgenera, *Chamaecerasus* (L.) Rehder and *Periclymenum* (Mill.) Rehder; within the subgenus *Chamaecerasus*, it is further classified into four sections: *Isoxylosteum* Rehder, *Isika* DC., *Coeloxlylosteum* Rehder, and *Nintooa* DC. H. Hara (1983) proposed a classification, which was based on the study by C.J. Maximowicz (1877), dividing *Lonicera* into subgenera *Lonicera* and

Caprifolium (Mill.) Dippel, with further subdivision of subgenus *Lonicera* into four sections (*Isika* (Anderson) Rehder, *Caeruleae* (Rehder) Nakai, *Lonicera* and *Nintooa* (Sweet) Maxim) and five subsections (*Purpurascens*, *Monantheae*, *Isika*, *Bracteatae*, and *Rhodantheae*). Later, P.S. Hsu et al. (1988) classified *Lonicera* into subgenera *Chamaecerasus* and *Lonicera*; further, subgenus *Chamaecerasus* was divided into four sections (*Coeloxlylosteum*, *Isika*, *Isoxylosteum*, and *Nintooa*).

With advancements in molecular genetic technologies, numerous studies have focused on the phylogenetics of *Lonicera*. For instance, M. Nakaji et al. (2015) investigated the phylogenetic relationships among 23 Japanese *Lonicera* species using nucleotide sequences of five plastid non-coding regions (*rpoB-trnC*, *atpB-rbcL*, *trnS-trnG*, *petN-psbM*, and *psbM-trnD*). The findings support the fundamental validity of the classification by H. Hara (1983) of higher taxonomic groups for Japanese *Lonicera* species. M. Srivastav et al. (2023) conducted a phylogenetic analysis using restriction site-associated DNA sequencing (RADSeq). The RADSeq-based phylogenetic tree revealed that the *Coeloxlylosteum*, *Isoxylosteum*, and *Nintooa* sections within subgenus *Chamaecerasus* were monophyletic, whereas the *Isika* section was found to be paraphyletic. Using nuclear ribosomal DNA cistron and plastid genome data, X.L. Yang et al. (2024) confirmed the paraphyly of section *Isika* and the monophyly of sections *Coeloxlylosteum*, *Isoxylosteum*, and *Nintooa* within subgenus *Chamaecerasus*, aligning with the findings of M. Srivastav et al. (2023). All of the above-mentioned studies have contributed to the classification of the genus *Lonicera*. However, due to widespread hybridization and introgression, the precise taxonomy of *Lonicera* remains unresolved (Wang H.X. et al., 2020).

The plastid is a vital organelle for photosynthesis in plants and possesses its own genome (Howe et al., 2003). The plastome is uniparentally inherited and highly conserved in gene content and organization (Howe et al., 2003). It ranges in size from approximately 120 to 160 kb and exhibits a quadripartite structure consisting of two identical inverted repeats (IR) and two single-copy regions: a large single-copy (LSC) region and a small single-copy (SSC) region (Palmer et al., 1988; Ruhlman, Jansen, 2014).

Advancements in high-throughput sequencing technologies have greatly facilitated plastid genome research, making it more accessible and enabling comprehensive genomic analyses. To date, only a few studies have been conducted on the comparative analysis of *Lonicera* plastid genomes. For example, seven plastid genomes (*L. ferdinandi*, *L. hispida*, *L. nervosa*, *L. fragrantissima* var. *lancifolia*, *L. stephanocarpa*, *L. tragophylla*, and *L. japonica*) (Liu M.L. et al., 2018) and three plastid genomes (*L. japonica*, *L. similis*, and *L. acumi-*

nata) (Yang C. et al., 2023) have been comparatively analyzed. Recent studies have demonstrated that nucleotide sequences of the plastid genome can provide valuable insights for phylogenomic analysis (Luo et al., 2021; Zhao et al., 2023) taxonomic classification (Li Q., 2022; Oyuntsetseg et al., 2024), and species identification, utilizing plastome sequences as a super barcode (Chen X. et al., 2018; Zhang Z. et al., 2019). Moreover, plastid genome nucleotide sequences serve as a valuable resource for identifying species-specific genetic markers, such as DNA barcoding (Hong et al., 2022; Tang et al., 2022; Almerikova et al., 2024), microsatellite (Zhu M. et al., 2021; Yermagambetova et al., 2023), and single nucleotide polymorphism (SNP) markers (Dong et al., 2021). Therefore, we believe that sequencing and comparative analysis of *Lonicera* plastomes can contribute insights into the taxonomic classification and phylogenetic relationships of the genus.

In this study, we sequenced the plastid genomes of *Lonicera* species (*L. caerulea* subsp. *altaica*, *L. caerulea* subsp. *pallasii*, *L. tatarica*, and *L. micrantha*) using Illumina Next Generation Sequencing technology. Among them, *L. caerulea* subsp. *altaica*, *L. caerulea* subsp. *pallasii*, and *L. micrantha* have been sequenced for the first time to date. We conducted a plastome-based analysis to characterize the plastomes of the selected *Lonicera* species. Our analysis included comparative plastome assessments with previously sequenced *Lonicera* species from GenBank, identification of potential molecular markers valuable for DNA barcoding and population genetics, and evaluation of the taxonomic positions of the studied *Lonicera* species.

Materials and methods

Plant leaf material collection and DNA extraction. Fresh leaf samples were collected from the eastern and central parts of Kazakhstan. Detailed information on the collection sites is provided in Table 1. The leaves were dried in silica gel and subsequently used for DNA extraction. Genomic DNA was extracted from the dried *Lonicera* leaves using the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method (Doyle J.J., Doyle J.L., 1987). The quality and concentration of the extracted DNA were assessed using a NanoDrop™ One spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Plastid genome sequencing, assembly, and annotation. DNA samples that passed Quality Control (QC) analysis were used for subsequent library preparation. The libraries were constructed using the TruSeq Nano DNA Kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Plastid genome sequencing was performed on the Illumina NovaSeq 6000 (Illumina Inc.) platform at MacroGen Inc. (Seoul, Republic of Korea). The quality of raw sequencing data was assessed using FastQC 0.11.7 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>, accessed on 02 December 2024). The adapter sequences were removed from the raw reads using Trimmomatic 0.38 (Bolger et al., 2014). *De novo* assembly was conducted using NOVOplasty (Dierckxsens et al., 2017), and plastome annotation was performed using the Plastid Genome Annotator (PGA) (Qu et al., 2019). Gene maps of the annotated plastid genomes of *L. caerulea* subsp. *altaica*, *L. caerulea* subsp. *pallasii*, *L. tatarica*, and *L. micrantha* were drawn using the OrganellarGenomeDRAW tool 1.3.1 (OGDRAW) (Lohse et al., 2007). The newly sequenced plastomes of these species

Table 1. Information on the collection sites of studied *Lonicera* species in Kazakhstan

Species	Collection sites
<i>L. caerulea</i> subsp. <i>altaica</i>	Kazakhstan, East Kazakhstan region, Western Altai, foothills of the Ivanovsky ridge
<i>L. caerulea</i> subsp. <i>pallasii</i>	Kazakhstan, Karaganda region, Karkaraly district, Karkaraly Mountains
<i>L. tatarica</i>	Kazakhstan, Karaganda region, Bukhar-Zhyrau district
<i>L. micrantha</i>	Kazakhstan, Karaganda region, Karkaraly district, Karkaraly Mountains

have been deposited in GenBank under the accession numbers PV026015-PV026018.

Comparative plastome analysis. Comparative plastome analysis of the studied *Lonicera* species was conducted using mVISTA (Frazer et al., 2004) in Shuffle-LAGAN mode, with the plastid genomes of *L. caerulea* (OQ784224) and *L. tatarica* (OQ784187) serving as references. Additionally, the junction sites of the four *Lonicera* plastomes were examined using the IRscope online tool (Amiryousefi et al., 2018), utilizing the same reference genomes, *L. caerulea* (OQ784224) and *L. tatarica* (OQ784187).

Nucleotide variability analysis. The complete plastid genome sequences of the *Lonicera* species were aligned using Geneious Prime® 2025.0.3 (<https://www.geneious.com>, accessed on 10 February 2025). The aligned sequences were then analyzed for nucleotide variability (*Pi*) using a sliding window approach in DnaSP v6 (Rozas et al., 2003). The sliding window analysis was performed with a window length of 600 bp and a step size of 200 bp.

Simple sequence repeats analysis and comparative genome analysis. Simple sequence repeats (SSRs) in the nucleotide sequences of the four studied *Lonicera* plastomes were identified using MISA software (Beier et al., 2017). The detection thresholds were set as follows: eight repeats for mononucleotide SSRs, four repeats for di- and trinucleotide SSRs, and three repeats for tetra-, penta-, and hexanucleotide SSRs.

Phylogenetic analysis. Phylogenetic analysis was conducted using alignments of complete plastid genome sequences, protein-coding gene sequences, and variable region gene sequences from *L. caerulea* subsp. *altaica*, *L. caerulea* subsp. *pallasii*, *L. tatarica*, and *L. micrantha*, along with GenBank samples, including outgroup species (*Heptacodium miconioides* and *Triosteum himalayanicum*). A total of 24 complete plastid genomes were selected to construct phylogenetic trees in order to determine the phylogenetic placement of the studied species within the genus *Lonicera*. The sequence alignment of the complete plastid genomes was conducted using Geneious Prime® 2025.0.3 (<https://www.geneious.com>, accessed on 12 February 2025). Phylogenetic relationships were inferred using the maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) methods. Maximum likelihood trees were generated using IQ-TREE 2.2.2.6 (Nguyen et al., 2015). The software was also used to determine the optimal tree-building model,

identified as GTR+F+I+R2 for complete plastid genome and variable region genes data, and as TVM+F+I+R3 for protein-coding genes data, which were then applied to reconstruct the ML phylogenetic tree. BI phylogenetic trees were reconstructed using MrBayes 3.2.7 (Ronquist et al., 2012). The resulting phylogenetic trees were visualized using FigTree (Rambaut, 2009). The network analysis was performed in SplitsTree4 (Huson, Bryant, 2006) with the Neighbor-Net algorithm.

Results

General features of the four *Lonicera* plastomes

Illumina sequencing generated paired-end reads with an average length of 150 bp for the four *Lonicera* plastomes. The lengths of the plastid genomes of *L. caerulea* subsp. *altaica*, *L. caerulea* subsp. *pallasii*, *L. tatarica*, and *L. micrantha* were 163,889; 164,000; 154,587, and 153,985 bp, respectively (Fig. 1).

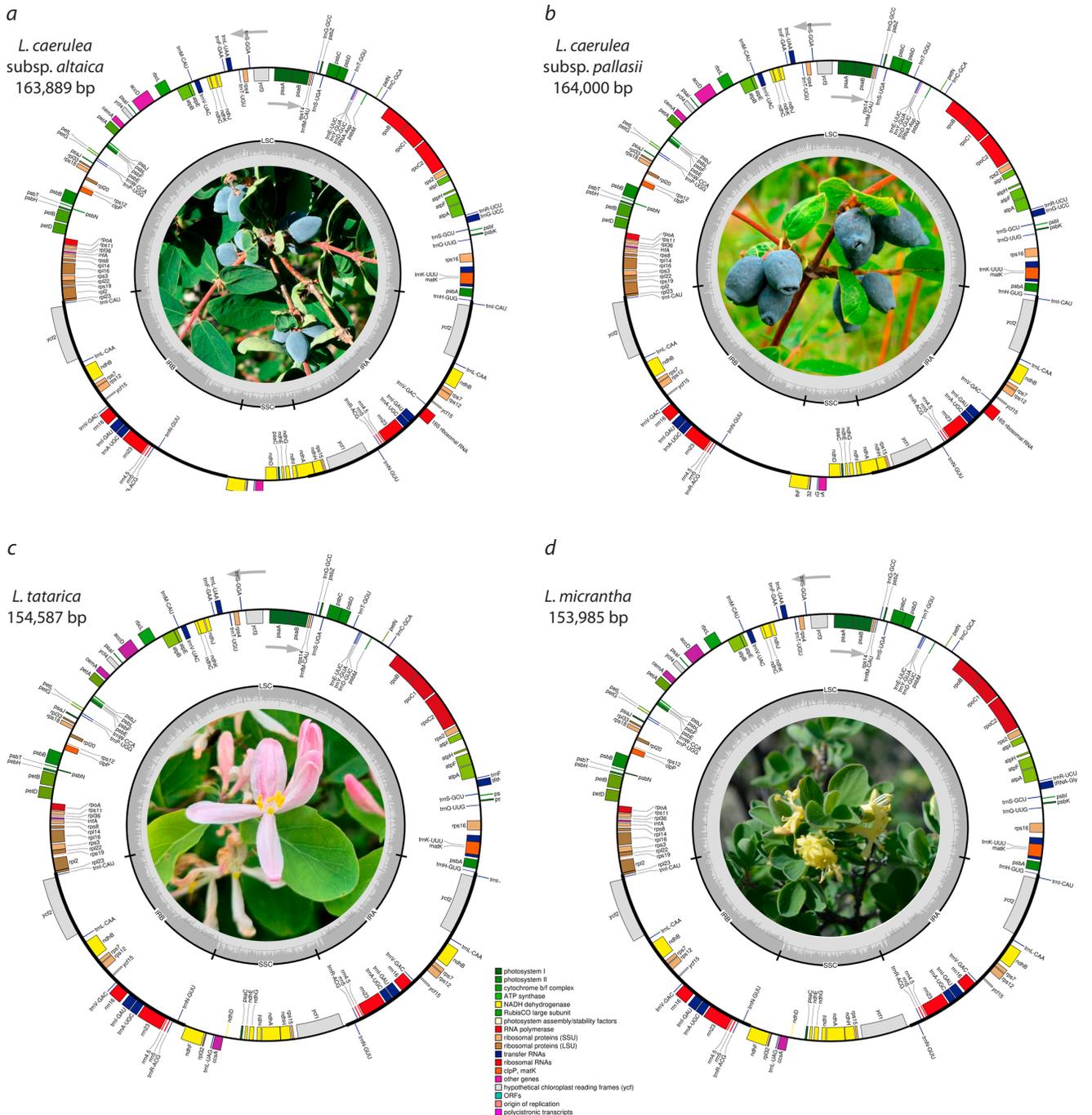


Fig. 1. Plastid genome maps of *L. caerulea* subsp. *altaica* (a), *L. caerulea* subsp. *pallasii* (b), *L. tatarica* (c) and *L. micrantha* (d) species.

Genes positioned outside the outer circle are transcribed in a counterclockwise direction, while those inside the circle are transcribed in a clockwise direction. The inner circle represents GC and AT content, with darker gray indicating GC content and lighter gray representing AT content. Genes are color-coded according to their functional categories. The plastid genome map displays a large single-copy (LSC) region, small single-copy (SSC) region, and inverted repeat regions (IRA and IRB).

Table 2. General characteristics of the plastid genomes of the studied *Lonicera* species

Genome features	<i>L. caerulea</i> subsp. <i>altaica</i>	<i>L. caerulea</i> subsp. <i>pallasii</i>	<i>L. tatarica</i>	<i>L. micrantha</i>
GenBank numbers	PV026015	PV026016	PV026017	PV026018
Genome size (bp)	163,889	164,000	154,587	153,985
LSC	88,119	88,813	88,185	88,040
SSC	10,172	10,169	18,750	18,589
IRA	32,799	32,509	23,826	23,678
IRB	32,799	32,509	23,826	23,678
Number of total genes (unique)	130 (115)	130 (115)	130 (115)	130 (115)
Protein genes	85 (80)	85 (80)	85 (80)	85 (80)
tRNA genes	37 (30)	37 (30)	37 (30)	37 (30)
rRNA genes	8 (4)	8 (4)	8 (4)	8 (4)
GC content (%)	38.05	38.12	38.42	38.40
in LSC	36.95	36.92	36.88	36.83
in SSC	32.90	32.84	32.94	33.06
in IRA	40.34	40.59	43.44	43.43
in IRB	40.34	40.59	43.44	43.43

The plastid genome structure consisted of a large single-copy (LSC) region, ranging from 88,040 bp in *L. micrantha* to 88,813 bp in *L. caerulea* subsp. *pallasii*, a small single-copy (SSC) region varying from 10,172 bp in *L. caerulea* subsp. *altaica* to 18,750 bp in *L. tatarica*, and an inverted repeat (IR) region, spanning from 47,356 bp in *L. micrantha* to 65,598 bp in *L. caerulea* subsp. *altaica*. The two inverted repeat regions were designated as IRA and IRB. The total GC content of the four *Lonicera* plastid genomes was relatively consistent, ranging from 38.05% in *L. caerulea* subsp. *altaica* to 38.42% in *L. tatarica* plastome. The IR regions exhibited higher GC content (40.34–43.44%) compared to the single-copy regions, with the LSC region ranging from 36.83 to 36.95% and the SSC region from 32.84 to 33.06% (Table 2).

The four assembled plastid genomes of *Lonicera* exhibited identical gene content, intron numbers, and gene order. The plastid genomes of the studied *Lonicera* species comprised 130 genes, including 85 protein-coding genes, 37 tRNA genes, and eight rRNA genes. Among them, five protein-coding genes (*rps7*, *rps12*, *ndhB*, *ycf2*, and *ycf15*), seven tRNA genes (*trnA-UGC*, *trnI-CAU*, *trnI-GAU*, *trnL-CAA*, *trnN-GUU*, *trnR-ACG*, and *trnV-GAC*), and four rRNA genes (*rrn4.5*, *rrn5*, *rrn16*, and *rrn23*) were duplicated within the IR regions of the four *Lonicera* plastid genomes. A total of 17 genes contained introns, of which 16 genes (*rps12*, *rps16*, *rpl2*, *rpl16*, *rpoC1*, *atpF*, *ndhA*, *ndhB*, *petB*, *petD*, *trnA-UGC*, *trnG-UCC*, *trnI-GAU*, *trnK-UUU*, *trnL-UAA*, and *trnV-UAC*) had a single intron, while *ycf3* was the only gene containing two introns. The *rps12* gene exhibited trans-splicing, with its 5' end located in the LSC region, while its 3' end was positioned in the IR regions (Fig. 1, Table 3).

Comparative analysis of the four *Lonicera* plastomes

A comparative analysis of the complete plastid genomes of six *Lonicera* species was conducted using mVISTA, with *L. caerulea* (OQ784224) and *L. tatarica* (OQ784187) as reference genomes. The alignment revealed high sequence conservation

across the plastomes, with most variations occurring in non-coding regions. Among the coding regions, *accD* exhibited the highest level of divergence. The IR regions were the most conserved, while the LSC and SSC regions displayed higher levels of sequence divergence (Fig. 2).

Inverted repeat expansion and contraction

A comparative analysis of the LSC/IRB/SSC/IRA boundary regions was conducted in the plastomes of *Lonicera* species (*L. caerulea* subsp. *altaica*, *L. caerulea* subsp. *pallasii*, *L. tatarica*, and *L. micrantha*), using *L. caerulea* (OQ784224) and *L. tatarica* (OQ784187) from GenBank as reference sequences. There were structural differences in LSC/IRB/SSC/IRA boundaries of *Lonicera* plastomes. The length of the IR regions ranged from 23,678 to 32,799 bp in four studied *Lonicera* plastomes with some expansion. A notable difference was found in *L. caerulea* subsp. *altaica* and *L. caerulea* subsp. *pallasii* plastomes, where the gene *ndhA*, which crossed over the IRA/SSC boundaries, was similar to those in GenBank (*L. caerulea*). The *ycf1* gene's distance from the IRA region was 246 and 268 bp in *L. tatarica*, and *L. micrantha*, respectively. At the IRB/SSC border, the *ndhF* gene was fully present within the SSC region in all *Lonicera* plastomes, extending into the IRB region with lengths ranging from 41 to 84 bp (Fig. 3).

Nucleotide diversity analysis

To assess nucleotide diversity values, the four *Lonicera* complete plastid genomes in this study were aligned. The aligned nucleotide sequences were then analyzed to calculate the nucleotide diversity of the plastid genome using DnaSP. The results revealed that the *Pi* values in the four *Lonicera* plastomes ranged from 0 to 0.15222. Three highly variable regions were identified: two intergenic regions (*ycf1-trnN-GUU* and *trnN-GUU-ndhF*) and one genic region (*accD*). Among these, the *accD* gene region exhibited the highest *Pi* value (0.15222), followed by the *ycf1-trnN-GUU* region

Table 3. Gene composition and functional categorization of the *L. caerulea* subsp. *altaica*, *L. caerulea* subsp. *pallasii*, *L. tatarica*, and *L. micrantha* plastid genomes

Category	Group of genes	Names of genes
Self-replication	Ribosomal RNA	<i>rnn4.5</i> (2), <i>rnn5</i> (2), <i>rnn16</i> (2), <i>rnn23</i> (2)
	Transfer RNA	<i>trnA-UGC</i> * (2), <i>trnC-GCA</i> , <i>trnD-GUC</i> , <i>trnE-UUC</i> , <i>trnF-GAA</i> , <i>trnFM-CAU</i> , <i>trnG-GCC</i> , <i>trnG-UCC</i> *, <i>trnH-GUG</i> , <i>trnI-CAU</i> (2), <i>trnI-GAU</i> * (2), <i>trnK-UUU</i> *, <i>trnL-CAA</i> (2), <i>trnL-UAA</i> *, <i>trnL-UAG</i> , <i>trnM-CAU</i> , <i>trnN-GUU</i> (2), <i>trnP-UGG</i> , <i>trnQ-UUG</i> , <i>trnR-ACG</i> (2), <i>trnR-UCU</i> , <i>trnS-GCU</i> , <i>trnS-GGA</i> , <i>trnS-UGA</i> , <i>trnT-GGU</i> , <i>trnT-UGU</i> , <i>trnV-GAC</i> (2), <i>trnV-UAC</i> *, <i>trnW-CCA</i> , <i>trnY-GUA</i>
	Small subunit of ribosome	<i>rps2</i> , <i>rps3</i> , <i>rps4</i> , <i>rps7</i> (2), <i>rps8</i> , <i>rps11</i> , <i>rps12</i> * (2), <i>rps14</i> , <i>rps15</i> , <i>rps16</i> *, <i>rps18</i> , <i>rps19</i>
	Large subunit of ribosome	<i>rpl2</i> *, <i>rpl14</i> , <i>rpl16</i> *, <i>rpl20</i> , <i>rpl22</i> , <i>rpl23</i> , <i>rpl32</i> , <i>rpl33</i> , <i>rpl36</i>
	RNA polymerase	<i>rpoA</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC1</i> *, <i>rpoC2</i>
	Translation initiation factor	<i>infA</i>
Photosynthesis	ATP synthase	<i>atpA</i> , <i>atpB</i> , <i>atpE</i> , <i>atpF</i> *, <i>atpH</i> , <i>atpI</i>
	NADH dehydrogenase	<i>ndhA</i> *, <i>ndhB</i> * (2), <i>ndhC</i> , <i>ndhD</i> , <i>ndhE</i> , <i>ndhF</i> , <i>ndhG</i> , <i>ndhH</i> , <i>ndhI</i> , <i>ndhJ</i> , <i>ndhK</i>
	Subunits of cytochrome	<i>petA</i> , <i>petB</i> *, <i>petD</i> *, <i>petG</i> , <i>petL</i> , <i>petN</i>
	Photosystem I	<i>psaA</i> , <i>psaB</i> , <i>psaC</i> , <i>psal</i> , <i>psaJ</i>
	Photosystem II	<i>psbA</i> , <i>psbB</i> , <i>psbC</i> , <i>psbD</i> , <i>psbE</i> , <i>psbF</i> , <i>psbH</i> , <i>psbI</i> , <i>psbJ</i> , <i>psbK</i> , <i>psbL</i> , <i>psbM</i> , <i>psbN</i> , <i>psbT</i> , <i>psbZ</i>
	Rubisco	<i>rbcl</i>
Other genes	Maturase	<i>matK</i>
	Protease	<i>clpP</i>
	Envelope membrane protein	<i>cemA</i>
	Subunit of acetyl-CoA-carboxylase	<i>accD</i>
	C-type cytochrome synthesis gene	<i>ccsA</i>
Genes of unknown function	Conserved hypothetical chloroplast ORF	<i>ycf1</i> , <i>ycf2</i> (2), <i>ycf3</i> ***, <i>ycf4</i> , <i>ycf15</i> (2)

* Genes containing a single intron, genes containing two introns; (2) – duplicated genes.

(0.10250) and *trnN-GUU-ndhF* (0.09722). Notably, the *accD* region with the highest nucleotide diversity was concentrated in the LSC region of the plastid genome (Fig. 4).

Repeat sequence analysis

This study identified 163, 163, 158, and 157 SSRs in the plastid genomes of *Lonicera caerulea* subsp. *altaica*, *L. caerulea* subsp. *pallasii*, *L. tatarica*, and *L. micrantha*, respectively, resulting in a total of 641 SSRs. Five types of SSRs were identified, including mono-, di-, tri-, tetra-, and hexa-nucleotide repeats. Most of the identified SSR markers were located within the intergenic regions of the plastid genome's LSC region. Detailed information is provided in Supplementary Table S1¹. Mononucleotide repeats were the most abundant SSR motifs, comprising approximately 72.70 % of the total SSRs, followed by dinucleotide repeats (18.72 %) and tetranucleotide repeats (5.93 %). The most abundant SSR motifs were mononucleotide repeats, which accounted for approximately 72.70 % of the total SSRs, followed by dinucleotide (18.72 %) and tetranucleotide (5.93 %) repeats. Most of the mononucleotide repeats consisted of A/T (451) rather than C/G (15), while the majority of dinucleotide repeats were composed of AT/AT (75) rather than AG/CT (45). Trinucleo-

tide (1.25 %) and hexanucleotide (1.40 %) repeats were rare across the studied plastid genomes but were present in all four plastomes. Pentanucleotide repeats were not found in any of the studied plastomes (Table 4).

Phylogenetic analysis

The ML method was used to reconstruct the phylogenetic trees based on nucleotide sequences of complete plastid genomes (Fig. 5a), protein-coding genes (Fig. 5b), and variable region genes (Fig. 5c). *H. miconioides* and *T. himalayana* were used as outgroups, while 22 *Lonicera* samples were included as ingroups. The ML trees showed that the analyzed *Lonicera* species were grouped into two clades: the *Periclymenum* subgenus clade and the *Chamaecerasus* subgenus clade. There were five subclades in the ML phylogenetic trees (Fig. 5a–c), which represented the sections *Eucarpifolia* and *Phenianthi* (Subclade I) within subgenus *Periclymenum*, section *Isika* (Subclades II and III), sections *Isika* and *Coeloxystoium* (Subclades IV), and section *Nintooa* (Subclade V) within subgenus *Chamaecerasus*. The phylogenetic tree reveals that *L. tatarica* forms a subclade (IV) consisting of species from the *Coeloxystoium* section, clustering with the *L. tatarica* (MK970584) sequence from GenBank and indicating a close relationship with *L. maackii* (MN256451) from GenBank. Furthermore, *L. caerulea* subsp. *altaica* and *L. caerulea*

¹ Supplementary Table S1 and Figs S1–S3 are available at: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx29.xlsx>

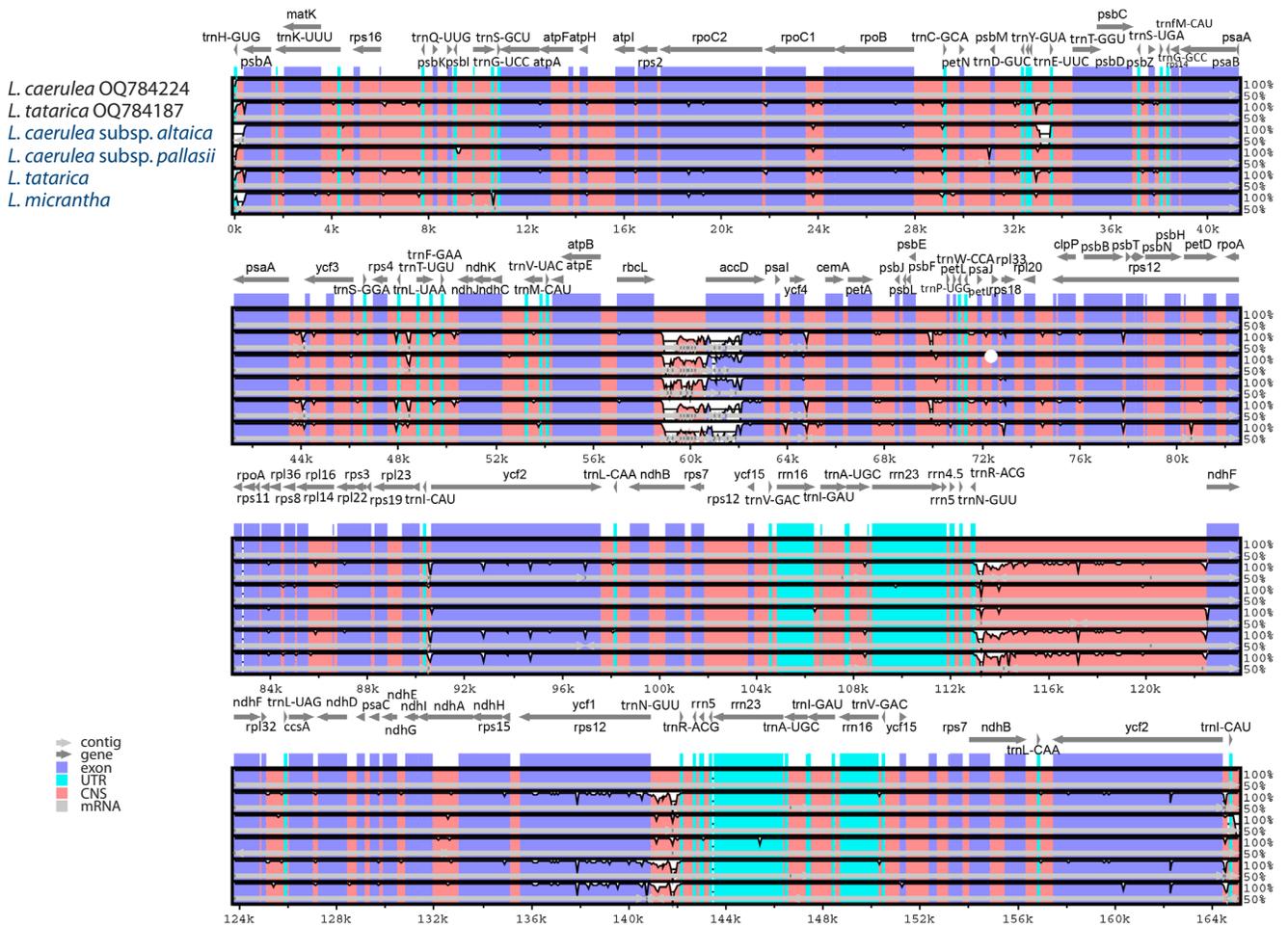


Fig. 2. Comparison of complete plastid genomes of six *Lonicera* samples using mVISTA, with *L. caerulea* (OQ784224) and *L. tatarica* (OQ784187) as reference genomes.

Gray arrows above the alignment indicate gene locations, while different colors distinguish coding and non-coding regions. The horizontal axis represents plastome coordinates, and the vertical scale depicts sequence identity percentages, ranging from 50 to 100 %.

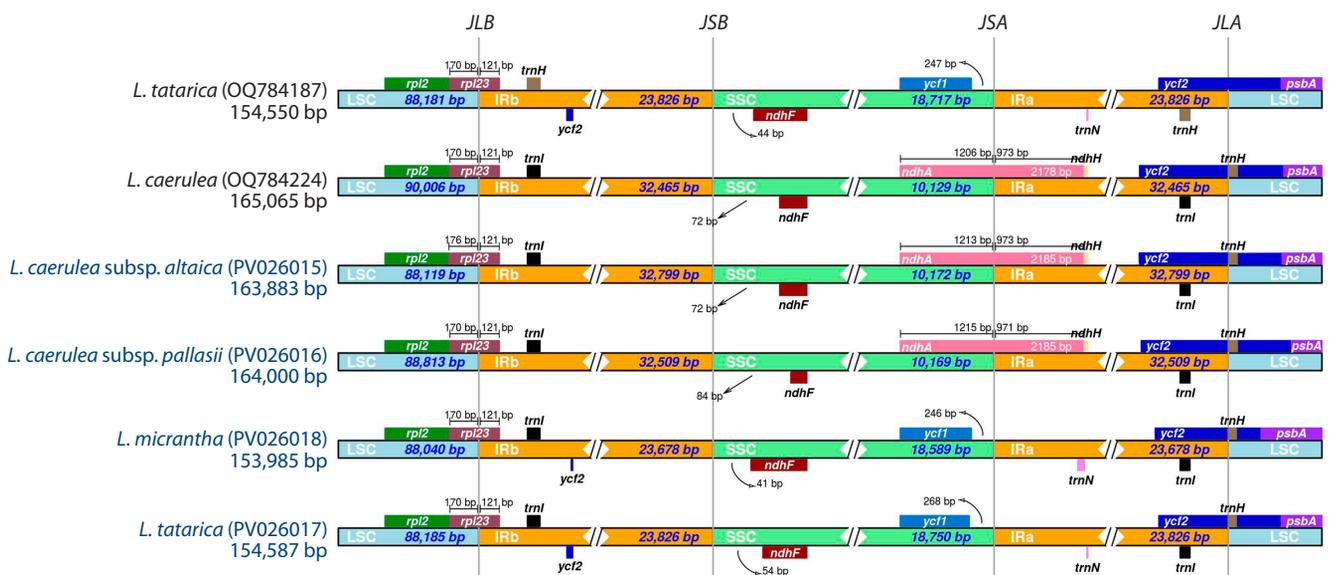


Fig. 3. Comparison of the junctions between the LSC, IR, and SSC regions in *Lonicera* plastomes. Species highlighted in blue were analyzed in this study. JLB represents the junction between the LSC and IRB regions, JSB marks the boundary between the IRB and SSC regions; JSA indicates the junction between the SSC and IRA regions, and JLA denotes the boundary between the IRA and LSC regions.

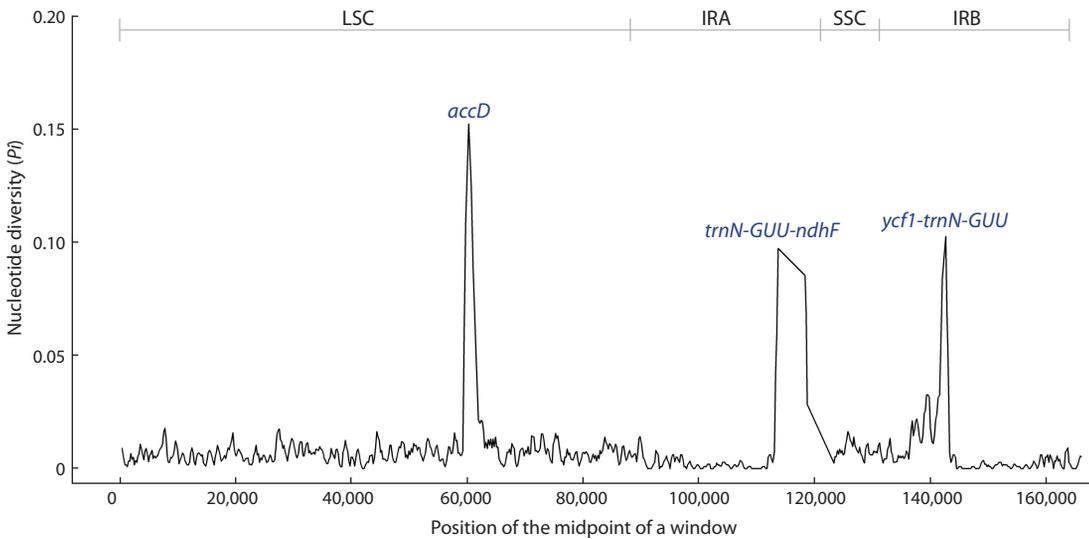


Fig. 4. Nucleotide diversity of the four *Lonicera* plastid genomes using sliding window analysis (window length – 600 bp, step size – 200 bp).

The X-axis represents the midpoint position of each window, while the Y-axis denotes the nucleotide diversity (Pi) value for each window.

Table 4. The number and types of identified simple sequence repeats in the four *Lonicera* plastid genomes

Type	Repeat unit	<i>L. caerulea</i> subsp. <i>altaica</i>	<i>L. caerulea</i> subsp. <i>pallasii</i>	<i>L. tatarica</i>	<i>L. micrantha</i>	Total	%
Mono-	A/T	118	116	109	108	451	72.70
	C/G	4	4	5	2	15	
Di-	AG/CT	10	10	14	11	45	18.72
	AT/AT	19	20	17	19	75	
Tri-	AAC/GTT	1	1	0	1	3	1.25
	AAG/CTT	1	1	1	1	4	
	AAT/ATT	0	0	1	0	1	
Tetra-	AAAG/CTTT	2	2	1	2	7	5.93
	AAAT/ATTT	2	3	3	5	13	
	AATC/ATTG	1	1	1	1	4	
	AATT/AATT	1	1	1	1	4	
	AGAT/ATCT	2	2	3	3	10	
Hexa-	AAAATG/ATTTTC	2	2	0	2	6	1.40
	AATGAT/ATCATT	0	0	0	1	1	
	AAACAT/ATGTTT	0	0	1	0	1	
	AAGGGT/ACCCTT	0	0	1	0	1	
Total		163	163	158	157	641	100

subsp. *pallasii* samples analyzed in this study clustered in one subclade (III) with the *L. caerulea* (OQ784224) and *L. caerulea* subsp. *edulis* (OP345475) sequences from GenBank. Also, *L. micrantha* is positioned within the *Chamaecerasus* subgenus in subclade II and clusters closely with species from the *Isika* section, particularly *L. tangutica* (MZ962399) and *L. microphylla* (OP936076) from GenBank. Most of the described subclades exhibit strong bootstrap support (100 %) at the corresponding nodes, except for subclade II in the ML phylogenetic tree based on complete plastid genome data (Fig. 5a), which has moderate support (53 %), indicating high confidence in their overall phylogenetic relationships.

The BI phylogenetic trees were constructed using the same set of samples based on nucleotide sequences from complete plastid genomes (Fig. S1), protein-coding genes (Fig. S2), and variable region genes (Fig. S3). The resulting trees consistently divided the analyzed *Lonicera* species into two distinct clades corresponding to the subgenera *Periclymenum* and *Chamaecerasus*. The topologies of the BI phylogenetic trees were largely congruent with those obtained using ML methods.

To further investigate the relationships and potential reticulation within *Lonicera* species, we constructed a SplitsTree phylogenetic network (Fig. 5d) based on complete plastid genome sequences from 22 *Lonicera* and two outgroup samples.

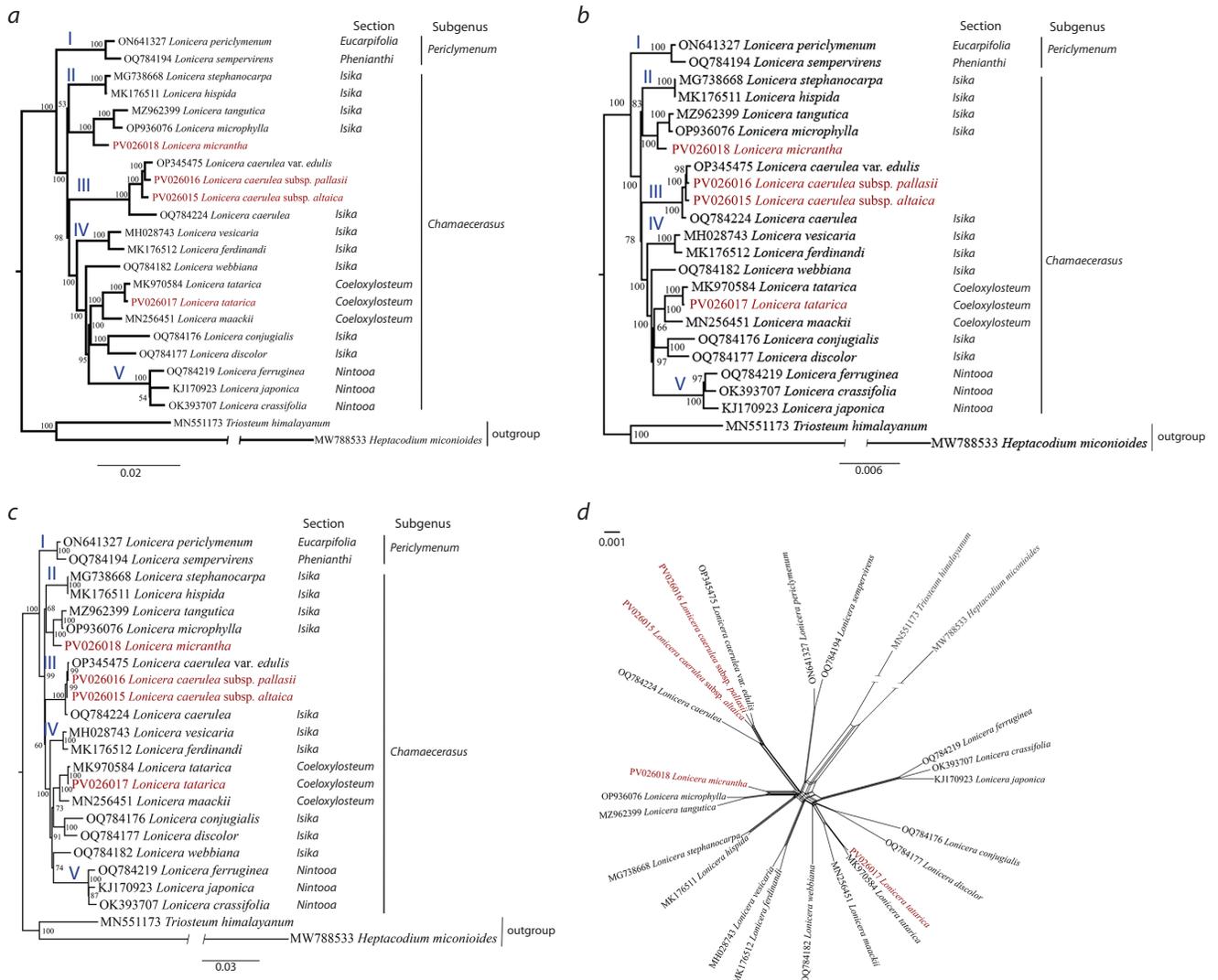


Fig. 5. Maximum likelihood phylogenetic tree of the genus *Lonicera* inferred from nucleotide sequences of the complete plastid genome (a), protein-coding genes (b), and variable region genes (c). Numbers at the nodes of the phylogenetic trees represent bootstrap support values.

Roman numerals (I–V) at the nodes of the phylogenetic trees denote subsclade numbers. Splittree neighbour-net network of 22 *Lonicera* and 2 outgroup plastid genomes (d). Species highlighted in red were sequenced in this study.

In this analysis, relationships were generally congruent with those in ML and BI phylogenetic trees. The results of the phylogenetic network coincided with the ML dendrogram (Fig. 5a–c). The network indicates that *L. micrantha* has evolved significantly earlier than *L. microphylla* and *L. tangutica*. Also, three subspecies of *L. caerulea* (*altaica*, *pallasii*, and *edulis*) seem to be hybrid forms of the species (Fig. 5d).

Discussion

In the present study, the complete plastid genomes of the *L. caerulea* subsp. *altaica*, *L. caerulea* subsp. *pallasii*, *L. tatarica*, and *L. micrantha* were sequenced using next-generation sequencing technology. These genomes were then compared with those of other *Lonicera* species to enhance our understanding of the molecular taxonomy of the genus.

The plastid genomes of the studied *Lonicera* exhibited the typical circular structure found in angiosperms (Palmer et al., 1988; Ruhlman, Jansen, 2014), consisting of an LSC region, an SSC region, and two IR regions (Fig. 1). Our an-

notation identified a total of 130 genes, including 115 unique genes, consisting of 85 (80 unique) protein-coding genes, 37 (30 unique) tRNA genes, and eight (4 unique) rRNA genes (Table 3). Previous studies have reported slightly different numbers of annotated protein-coding genes, with 82 and 83 genes identified in earlier analyses (He et al., 2017; Liu M.L. et al., 2018; Yang C. et al., 2023). The discrepancies in gene annotation primarily arise from differences in the *ycf15* gene, which are lost in *L. japonica*, *L. ferdinandi*, *L. hispida*, *L. nervosa*, *L. fragrantissima* var. *lancifolia*, *L. stephanocarpa*, *L. tragophylla*, *L. acuminata*, and *L. similis* plastomes. Additionally, we identified the *trnM-CAU* gene, which was not annotated in previous *Lonicera* plastome studies (Frazer et al., 2004). These variations underscore the importance of annotation accuracy, indicating that further comparative analyses are necessary to refine gene identification within the genus.

The genome sizes varied among species, ranging from 153,985 bp in *L. micrantha* to 164,000 bp in *L. caerulea* subsp. *pallasii*. Notably, the plastid genome sizes of *L. cae-*

rulea subsp. *altaica* (163,889 bp) and *L. caerulea* subsp. *pallasii* (164,000 bp) were larger than those of the other two (*L. tatarica*, and *L. micrantha*) studied species (Table 2). The variations in the total length of plastid genomes are typically associated with the expansion and contraction of IR regions (Zhang X.F. et al., 2021). In this study, the IR regions of *L. caerulea* subsp. *altaica* (32,799 bp) and *L. caerulea* subsp. *pallasii* (32,509 bp) were found to be longer than the SSC and LSC regions, contributing to their relatively larger plastome sizes (Fig. 3). These results align with the previously reported plastid genome size of *L. caerulea* (165,065 bp) (Yang X.L. et al., 2024), suggesting that the specific plastid genome lengths observed in the studied *L. caerulea* subspecies may be a common evolutionary characteristic with the *L. caerulea* species.

Molecular markers are essential tools in modern biological research, playing a crucial role in unraveling genetic diversity, phylogenetic relationships, and population dynamics (Wang X.R., Szmidt, 2001; Al-Hadeithi, Jasim, 2021). Among them, DNA barcoding markers offer an efficient approach to species identification by targeting short, conserved regions of the genome (Chac, Thinh, 2023). These markers have made one of the most significant contributions to advancing our understanding of evolutionary processes, establishing DNA barcoding as a core methodology in plant taxonomy (Purty, Chatterjee, 2016; Zhu S. et al., 2022). The highly variable regions in nucleotide sequences of the plastid genome can be used as potential specific DNA barcoding markers for specific plant genera. Using mVISTA (Fig. 2) and sliding window analysis (Fig. 4), we identified three highly variable regions in this study: two intergenic regions (*ycf1-trnN-GUU* and *trnN-GUU-ndhF*) and one genic region (*accD*). These regions show promise as DNA barcoding markers for the phylogenetic analysis of *Lonicera* species. Notably, the *trnN-GUU-ndhF* region has been reported as particularly useful for developing molecular markers in *Lonicera* species (Liu M.L. et al., 2018; Yang C. et al., 2023).

Our study found that the *accD* gene region is the most variable, a finding consistent with previous studies in Asteraceae (Kim et al., 2020) and Fabaceae (Zhang T. et al., 2024). Two intergenic regions (*ycf1-trnN-GUU* and *trnN-GUU-ndhF*) identified in this study were also reported in other plant species. For example, *ycf1-trnN-GUU* was a highly variable region in the plastid genomes of *Parasenecio* (Liu X. et al., 2023) and *Medicago* (Jiao et al., 2023) species. Z. Cao et al. (2023) and W. Xing et al. (2024) reported that the *trnN-GUU-ndhF* intergenic region is hypervariable in the plastid genomes of *Neocinnamomum* taxa and *Pinellia ternata*, respectively. This study identified two highly variable intergenic regions and one genic region as promising candidates for DNA barcoding markers in future research. Nonetheless, further studies are needed to assess the effectiveness of these divergent markers in the phylogenetic analysis of *Lonicera* species.

Another important class of molecular markers is the simple sequence repeat (SSR) markers, which are widely recognized for their value in plant population genetics in assessing genetic diversity, population structure, and evolutionary relationships (Chen F. et al., 2015; Yermagambetova et al., 2024). In our study, we identified a total of 641 SSR markers across the plastid genomes analyzed, with individual counts ranging from 158 in *L. tatarica* to 163 in both *L. caerulea* subsp. *altaica*

and *L. caerulea* subsp. *pallasii* plastid genomes (Table 4). Notably, the majority of these SSRs were located in the intergenic regions of the LSC region, a distribution pattern that aligns well with previous findings on angiosperm plastomes (Xia C. et al., 2022; Nyamgerel et al., 2024).

Our results reveal that mononucleotide repeats are the most prevalent SSR motifs across the four *Lonicera* plastomes analyzed, which are common for Caprifoliaceae representatives (Liu H. et al., 2022; Wang L. et al., 2024). Notably, the majority of the mononucleotide repeats were composed of A/T (451) rather than C/G (15), while dinucleotide repeats were predominantly composed of AT/AT (75) as opposed to AG/CT (45). This distribution is consistent with patterns observed in plastid genomes of many other plant species (Li X.Q. et al., 2019; Souza et al., 2019). Numerous studies have demonstrated that SSR markers derived from plastid genome sequences are effective for assessing genetic diversity in plant populations (Jo et al., 2022; Lācis et al., 2022; Guo et al., 2025). The SSR markers identified in our study hold potential for population genetic analyses within the genus *Lonicera*. However, further validation is required to confirm their efficacy and reliability in elucidating the genetic structure of *Lonicera* species populations.

Plastid genome nucleotide sequences have become a powerful tool in phylogenetic studies of different plant genera (Wu et al., 2021; Xia Q. et al., 2023). Their conserved structure, uniparental inheritance, and relatively slow mutation rate make them ideal for resolving evolutionary relationships across diverse plant lineages (Chen J. et al., 2022; Feng et al., 2024). With the development of next-generation sequencing technologies, the rapid and cost-effective sequencing of entire plastid genomes has become increasingly accessible, enhancing their utility in plant taxonomy by providing greater phylogenetic resolution and a deeper understanding of plant evolutionary history. This study utilized complete plastome sequences, protein-coding gene sequences, and variable region gene sequences for the phylogenetic analysis of the studied *Lonicera* species (*L. caerulea* subsp. *altaica*, *L. caerulea* subsp. *pallasii*, *L. tatarica*, and *L. micrantha*), along with publicly available sequences from GenBank, to contribute to a better understanding of phylogenetic relationships within the genus. The ML trees based on the sequences of the complete plastid genome (Fig. 5a), protein-coding genes (Fig. 5b), and variable region genes (Fig. 5c) of the 22 *Lonicera* samples and two outgroup samples (*H. miconioides* and *T. himalayanicum*) was reconstructed.

The phylogenetic analyses in this study revealed that the *Lonicera* species were grouped into two major clades, corresponding to the subgenera *Periclymenum* and *Chamaecerasus*, which is consistent with previous phylogenetic studies (Srivastav et al., 2023; Yang X.L. et al., 2024). Furthermore, the larger clade representing subgenus *Chamaecerasus* was further divided into four distinct subclades corresponding to sections *Isika* (Subclades II and III), sections *Isika* and *Coeloxylosteum* (Subclades IV), and section *Nintooa* (Subclade V). Within subgenus *Chamaecerasus*, species are sub-clustering into four subclades and align with recognized sectional classifications (Srivastav et al., 2023).

The placement of *L. micrantha*, *L. caerulea* subsp. *altaica* and *L. caerulea* subsp. *pallasii*, which had not been previously

assigned to a section, suggests their belonging to the *Isika* section based on their close clustering with other members of this section. Additionally, the finding supports the assumption that *L. caerulea* subsp. *altaica* and *L. caerulea* subsp. *pallasii* share a common evolutionary history with *L. caerulea*, which is also supported by the plastid genome structure of these species. Furthermore, *L. tatarica* forms a subclade (IV) with *L. tatarica* (MK970584) and *L. maackii* (MN256451) from GenBank, grouping within the *Coeloxylosteum* section. Notably, these samples are positioned between the species of section *Isika*, suggesting a possible evolutionary relationship between these two sections.

The phylogenetic analysis aimed to clarify the phylogenetic positions of the studied *Lonicera* species from Kazakhstan using plastid genome nucleotide sequences, including three newly sequenced ones (*L. caerulea* subsp. *altaica*, *L. caerulea* subsp. *pallasii*, and *L. micrantha*) in this study. The genomic data obtained in this study provide valuable resources for future phylogenetic research, contributing to an understanding of evolutionary relationships within the genus *Lonicera* and supporting further taxonomic revisions. Based on the comparison of phylogenetic trees reconstructed using different datasets and methods, we conclude that the maximum likelihood tree derived from complete plastid genome sequences was the most informative, and its topology is consistent with those reported in previous studies (Srivastav et al., 2023; Yang X.L. et al., 2024). Furthermore, the nucleotide sequences of variable regions such as *accD-ycf1-ndhF-trnN-GUU* also demonstrate high potential for use in DNA barcoding, and may serve as valuable molecular markers for species phylogenetic studies within the genus *Lonicera*.

Conclusion

The complete plastid genomes of *L. caerulea* subsp. *altaica*, *L. caerulea* subsp. *pallasii*, *L. tatarica*, and *L. micrantha* exhibited the typical circular structure with four distinct regions. Structural variations were observed in the plastomes of *L. caerulea* subsp. *altaica* and *L. caerulea* subsp. *pallasii*, particularly in genome sizes, which were larger than in the other two species (*L. tatarica* and *L. micrantha*) due to an extended IR region. This finding aligns with previous studies on *L. caerulea* plastomes, further supporting their shared evolutionary history. The nucleotide sequences of variable regions such as *accD-ycf1-ndhF-trnN-GUU* demonstrate high potential for use in DNA barcoding, and may serve as valuable molecular markers for species phylogenetic studies within the genus *Lonicera*. Further studies are required to assess the effectiveness of the identified simple sequence repeats.

References

Abdulina S.A. Checklist of Vascular Plants of Kazakhstan. Almaty, 1999 (in Russian)
Al-Hadeithi Z.S.M., Jasim S.A. Study of plant genetic variation through molecular markers: an overview. *J Pharm Res Int*. 2021;33:464-473. doi 10.9734/jpri/2021/v33i45B32828
Ali I., Khan D., Ali F., Bibi H., Malik A. Phytochemical, antioxidant and antifungal studies on the constituents of *Lonicera quinquelocularis*. *J Chem Soc Pak*. 2013;35(1):139-143. doi 10.5897/JMPR 2013.5245
Almerikova S., Yermagambetova M., Ivashchenko A., Abugaliev S., Turuspekov Y. Assessment of complete plastid genome sequences of

Tulipa alberti Regel and *Tulipa greigii* Regel species from Kazakhstan. *Genes*. 2024;15:1447. doi 10.3390/genes15114447
Ametov A.A., Mukhitdinov N.M., Abidkulova K.T., Karasholkova L.N., Ydyrys A. Characteristics of plant communities with *Lonicera iliensis* Pojark. in the middle flow of the River Ili. *KazNU Bulletin. Biol Series*. 2016;4(69):12-21 (in Russian)
Amiryousefi A., Hyvönen J., Poczar P. IRscope: an online program to visualize the junction sites of chloroplast genomes. *Bioinformatics*. 2018;34:3030-3031. doi 10.1093/bioinformatics/bty220
Baitulin I.O., Sitpayeva G.T. (Eds) Red Book of Kazakhstan: Plants. Astana, 2014 (in Russian)
Beier S., Thiel T., Munch T., Scholz U., Mascher M. MISA-web: a web server for microsatellite prediction. *Bioinformatics*. 2017;33(16): 2583-2585. doi 10.1093/bioinformatics/btx198
Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114-2120. doi 10.1093/bioinformatics/btu170
Boyarshikh I.G., Kostikova V.A. Changes in the individual and group composition of polyphenols in leaves of *Lonicera caerulea* subsp. *altaica* and *Spiraea chamaedryfolia* as related to chemical element content in soil and plants on ultra-alkaline parent rock material. *Rastitelnye Resursy*. 2023;59(2):164-179. doi 10.31857/S0033 994623020048 (in Russian)
Cao Z., Yang L., Xin Y., Xu W., Li Q., Zhang H., Tu Y., Song Y., Xin P. Comparative and phylogenetic analysis of complete chloroplast genomes from seven *Neocinnamomum* taxa (Lauraceae). *Front Plant Sci*. 2023;14:1205051. doi 10.3389/fpls.2023.1205051
Chac L.D., Thinh B.B. Species identification through DNA barcoding and its applications: a review. *Biol Bull*. 2023;50:1143-1156. doi 10.1134/s106235902360229x
Chen F., Liu H., Yao Q., Fang P., Lv F. Genetic variations and evolutionary relationships among radishes (*Raphanus sativus* L.) with different flesh colors based on red pigment content, karyotype and simple sequence repeat analysis. *Afr J Biotechnol*. 2015;16:3270-3281. doi 10.5897/AJB2015.14911
Chen J., Xie D., He X., Yang Y., Li X. Comparative analysis of the complete chloroplast genomes in *Allium* section *Bromatorrhiza* species (Amaryllidaceae): phylogenetic relationship and adaptive evolution. *Genes*. 2022;13(7):1279. doi 10.3390/genes13071279
Chen X., Zhou J., Cui Y., Wang Y., Duan B., Yao H. Identification of *Ligularia* herbs using the complete chloroplast genome as a superbarcode. *Front Pharmacol*. 2018;9:695. doi 10.3389/fphar.2018.00695
Dierckxsens N., Mardulyn P., Smits G. NOVOPlasty: de novo assembly of organelle genomes from whole genome data. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(4):e18. doi 10.1093/nar/gkw955
Dong S., Ying Z., Yu S., Wang Q., Liao G., Ge Y., Cheng R. Complete chloroplast genome of *Stephania tetrandra* (Menispermaceae) from Zhejiang Province: insights into molecular structures, comparative genome analysis, mutational hotspots and phylogenetic relationships. *BMC Genomics*. 2021;22(1):880. doi 10.1186/s12864-021-08193-x
Donoghue M.J., Bell C.D., Li J. Phylogenetic patterns in Northern Hemisphere plant geography. *Int J Plant Sci*. 2001;162(S6):S41-S52. doi 10.1086/323278
Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*. 1987;19(1):11-15
Feng Z., Zheng Y., Jiang Y., Pei J., Huang L. Phylogenetic relationships, selective pressure and molecular markers development of six species in subfamily Polygonoideae based on complete chloroplast genomes. *Sci Rep*. 2024;14(1):9783. doi 10.1038/s41598-024-58934-7
Frazer K.A., Pachter L., Poliakov A., Rubin E.M., Dubchak I. VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:W273-W279. doi 10.1093/nar/gkh458
Ge L., Li J., Wan H., Zhang K., Wu W., Zou X., Wu S., Zhou B., Tian J., Zeng X. Novel flavonoids from *Lonicera japonica* flower buds and validation of their anti-hepatoma and hepatoprotective activity *in vitro* studies. *Ind Crops Prod*. 2018;125:114-122. doi 10.1016/j.indcrop.2018.08.073

- Golubev D., Zemskaya N., Shevchenko O., Shaposhnikov M., Kukumann D., Patov S., Puneegov V., Moskalev A. Honeysuckle extract (*Lonicera pallasii* L.) exerts antioxidant properties and extends the lifespan and healthspan of *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology*. 2022;23(2):215-235. doi 10.1007/s10522-022-09954-1
- Guo Q., Xue X., Wang D., Zhang L., Liu W., Wang E., Cui X., Hou X. Genetic diversity and population genetic structure of *Paeonia suffruticosa* by chloroplast DNA simple sequence repeats (CpSSRs). *Hortic Plant J*. 2025;11(1):367-376. doi 10.1016/j.hpj.2023.10.006
- Hara H. A revision of Caprifoliaceae of Japan with Reference to Allied Plants in other Districts and the Adoxaceae. Ginkgoana. Tokyo: Academia Scientific Book, 1983
- Hayes D.J., Peterson B.J. Growth of *Lonicera caerulea* across fertility and moisture conditions: comparisons with *Lonicera villosa* and invasive congeners. *HortScience*. 2020;55(2):149-155. doi 10.21273/HORTSCI14318-19
- He L., Qian J., Li X., Sun Z., Xu X., Chen S. Complete chloroplast genome of medicinal plant *Lonicera japonica*: genome rearrangement, intron gain and loss, and implications for phylogenetic studies. *Molecules*. 2017;22(2):249. doi 10.3390/molecules22020249
- Hong Z., He W., Liu X., Tembrock L.R., Wu Z., Xu D. Comparative analyses of 35 complete chloroplast genomes from the genus *Dalbergia* (Fabaceae) and the identification of DNA barcodes for tracking illegal logging and counterfeit rosewood. *Forests*. 2022;13(4):626. doi 10.3390/f13040626
- Howe C.J., Barbrook A.C., Koumandou V.L., Nisbet R.E.R., Symington H.A., Wightman T.F. Evolution of the chloroplast genome. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2003;358(1429):99-106. doi 10.1098/rstb.2002.1176
- Hsu P.S., Hu C.C., Wang H.J. Flora Reipublicae Popularis Sinicae. Vol. 72. Science Press, 1988 (in Chinese)
- Huson D.H., Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol*. 2006;23(2):254-267. doi 10.1093/molbev/msj030
- Jiao Y.X., He X.F., Song R., Wang X.M., Zhang H., Aili R., Chao Y.H., Shen Y.H., Yu L.X., Zhang T.J., Jia S.G. Recent structural variations in the *Medicago* chloroplast genomes and their horizontal transfer into nuclear chromosomes. *J Syst Evol*. 2023;61(4):627-642. doi 10.1111/jse.12900
- Jo I.H., Han S., Shim D., Ryu H., Hyun T.K., Lee Y. Complete chloroplast genome of the inverted repeat-lacking species *Vicia bungei* and development of polymorphic simple sequence repeat markers. *Front Plant Sci*. 2022;13:891783. doi 10.3389/fpls.2022.891783
- Kim G.B., Lim C.E., Kim J.S., Kim K., Lee J.H., Yu H.J., Mun J.H. Comparative chloroplast genome analysis of *Artemisia* (Asteraceae) in East Asia: insights into evolutionary divergence and phylogenomic implications. *BMC Genomics*. 2020;21(1):415. doi 10.1186/s12864-020-06812-7
- Kong D., Li Y., Bai M., Deng Y., Liang G., Wu H. A comparative study of the dynamic accumulation of polyphenol components and the changes in their antioxidant activities in diploid and tetraploid *Lonicera japonica*. *Plant Physiol Biochem*. 2017;112:87-96. doi 10.1016/j.plaphy.2016.12.027
- Kushnarenko S.V., Karasholakova L.N., Ozek G., Abidkulova K.T., Mukhitdinov N.M., Baser K.H.C., Ozek T. Investigation of essential oils from three natural populations of *Lonicera iliensis*. *Chem Nat Compd*. 2016;52:751-753. doi 10.1007/s10600-016-1765-6
- Li Q. The complete chloroplast genomes of *Primula obconica* provide insight that neither species nor natural section represent monophyletic taxa in *Primula* (Primulaceae). *Genes*. 2022;13(4):567. doi 10.3390/genes13040567
- Li X.Q., Zuo Y.J., Zhu X.X., Liao S., Ma J.S. Complete chloroplast genomes and comparative analysis of sequence evolution among seven *Aristolochia* (Aristolochiaceae) medicinal species. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5):1045. doi 10.3390/ijms20051045
- Lin L.M., Zhang X.G., Zhu J.J., Gao H.M., Wang Z.M., Wang W.H. Two new triterpenoid saponins from the flowers and buds of *Lonicera japonica*. *J Asian Nat Prod Res*. 2008;10(10):925-929. doi 10.1080/10286020802217366
- Liu H., Liu W., Ahmad I., Xiao Q., Li X., Zhang D., Fang J., Zhang G., Xu B., Gao Q., Chen S. Complete chloroplast genome sequence of *Triosteum sinuatum*, insights into comparative chloroplast genomics, divergence time estimation and phylogenetic relationships among Dipsacales. *Genes*. 2022;13(5):933. doi 10.3390/genes13050933
- Liu M.L., Fan W.B., Wang N., Dong P.B., Zhang T.T., Yue M., Li Z.H. Evolutionary analysis of plastid genomes of seven *Lonicera* L. species: implications for sequence divergence and phylogenetic relationships. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12):4039. doi 10.3390/ijms19124039
- Liu M., Yu Q., Yi Y., Xiao H., Putra D.F., Ke K., Zhang Q., Li P. Antiviral activities of *Lonicera japonica* Thunb. components against grouper iridovirus *in vitro* and *in vivo*. *Aquaculture*. 2020;519:734882. doi 10.1016/j.aquaculture.2019.734882
- Liu X., Luo J., Zhang M., Wang Q., Liu J., Wu D., Fu Z. Phylogenomic analysis of two species of *Parasenecio* and comparative analysis within tribe Senecioneae (Asteraceae). *Diversity*. 2023;15:563. doi 10.3390/d15040563
- Lohse M., Drechsel O., Bock R. OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW): a tool for the easy generation of high-quality custom graphical maps of plastid and mitochondrial genomes. *Curr Genet*. 2007;52:267-274. doi 10.1007/s00294-007-0161-y
- Luo C., Huang W., Sun H., Yer H., Li X., Li Y., Yan B., Wang Q., Wen Y., Huang M., Huang H. Comparative chloroplast genome analysis of *Impatiens* species (Balsaminaceae) in the Karst area of China: insights into genome evolution and phylogenomic implications. *BMC Genomics*. 2021;22(1):571. doi 10.1186/s12864-021-07807-8
- Lācis G., Kārklīņa K., Bartulsons T., Stalažs A., Jundzis M., Balke I., Ruņģis D., Strautiņa S. Genetic structure of a *Ribes* genetic resource collection: inter- and intra-specific diversity revealed by chloroplast DNA simple sequence repeats (CpSSRs). *Sci Hort*. 2022;304:111285. doi 10.1016/j.scienta.2022.111285
- Maximowicz C.J. Diagnoses Plantarum Novarum Asiaticarum. Petropoli, Imperialis Academiae Scientiarum, 1877. doi 10.5962/bhl.title.46308
- Nakai T. A new classification of the genus *Lonicera* in the Japanese Empire, together with the diagnoses of new species and new varieties. *J Jpn Bot*. 1938;14:359-375
- Nakaji M., Tanaka N., Sugawara T. A molecular phylogenetic study of *Lonicera* L. (Caprifoliaceae) in Japan based on chloroplast DNA sequences. *Acta Phytotaxon Geobot*. 2015;66(3):137-151. doi 10.18942/apg.KJ00010115701
- Nguyen L.T., Schmidt H.A., Von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol*. 2015;32:268-274. doi 10.1093/molbev/msu300
- Ni F.Y. Chemical constituents from flower buds of *Lonicera japonica*. *Chin Tradit Herb Drugs*. 2017;48(18):3689-3692. doi 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.18.004
- Nyamgerel N., Baasanmunkh S., Oyuntsetseg B., Tsegmed Z., Bayarmaa G., Lazkov G., Pyak E., Gil H.Y., Park I., Choi H.J. Comparative plastome analysis and taxonomic classification of snow lotus species (*Saussurea*, Asteraceae) in Central Asia and Southern Siberia. *Funct Integr Genomics*. 2024;24(2):42. doi 10.1007/s10142-024-01309-y
- Oyuntsetseg D., Nyamgerel N., Baasanmunkh S., Oyuntsetseg B., Urgamal M., Yoon J.W., Bayarmaa G.A., Choi H.J. The complete chloroplast genome and phylogenetic results support the species position of *Swertia banzragczii* and *Swertia marginata* (Gentianaceae) in Mongolia. *Bot Stud*. 2024;65(1):11. doi 10.1186/s40529-024-00417-z
- Palmer J.D., Jansen R.K., Michaels H.J., Chase M.W., Manhart J.R. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Ann Missouri Bot Gard*. 1988;75(4):1180-1206. doi 10.2307/2399279
- Park H.S., Park K.I., Lee D.H., Kang S.R., Nagappan A., Kim J.A., Kim E.H., Lee W.S., Shin S.C., Hah Y.S., Kim G.S. Polyphenolic extract isolated from Korean *Lonicera japonica* Thunb. induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells: involvement of PI3K/Akt and MAPKs. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(7):2407-2416. doi 10.1016/j.fct.2012.04.034
- Purty R.S., Chatterjee S. DNA barcoding: an effective technique in molecular taxonomy. *Austin J Biotechnol Bioeng*. 2016;3(1):1059

- Qu X.J., Moore M.J., Li D.Z., Yi T.S. PGA: a software package for rapid, accurate, and flexible batch annotation of plastomes. *Plant Methods*. 2019;15:50. doi 10.1186/s13007-019-0435-7
- Rambaut A. FigTree, a graphical viewer of phylogenetic trees. 2009. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rehder A. Synopsis of the genus *Lonicera*. *Mo Bot Gard Annu Rep*. 1903;27-232. doi 10.2307/2400049
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol*. 2012;61(3):539-542. doi 10.1093/sysbio/sys029
- Rozas J., Sánchez-DelBarrio J.C., Messeguer X., Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 2003;19(18):2496-2497. doi 10.1093/bioinformatics/btg359
- Ruhlman T.A., Jansen R.K. The plastid genomes of flowering plants. *Methods Mol Biol*. 2014;1132:3-38. doi 10.1007/978-1-62703-995-6_1
- Souza U.J.B., Nunes R., Targueta C.P., Diniz-Filho J.A.F., Telles M.P.C. The complete chloroplast genome of *Stryphnodendron adstringens* (Leguminosae – Caesalpinioideae): comparative analysis with related mimosoid species. *Sci Rep*. 2019;9(1):14206. doi 10.1038/s41598-019-50620-3
- Srivastav M., Clement W.L., Landrein S., Zhang J., Howarth D.G., Donoghue M.J. A phylogenomic analysis of *Lonicera* and its bearing on the evolution of organ fusion. *Am J Bot*. 2023.110(4):e16143. doi 10.1002/ajb2.16143
- Taldybay A., Aidarbayeva D., Kurmantayeva A., Mussaev K., Amanbekova D., Joltukova B. Medicinal plants in the flora of Zhetysu Alatau, Zhetysu region, Kazakhstan. *Casp J Environ Sci*. 2024; 22(3):567-579. doi 10.22124/CJES.2024.7831
- Tang D., Lin Y., Wei F., Quan C., Wei K., Wei Y., Cai Z., Kashif M.H., Miao J. Characteristics and comparative analysis of *Mesona chinensis* Benth chloroplast genome reveals DNA barcode regions for species identification. *Funct Integr Genomics*. 2022;22:467-479. doi 10.1007/s10142-022-00846-8
- Varlashchenko L., Balabak A., Mamchur V., Polishchuk V. Application of introduced representatives of *Lonicera pileata* Oliv. in landscaping of the Right-Bank Forest-Steppe of Ukraine. *Grassroots J Nat Res*. 2021;4(3):34-41. doi 10.33002/nr2581.6853.040304
- Vdovina T.A. Biochemical evaluation of fruits of promising forms of Altai honeysuckle (*Lonicera altaica* Pall.), introduced in the conditions of the Astana Botanical Garden. *Probl Bot South Sib Mongol*. 2019;18(1):556-560. doi 10.14258/pbssm.2019117 (in Russian)
- Vdovina T.A., Lagus O.A., Isakova E.A., Vinokurov A.A. State of coenopopulations of wild berry plants in the territory of Kazakhstan Altai. *Bull Karaganda Univ Biol Med Geogr Ser*. 2024;11629(4): 129-134. doi 10.31489/2024BMG4/129-134
- Wang G.Q., Morales-Briones D.F., Landis J.B., Wang H.X., Wang H.F. Progress in molecular systematics of Caprifoliaceae. *Taxon*. 2024; 74(1):5-12. doi 10.1002/tax.13279
- Wang H.X., Liu H., Moore M.J., Landrein S., Liu B., Zhu Z.X., Wang H.F. Plastid phylogenomic insights into the evolution of the Caprifoliaceae *s.l.* (Dipsacales). *Mol Phylogenet Evol*. 2020;142: 106641. doi 10.1016/j.ympev.2019.106641
- Wang L., Li F., Zhao K., Yang J., Sun H., Cui X., Dong W., Li E., Wang N. Comparative plastomes sheds light on phylogeny of *Weigela*. *Front Plant Sci*. 2024;15:1487725. doi 10.3389/fpls.2024.1487725
- Wang X.R., Szmidi A.E. Molecular markers in population genetics of forest trees. *Scand J For Res*. 2001;16(3):199-220. doi 10.1080/02827580118146
- Wen J. Evolution of Eastern Asian–Eastern North American biogeographic disjunctions: a few additional issues. *Int J Plant Sci*. 2001; 162(S6):S117-S122. doi 10.1086/322940
- Wu L., Cui Y., Wang Q., Xu Z., Wang Y., Lin Y., Song J., Yao H. Identification and phylogenetic analysis of five *Crataegus* species (Rosaceae) based on complete chloroplast genomes. *Planta*. 2021; 254(1):14. doi 10.1007/s00425-021-03667-4
- Xia C., Wang M., Guan Y., Li Y., Li J. Comparative analysis of complete chloroplast genome of ethnodrug *Aconitum episcopale* and insight into its phylogenetic relationships. *Sci Rep*. 2022;12:9439. doi 10.1038/s41598-022-13524-3
- Xia Q., Zhang H., Lv D., El-Kassaby Y.A., Li W. Insights into phylogenetic relationships in *Pinus* inferred from a comparative analysis of complete chloroplast genomes. *BMC Genomics*. 2023;24:346. doi 10.1186/s12864-023-09439-6
- Xing W., Yu W., Kong Y., Ren X., Zhu L., Li Q., Yang Y., Cheng Y., Wang H. Intraspecific chloroplast genome genetic polymorphism of *Pinellia ternata* (Xi Junecry) and its revelation of a single origin in phylogeny. *Genes*. 2024;15(12):1638. doi 10.3390/genes15121638
- Yang C., Zhang N., Wu S., Jiang C., Xie L., Yang F., Yu Z. A comparative analysis of the chloroplast genomes of three *Lonicera* medicinal plants. *Genes*. 2023;14(3):548. doi 10.3390/genes14030548
- Yang Q.R., Zhao Y.Y., Hao J.B., Li W.D. Research progress on chemical constituents and their differences between *Lonicerae japonicae* flos and *Lonicerae* flos. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2016;41(7): 1204-1211 (in Chinese) doi 10.4268/cjcm20160708
- Yang X.L., Sun Q.H., Morales-Briones D.F., Landis J.B., Chen D.J., Wang H.X., Wen J., Wang H.F. New insights into infrageneric relationships of *Lonicera* (Caprifoliaceae) as revealed by nuclear ribosomal DNA intron data and plastid phylogenomics. *J Syst Evol*. 2024;62(3):333-357. doi 10.1111/jse.13014
- Yermagambetova M., Abugaliev S., Turuspekov Y., Almerkova S. Illumina sequencing data of the complete chloroplast genome of rare species *Juniperus seravschanica* (Cupressaceae) from Kazakhstan. *Data Brief*. 2023;46:108866. doi 10.1016/j.dib.2022.108866
- Yermagambetova M., Almerkova S., Ivashchenko A., Turuspekov Y., Abugaliev S. Genetic diversity of *Tulipa alberti* and *T. greigii* populations from Kazakhstan based on application of expressed sequence tag simple sequence repeat markers. *Plants*. 2024;13(18): 2667. doi 10.3390/plants13182667
- Yoo H.J., Kang H.J., Song Y.S., Park E.H., Lim C.J. Anti-angiogenic, antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Lonicera japonica* extract. *J Pharm Pharmacol*. 2008;60(6):779-786. doi 10.1211/jpp.60.6.0014
- Zhang T., Li M., Zhu X., Li S., Guo M., Guo C., Shu Y. Comparative chloroplast genome analysis provided adaptive evolution insights in *Medicago ruthenica*. *Int J Mol Sci*. 2024;25:8689. doi 10.3390/ijms25168689
- Zhang X.F., Landis J.B., Wang H.X., Zhu Z.X., Wang H.F. Comparative analysis of chloroplast genome structure and molecular dating in Myrtales. *BMC Plant Biol*. 2021;21:219. doi 10.1186/s12870-021-02985-9
- Zhang Z., Zhang Y., Song M., Guan Y., Ma X. Species identification of *Dracaena* using the complete chloroplast genome as a super-barcode. *Front Pharmacol*. 2019;10:1441. doi 10.3389/fphar.2019.01441
- Zhao S.Y., Muchuku J.K., Liang H.Y., Wang Q.F. A complete chloroplast genome of a traditional Chinese medicine herb, *Rubia podantha*, and phylogenomics of Rubiaceae. *Physiol Mol Biol Plants*. 2023;29:843-853. doi 10.1007/s12298-023-01302-y
- Zhu M., Feng P., Ping J., Li J., Su Y., Wang T. Phylogenetic significance of the characteristics of simple sequence repeats at the genus level based on the complete chloroplast genome sequences of Cyatheaaceae. *Ecol Evol*. 2021;11(20):14327-14340. doi 10.1002/ece3.8151
- Zhu S., Liu Q., Qiu S., Dai J., Gao X. DNA barcoding: an efficient technology to authenticate plant species of traditional Chinese medicine and recent advances. *Chin Med*. 2022;17:112. doi 10.1186/s13020-022-00655-y

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

Received July 7, 2025. Revised July 29, 2025. Accepted July 29, 2025.

doi 10.18699/vjgb-25-96

Увеличение доли дальнего красного света сокращает вегетационный период тритикале в условиях спидбридинга

А.О. Блинков , В.М. Нагамова , Я.В. Минькова , Н.Ю. Свистунова , С. Радзенице , А.А. Кочешкова ,
Н.Н. Слепцов ^{1,2}, А.В. Фрейманс³, В.В. Панченко⁴, А.Г. Черноок , Г.И. Карлов , М.Г. Дивашук 

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

² Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия

³ ООО «Климбиотех», Москва, Россия

⁴ Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко, Краснодар, Россия

 aoblinkov@gmail.com

Аннотация. Работа по созданию нового перспективного сорта занимает в среднем 12–15 лет. Одним из возможных решений проблемы сокращения длительности селекционного процесса становится технология спидбридинг (speed breeding). Метод, направленный на сокращение вегетационного периода, позволяет получать до шести последовательных поколений яровых злаков за один год. К сожалению, в протоколах спидбридинга уделено мало внимания дальнему красному свету – широко известному индуктору быстрого перехода к цветению. В нашей работе мы оценили возможность использования дальнего красного света для оптимизации спидбридинга яровой тритикале. Экспериментальные растения выращивали в трех вариантах освещения, различающихся соотношением уровней излучения в области 660 нм (К – красный) и 730 нм (ДК – дальний красный): 1) К/ДК 3.75 (К > ДК); 2) К/ДК 0.8 (К = ДК) и 3) К/ДК 0.3 (К < ДК). В результате установлено, что начало цветения тритикале наступало значительно раньше при самом низком соотношении красного к дальнему красному свету (К/ДК 0.3). В среднем при К/ДК 0.3 растения, вегетирующие на минеральной вате и почвенной смеси, зацветали соответственно на 2.6 и 4.1 суток быстрее, чем при варианте К/ДК 3.75. Статистически значимой разницы по продолжительности периода от посева до цветения между вариантами К/ДК 3.75 и К/ДК 0.8 не выявлено. Показано негативное влияние увеличенной доли дальнего красного света на репродуктивную систему тритикале. У семян, сформировавшихся при К/ДК 0.3, наблюдалась значительно меньшая энергия прорастания и всхожесть. Различий в регенерационных способностях изолированных *in vitro* зародышей, полученных от тритикале, выросшей под светом с разным спектральным составом, не обнаружено. Полученные нами результаты демонстрируют, что для сокращения времени от посева до цветения тритикале важно не только наличие дальнего красного света, но и его соотношение с красным, а именно использование состава, близкого к соотношению К/ДК 0.3. Модифицированный по спектральному составу света протокол спидбридинга позволил инициировать цветение уже на 33.9 ± 1.2 сутки с момента посева. Аналогичный сорт тритикале в полевых условиях Краснодарского края и классических лабораторных условиях выращивания с фотопериодом 18/6 ч день/ночь зацвел на 25–29 суток позже, чем в условиях спидбридинга.

Ключевые слова: дальний красный свет; красный свет; спидбридинг; тритикале

Для цитирования: Блинков А.О., Нагамова В.М., Минькова Я.В., Свистунова Н.Ю., Радзенице С., Кочешкова А.А., Слепцов Н.Н., Фрейманс А.В., Панченко В.В., Черноок А.Г., Карлов Г.И., Дивашук М.Г. Увеличение доли дальнего красного света сокращает вегетационный период тритикале в условиях спидбридинга. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(6):896-904. doi 10.18699/vjgb-25-96

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания FGUM-2024-0002.

A higher far-red intensity promotes the transition to flowering in triticale grown under speed breeding conditions

A.O. Blinkov , V.M. Nagamova , Y.V. Minkova , N.Yu. Svistunova , S. Radzeniece , A.A. Kocheshkova ,
N.N. Sleptsov ^{1,2}, A.V. Freymans³, V.V. Panchenko⁴, A.G. Chernook , G.I. Karlov , M.G. Divashuk 

¹ All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia

² Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

³ LLC “Climbiotech”, Moscow, Russia

⁴ National Center of Grain named after P.P. Lukyanenko, Krasnodar, Russia

 aoblinkov@gmail.com

Abstract. It typically takes 12 to 15 years to develop a new promising variety. One of the ways to reduce this time is through speed breeding. This method allows for up to six consecutive generations of spring cereals in a single year. Although far-red light is often overlooked in speed breeding protocols, it serves as a potent inducer of accelerated flower-

ing in various plant species. In this study, we explored the advantages of far-red light as a means to optimize the speed breeding of spring triticale. Experimental plants were cultivated under three conditions with different red to far-red ratios at 660 nm (R – red) and 730 nm (FR – far red): 1) 3.75 (R > FR); 2) 0.8 (R = FR) and 3) 0.3 (R < FR). We found that the onset of triticale flowering occurred significantly earlier at the lowest red to far-red light ratio (R/FR 0.3). On average, plants bloomed 2.6 and 4.1 days earlier in a mineral wool and a soil mixture at R/FR 0.3, respectively, than those grown at R/FR 3.75. A negative effect of higher-intensity far-red light on the reproductive system of triticale was observed. Additionally, seeds obtained from plants grown under higher-intensity far-red light showed significantly lower germination energy and capacity. No differences were found in the regenerative capacity of isolated embryos *in vitro* obtained from plants grown under the different spectral compositions. Our results demonstrate that the accelerated triticale development requires not only the involvement of far-red light, but also a specific red to far-red light ratio close to 0.3. A modified speed breeding protocol relying on this ratio enabled flowering to commence as early as 33.9 ± 1.2 days after sowing. The same triticale variety grown under field conditions in the Krasnodar region and in traditional laboratory growing conditions with a photoperiod of 18/6 h day/night flowered 25 to 29 days later than those cultivated under the speed breeding conditions.

Key words: far-red light; red light; speed breeding; triticale

For citation: Blinkov A.O., Nagamova V.M., Minkova Y.V., Svistunova N.Yu., Radzeniece S., Kocheshkova A.A., Sleptsov N.N., Freymans A.V., Panchenko V.V., Chernook A.G., Karlov G.I., Divashuk M.G. A higher far-red intensity promotes the transition to flowering in triticale grown under speed breeding conditions. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(6):896-904. doi 10.18699/vjgb-25-96

Введение

Селекционеры и генетики всегда стремились к более быстрому получению гомозиготных линий злаков с заданными свойствами, в связи с чем в практику вошли такие подходы, как челночная селекция (Mergoum et al., 2009), получение удвоенных гаплоидов (Тимонова и др., 2022), использование эмбриокультуры (Liu et al., 2016) и молекулярных маркеров (Fedyaeva et al., 2023). Однако эти методы не всегда доступны для конкретной лаборатории или селекционного центра, могут требовать использования высококвалифицированного персонала, ряд из них не приводит к желаемому сокращению сроков создания чистых линий.

В последние годы набирает популярность спидбридинг (speed breeding) – метод, основанный на сокращении вегетационного периода растений до двух месяцев (Ghosh et al., 2018; Watson et al., 2018). За счет сокращения вегетационного периода одного поколения спидбридинг позволяет получать до шести последовательных поколений яровых злаков за 12 месяцев, другими словами, чистые линии за один год. Суть спидбридинга заключается в использовании физических факторов, влияющих на сокращение времени от посева до цветения, уменьшение продолжительности генеративной стадии развития и преодоление послеуборочного покоя и тем самым минимизации времени на выращивание одного поколения. Технология проста, мало затратна и позволяет работать с генотипами, адаптированными к разным природно-климатическим зонам, что способствует ее активному внедрению в различные селекционные и исследовательские программы (Hickey et al., 2017; Li et al., 2019; Vikas et al., 2021).

Для сокращения времени от посева до цветения злаков используют длительный фотопериод, спектральный состав света, включающий участок видимого светового излучения в диапазоне 400–700 нм и интенсивность света, равную 450–500 мкмоль/(м²·с) (Watson et al., 2018), ограниченную площадь питания (Zheng et al., 2023), строгий контроль температуры (Ficht et al., 2023), высокие концентрации CO₂ и удаление побегов кущения (Tanaka et al., 2016). Для сокращения периода созревания про-

дят принудительное высушивание незрелых семян с последующим преодолением у них послеуборочного покоя (Marenkova et al., 2024) или используют эмбриокультуру (Zheng et al., 2023). Однако существуют параметры, роль которых в сокращении вегетационного периода растений пока не совсем ясна. К одним из них относится наличие дальнего красного света в период выращивания.

Дальний красный (ДК) свет (730 нм) считается сильным индуктором фотоморфогенеза. В зависимости от соотношения ДК с красным (К) светом (660 нм) он по-разному влияет на прорастание семян, удлинение побегов, рост листовых пластины, кущение, а также на сокращение времени от посева до зацветания (Rajcan et al., 2004; Ugarte et al., 2010; Kegge et al., 2015; Demotes-Mainard et al., 2016). Световое излучение на таких длинах волн и их соотношение друг с другом (принято описывать как К/ДК) дают определенный сигнал для растений, который воспринимается семейством фоторецепторов фитохромов. У однодольных фитохромов представлены тремя рецепторами: *PhyA*, *PhyB* и *PhyC* (Demotes-Mainard et al., 2016; Kippes et al., 2020). Дальний красный может быть в меньшем (К/ДК > 1), большем (К/ДК < 1) и равном соотношении (К/ДК = 1) с красным светом. Дневной свет содержит примерно равные пропорции красного и дальнего красного света (1.0–1.3). Это соотношение уменьшается до ≈ 0.6 во время рассветов и закатов. Низкое соотношение красного света к дальнему красному также под навесом листьев и в пологе леса, что связано с активным поглощением красного света фотосинтетическими пигментами и отражением дальнего красного света от листьев. В данном случае низкое соотношение К/ДК как индикатор близости конкурирующих соседей инициирует синдром избегания тени, который проявляется в усиленном росте в длину, переориентации листьев в условия лучшей освещенности, а также ускоренной индукции зацветания, что увеличивает выживаемость растений (Demotes-Mainard et al., 2016; Smith, 2000).

В лабораторных условиях наибольшее влияние на рост и развитие злаков оказывает соотношение, при котором дальний красный преобладает над красным светом

($K/ДК < 1$). При свете с таким спектральным составом значительно сокращается время от посева до цветения и уменьшается рост побегов кущения (Davis, Simmons, 1994; Ugarte et al., 2010; Toyota et al., 2014; Lei et al., 2022). Однако, несмотря на ряд положительных для спидбридинга возможностей, которые может дать дальний красный свет, увеличение его доли способствует уменьшению фертильных цветков, а также озерненности колоса (Ugarte et al., 2010; Drecser et al., 2022).

В протоколах спидбридинга культурных злаков использованию дальнего красного света уделено мало внимания: на графиках спектрального состава света исследовательских работ можно наблюдать как полное его отсутствие (Watson et al., 2018; Ficht et al., 2023), так и его различные соотношения с красным светом, в котором последний значительно преобладает (Ghosh et al., 2018, Watson et al., 2018; Cha et al., 2022). Лишь в немногих работах дальний красный свет подключен в равном соотношении с красным (Zakieh et al., 2021).

Существует ряд публикаций о влиянии дальнего красного на пшеницу (Toyota et al., 2014; Drecser et al., 2022; Lei et al., 2024), ячмень (Deitzer et al., 1979; Davis, Simmons, 1994; Kegge et al., 2015) и другие злаки (Rajcan et al., 2004; Markham et al., 2010; Huber et al., 2024). По тритикале этой теме уделено мало внимания, и подобные исследования практически не проводились (Kalituho et al., 1997). Аналогичная ситуация и с работами по спидбридингу: в открытом доступе можно найти лишь единичные работы для яровой (Cha et al., 2021) и озимой (Zheng et al., 2023) тритикале. В связи с этим цель нашей работы – оценка влияния дальнего красного света и его соотношения с красным светом в условиях спидбридинга на сокращение вегетационного периода, структуру урожая и репродуктивную систему тритикале.

Материалы и методы

Используемый растительный материал и условия выращивания. Объектом исследования служил сорт яровой тритикале (*×Triticosecale* Wittm.) Дублет (Danko Nowdowla Roślin, Польша). Сорт относится к наиболее скороспелым среди сортов яровой тритикале (Losert et al., 2017), поэтому данные, полученные на этом сорте, возможно использовать в качестве показателя минимума времени, затрачиваемого на полный цикл вегетации в условиях спидбридинга у тритикале. Дублет – удвоенный гаплоид (Arseniuk, 2019), он хорошо выровнен по наступлению фаз развития и морфологическим показателям. Сорт широко распространен в Европе (Леконцева и др., 2019; Радивон, Жуковский, 2023; Faccini et al., 2023) и известен каждому специалисту в области селекции зерновых культур.

Протравленные препаратом Максим (Syngenta, Франция) семена предварительно проращивали на смоченной водой фильтровальной бумаге в темноте при температуре +25 °С. Через сутки переносили в субстрат исключительно проросшие семена. Для выращивания использовали кассеты с объемом ячеек 110 мл. В качестве субстрата использовали: 1) почвенную смесь, состоящую из торфа, чернозема, песка и вермикулита в соотношении 5:3:1:1 (50 г увлажненной смеси на одну ячейку кассеты); 2) кубики минеральной ваты размером 50 × 45 × 45 мм (один

кубик на одну ячейку кассеты). В каждую ячейку кассеты помещали по одному проросшему семени на глубину 1 см. В помещениях с растениями поддерживали температуру +25–26 °С круглосуточно, влажность воздуха 35–45 %.

Первые две недели растения в почвенной смеси поливали по мере необходимости, подкормки проводили 1 раз в неделю удобрением Tripart (General Hydroponics Europe, Франция) согласно инструкции производителя, через 2 недели с момента посева растения переводили на полив удобрением 3 раза в неделю. Кубики минеральной ваты проливали удобрением ежедневно. Раз в неделю производили внекорневую подкормку препаратом Силиплант (Nest-M, Россия) согласно рекомендациям производителя. Обработки от болезней и вредителей проводили по мере необходимости. В период вегетации срезали дополнительные побеги кущения. Фотопериод поддерживали продолжительностью 22/2 ч день/ночь (Watson et al., 2018). Для освещения использовали регулируемые мультиспектральные ШИМ диммируемые LED-лампы (Prometheus VNIISB by Gorshkoff, Россия), чип-излучатели 460, 660, 735 нм, white4000K (EPIstar, Китай); контроллер широтно-импульсной модуляции многоканальный (БКД, Россия); общая мощность 800 ватт.

В качестве контрольных условий тритикале выращивали в климатической камере Fitotron SGC 120 (Weiss Technik, Нидерланды) с люминесцентными лампами при фотопериоде 18/6 ч день/ночь и интенсивности света 285 мкмоль/(м² · с) на уровне стеллажа, температуре +22 °С и влажности воздуха 65 % круглосуточно. Посев и уход за растениями был аналогичным, как описано выше. В качестве дополнительного контроля использовали данные многолетних полевых испытаний Национального центра зерна им. П.П. Лукьяненко (Краснодарский край, Россия). Агротехника и сроки высева общепринятые для региона.

Влияние дальнего красного света на период вегетации и структуру урожая. Степень влияния дальнего красного света на тритикале определяли путем культивирования растений при трех вариантах освещения, различающихся соотношением уровней излучения в области 660 нм (К – красный) и 730 нм (ДК – дальний красный): 1) $K/ДК 3.75$ ($K > ДК$) (рис. 1, а); 2) $K/ДК 0.8$ ($K = ДК$) (см. рис. 1, б); 3) $K/ДК 0.3$ ($K < ДК$) (см. рис. 1, в).

Интенсивность освещения во всех вариантах выставляли равной 330 мкмоль/(м² · с) на уровне стеллажа. Дальний красный подключали через одну неделю с момента прорастания семян. Параметры освещения настраивали и проверяли с использованием спектрометра PG200N (United Power Research Technology Corp., Тайвань).

Наступление фенологических фаз оценивали индивидуально у каждого растения согласно (Zadoks et al., 1974). Наступлением фазы колошения был день, когда колос полностью выходил из влагалища флагового листа (фаза Z5.9). Наступлением фазы цветения считали день, в который у колосьев появлялись первые пыльники (фаза Z6.1).

Для оценки влияния дальнего красного света на тритикале проводили структурный анализ всех экспериментальных растений по основным показателям: высота растений (см), длина колоса (см), вегетативная масса колоса и соломины (г), число колосков (шт.) и зерен (шт.) на колос, число зерен на колосок (шт.), а также масса 1000 зерен (г).

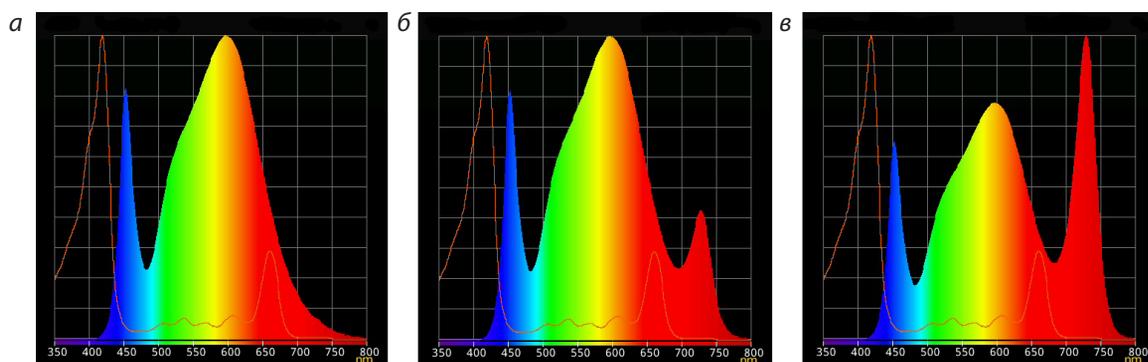


Рис. 1. Спектральный состав света, используемый в эксперименте: а – К > ДК, К/ДК 3.75; б – К = ДК, К/ДК 0.8; в – К < ДК, К/ДК 0.3.

Влияние дальнего красного света на жизнеспособность семян. Влияние дальнего красного света на жизнеспособность семян оценивали двумя способами: 1) путем культивирования незрелых зародышей; и 2) проращиванием семян на фильтровальной бумаге. В первом подходе зародыши изолировали на 15-е сутки после цветения. Зерновки стерилизовали в 50 % растворе коммерческого средства «Белизна», после чего три раза промывали стерильной дистиллированной водой. Изолирование зародышей проводили под стереоскопическим микроскопом Olympus SZ61 (Olympus, Япония). Культивировали в чашках Петри, содержащих агаризованную среду Мурашиге–Скуга (Murashige, Skoog, 1962), в течение 10 суток при фотопериоде 22 ч день / 2 ч ночь, интенсивности света равной 80 мкмоль/(м²·с) и температуре +24 °С.

Во втором подходе начиная с 17-х суток с момента цветения плавно сокращали количество полива до его полного прекращения в день срезки колосьев, на 20-е сутки после цветения. Срезанные колосья помещали в бумажные пакеты, которые подвергали принудительному высушиванию при температуре +28 °С в течение 7–10 суток в зависимости от скорости высыхания. После сушки колосья обмолачивали и семена хранили в бумажных пакетах при комнатной температуре в течение одной недели. Далее семена помещали в чашки Петри на фильтровальную бумагу, смоченную 0.5 мг/л раствора гибберелловой кислоты (Sigma-Aldrich, США) и инкубировали в условиях холодной предобработки (+4 °С, темнота, трое суток) с последующим проращиванием в темноте при +25 °С. Энергию прорастания оценивали на третьи сутки, а всхожесть на седьмые сутки после помещения чашек Петри с семенами на +25 °С.

Статистическая обработка результатов. Для оценки степени влияния спектрального состава света на период вегетации тритикале использовали двукратную повторность на каждый вариант, по 10 растений в каждой повторности. Итого анализировали 120 растений. Оценивали количество дней от посева до цветения каждого индивидуального растения. В полевых условиях оценивали количество дней от посева до массового цветения.

Для оценки регенерационной способности и жизнеспособности изолированных зародышей использовали четырехкратную повторность по 10 изолированных зародышей в каждой. Оценку энергии прорастания и всхожести семян

проводили в четырехкратной повторности. В каждой повторности было по 50 семян.

Статистическую обработку осуществляли с использованием языка программирования R (версия 4.3.2). Влияние спектрального состава света на показатели растений тритикале оценивали с использованием однофакторного дисперсионного анализа, после чего проводили множественные сравнения средних значений с использованием критерия Тьюки для определения значимых различий между группами растений.

Результаты

Влияние дальнего красного света на сроки цветения тритикале

Однофакторный дисперсионный анализ результатов проведенного эксперимента показал статистически значимое сокращение времени от посева до начала цветения у растений, культивированных под светом со спектральным составом, где К/ДК 0.3, по сравнению с другими вариантами освещенности ($p < 0.05$). Такая тенденция наблюдалась на обоих вариантах субстратов. Растения под светом со спектральным составом К/ДК 0.3 зацветали в среднем на 2.6 и 4.1 суток быстрее при использовании минеральной ваты и почвенной смеси соответственно, чем под светом со спектральным составом, где К/ДК 3.75. Статистически значимой разницы по продолжительности периода от посева до цветения между вариантами К/ДК 3.75 и К/ДК 0.8 не выявлено ($p > 0.05$) (табл. 1).

Влияние дальнего красного света на продуктивность тритикале

При структурном анализе растений тритикале, культивированных под светом со спектральным составом, различающимся соотношением красного к дальнему красному, не наблюдали изменений в вегетативной массе и высоте соломины ($p > 0.05$). Доля дальнего красного света значительно повлияла на продуктивность колоса (табл. 2). При выращивании тритикале под К/ДК 0.3 на обоих вариантах субстрата растения формировали более короткий колос с меньшим числом колосков, что приводило к снижению вегетативной массы колоса, а также количества зерна с колоса ($p < 0.05$). При увеличенной доле дальнего красного света у растений формировалось

Таблица 1. Средние значения \pm 95 % доверительный интервал показателей сроков колошения и цветения у сорта Дублет, выращенного под светом с разным спектральным составом

Субстрат	Спектр света (К/ДК)	Время от посева до колошения, сутки	Время от посева до цветения, сутки
Минеральная вата	3.75	33.5 \pm 1.0a ¹	37.3 \pm 1.1a
	0.8	34.0 \pm 1.6a	37.3 \pm 1.9a
	0.3	31.1 \pm 0.8b	34.7 \pm 0.9b
Почвенная смесь	3.75	34.1 \pm 0.9a	38.0 \pm 1.0a
	0.8	33.7 \pm 1.1a	36.9 \pm 1.2a
	0.3	30.5 \pm 1.2b	33.9 \pm 1.2b

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: ¹Значения, за которыми следует одна и та же буква, существенно не различаются ($p > 0.05$) согласно критерию Тьюки. Полу жирным начертанием отмечены значения, существенно отличающиеся от других вариантов ($p < 0.05$).

Таблица 2. Средние значения \pm 95 % доверительный интервал показателей структурного анализа элементов продуктивности сорта Дублет, выращенного под светом с разным спектральным составом

Показатель	Спектр света (К/ДК)		
	3.75	0.8	0.3
Минеральная вата			
Высота растений, см	57.9 \pm 1.8a ¹	60.5 \pm 2.2a	59.1 \pm 1.6a
Вегетативная масса соломины, г	0.34 \pm 0.08a	0.37 \pm 0.04a	0.36 \pm 0.02a
Длина колоса, см	5.5 \pm 0.3ab	5.7 \pm 0.4b	5.2 \pm 0.1a
Вегетативная масса колоса, г	1.24 \pm 0.15ab	1.40 \pm 0.18b	1.15 \pm 0.13a
Масса 1000 зерен, г	32.6 \pm 2.0a	36.3 \pm 4.9a	41.9 \pm 2.0b
Число зерен/колос, шт.	30.1 \pm 4.1ab	32.1 \pm 4.3b	24.7 \pm 2.3a
Число колосков/колос, шт.	14.2 \pm 1.2a	13.7 \pm 0.7a	12.2 \pm 0.3b
Число зерен/колосок, шт.	2.1 \pm 0.2a	2.3 \pm 0.2a	2.0 \pm 0.2a
Почвенная смесь			
Высота растений, см	60.8 \pm 3.0a	60.5 \pm 1.6a	58.4 \pm 2.2a
Вегетативная масса соломины, г	0.41 \pm 0.03a	0.46 \pm 0.03a	0.44 \pm 0.03a
Длина колоса, см	6.1 \pm 0.3a	6.1 \pm 0.3a	5.6 \pm 0.2b
Вегетативная масса колоса, г	1.44 \pm 0.11ab	1.52 \pm 0.08b	1.34 \pm 0.08a
Масса 1000 зерен, г	35.7 \pm 2.9a	40.4 \pm 1.7b	41.4 \pm 2.3b
Число зерен/колос, шт.	33.1 \pm 2.6a	30.6 \pm 2.1a	26.1 \pm 2.6b
Число колосков/колос, шт.	15.8 \pm 1.1a	14.8 \pm 0.7ab	13.9 \pm 0.5b
Число зерен/колосок, шт.	2.1 \pm 0.1a	2.1 \pm 0.1a	1.9 \pm 0.1b

меньше зерен в колоске, но только при выращивании растений на почвенной смеси. Несмотря на это, отмечено статистически значимое ($p < 0.05$) увеличение массы 1000 зерен у растений, культивированных при К/ДК 0.3 на обоих вариантах субстрата. В большинстве случаев не обнаружено статистически значимой разницы между вариантами К/ДК 3.75 и К/ДК 0.8 по показателям продуктивности.

Влияние дальнего красного света на жизнеспособность и прорастание семян

Отмечено статистически значимое уменьшение энергии прорастания и всхожести семян, сформировавшихся при увеличенной доли дальнего красного света ($p < 0.05$). У *in vitro* изолированных зародышей, полученных от рас-

тений, вегетирующих под тремя вариантами спектрального состава света, отсутствовали статистически значимые различия по регенерационной способности ($p > 0.05$) (табл. 3). Уже на третьи сутки с начала культивирования, вне зависимости от условий освещенности донорных растений у зародышей появлялись coleoptиль и корни, а через десять суток с начала культивирования зародыши имели один полноценный лист и хорошо развитую корневую систему.

Выращивание контрольных растений

Растения во всех контрольных условиях отличались продолжительным периодом «всходы–цветение». Массовое цветение тритикале сорта Дублет, по многолетним данным выращивания в условиях Краснодарского края, на-

Таблица 3. Энергия прорастания, всхожесть семян и частота регенерации изолированных зародышей, полученных от растений, культивированных под светом с разным спектральным составом

Субстрат	Спектр света (К/ДК)	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %	Регенерация изолированных зародышей, %
Минеральная вата	3.75	97.1 ± 4.0a ¹	96.5 ± 4.0a	97.5 ± 3.7a
	0.8	85.5 ± 8.5a	96.8 ± 2.5a	100 ± 0a
	0.3	44.1 ± 21.9b	77.7 ± 12.7b	100 ± 0a
Почвенная смесь	3.75	93.3 ± 4.5a	98.9 ± 1.6a	100 ± 0a
	0.8	51.3 ± 15.8b	81.4 ± 11.5b	100 ± 0a
	0.3	68.5 ± 17.3b	89.0 ± 10.8ab	100 ± 0a

ступало на 60–64-е сутки при посеве в начале марта и на 50–52-е сутки при посеве в начале апреля. В условиях климатической камеры с фотопериодом 18 ч день/6 ч ночь тритикале достигала фазы цветения на 62.5 ± 2.0 и 59.2 ± 2.6 сутки после посева на минеральной вате и почвенной смеси соответственно.

Обсуждение

В настоящее время спидбридинг активно применяют в различных направлениях генетики, селекции и биотехнологии (Ghosh et al., 2018). Проводятся модификация известных протоколов, упрощение их организации, перевод на высокопропускную способность, вовлечение методов молекулярной генетики и связывание с селекционным процессом (Kigoni et al., 2023; Marenkova et al., 2024). Протоколы спидбридинга успешно опробованы на злаках (Watson et al., 2018; Cha et al., 2021). Однако, несмотря на большую работу в этом направлении, в большинстве опубликованных работ по спидбридингу злаков не уделено должного внимания одному из сильнейших индукторов сокращения периода от посева до цветения – дальнему красному свету, хотя в условиях спидбридинга показана эффективность его применения для таких культур, как рапс (Song et al., 2022), амарант (Jähne et al., 2020) и перец (Choi et al., 2023).

Сокращение периода вегетации – одно из основных проявлений синдрома избегания тени, инициируемое дальним красным светом в фотопериодической регуляции цветения. Свет с повышенной долей дальнего красного света улавливается листьями и активирует фоторецепторы фитохромы, главным образом *PhyA* и *PhyB*. Фитохромы запускают экспрессию гена центрального регулятора цветения *CONSTANT (CO)*, который, в свою очередь, индуцирует *FLOWERING LOCUS T (FT)* – флориген в сосудистых пучках листьев. Белок FT перемещается от листьев к побеговой апикальной меристеме и вместе с белком *FD* (продуктом гена *FLOWERING LOCUS D (FD)*) запускает работу генов, в частности *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1)* и *APETALA1 (API)*, определяющих развитие флоральных меристем (Demotes-Mainard et al., 2016; Sheerin, Hiltbrunner, 2017; Лебедева и др., 2020).

Для оценки влияния эффекта дальнего красного света в условиях спидбридинга нами проведен эксперимент по выращиванию яровой тритикале на двух видах субстрата

и при трех вариантах освещения, различающихся между собой соотношением красного с дальним красным светом.

Проведенный нами эксперимент продемонстрировал значительное влияние увеличенной доли дальнего красного света ($K < ДК$, $K/ДК 0.3$) на наступление фазы цветения у тритикале. Растения, находящиеся под светом со спектральным составом, в котором $K/ДК 0.3$, зацветали на 33.9 ± 1.2 и 34.7 ± 0.9 сутки с момента посева при использовании почвенной смеси и кубиков минеральной ваты, что соответственно на 4.1 и 2.6 суток быстрее, чем при использовании спектра света, где $K/ДК 3.75$. Статистически значимого различия по продолжительности вегетации тритикале под светом со спектрами $K > ДК$ и $K = ДК$ не обнаружено. Полученные результаты говорят о том, что для сокращения периода от посева до цветения тритикале важно не только наличие дальнего красного света, но и его соотношение с красным, а именно использование состава, близкого к соотношению $K/ДК 0.3$ (рис. 2). Наши результаты согласуются с выводами, описанными в других исследованиях, демонстрирующих схожий эффект на злаках (Deitzer et al., 1979; Davis, Simmons, 1994; Toyota et al., 2014).

Несмотря на разницу сроков начала цветения, составляющую 2.6 и 4.1 суток, дальний красный можно считать хорошим дополнением к созданию условий, направленных на сокращение вегетации растений: так как если в одном поколении возможно сократить период «посев–цветение» на 3–4 суток, то суммарный эффект при выращивании последовательно шести поколений (среднее количество, способствующее получению чистой линии) может достигать 20 суток.

В настоящее время спидбридингу яровой и озимой тритикале посвящены единичные работы, демонстрирующие высокую отзывчивость этой культуры к факторам, влияющим на сокращение вегетационного периода (Cha et al., 2021; Zheng et al., 2023). Показано, что для яровой тритикале время от посева до колошения составляет в среднем 33–42 дня в зависимости от генотипа (Cha et al., 2021), в то время как яровая мягкая пшеница в условиях спидбридинга зацветает в зависимости от генотипа на 35.7–75 суток с момента посева (Ghosh et al., 2018; Watson et al., 2018; Cha et al., 2020). Наша работа подтверждает значительное влияние метода спидбридинга на сокращение вегетационного периода у тритикале: модифицированный по спектральному составу протокол позволил

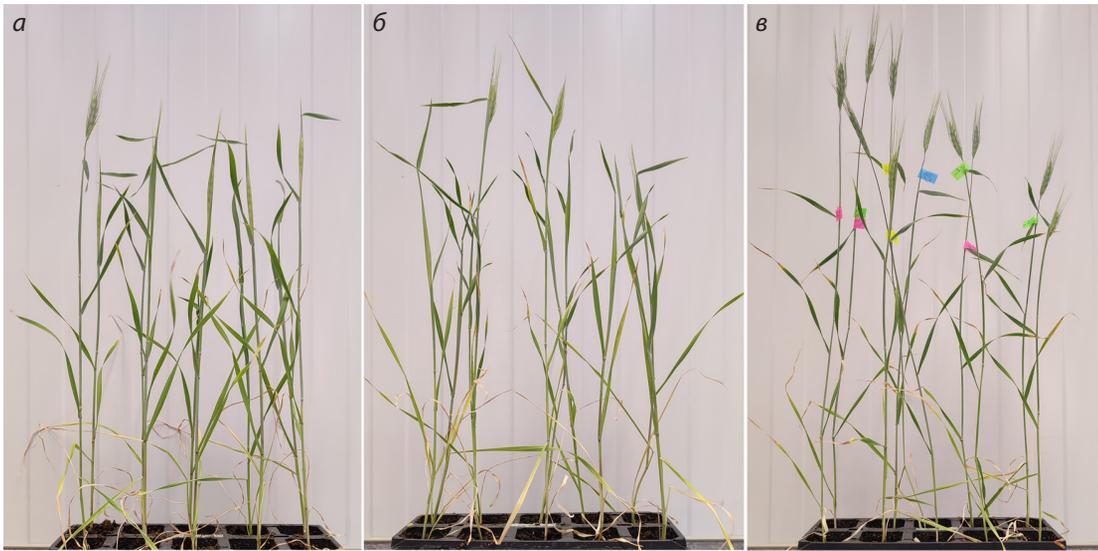


Рис. 2. Растения на 30-е сутки с момента посева (все растения посеяны в один день), культивируемые под тремя вариантами освещения с разным спектральным составом света и находящиеся в фазе: а, б – начала колошения, К/ДК 3.75 (а), К/ДК 0.8 (б); в – полного колошения, К/ДК 0.3.

иницировать цветение уже на 33.9 ± 1.2 сутки с момента посева. Аналогичный сорт тритикале в полевых условиях Краснодарского края и классических лабораторных условиях выращивания зацвел на 25–29 суток позже, чем в условиях спидбридинга.

Результаты оценки структуры урожая тритикале не показали значительных изменений в высоте изучаемых растений при выращивании под светом со спектральным составом с увеличенной долей дальнего красного света, хотя в многочисленных работах сообщается об удлинении стебля злаков при использовании дальнего красного света (Kegge et al., 2015; Lei et al., 2022). Синдром избегания затенения, вызывающий элонгацию побегов, отсутствует и в других работах, где дальний красный свет был дополнением к более коротким длинам волн (400–680 нм) (Huber et al., 2024). Это свидетельствует о том, что использование увеличенной доли дальнего красного света в условиях спидбридинга тритикале не приводит к такому вызывающему неудобство в работе фактору, как формирование высоких растений и их полегание.

Полученные нами данные продемонстрировали весо-мое влияние дальнего красного света на продуктивность колоса тритикале. У растений сорта Дублет при освещении со спектральным составом, где К/ДК 0.3, формировался более короткий колос, с меньшим числом колосков, что приводило к значительному уменьшению вегетативной массы колоса, а также количеству зерна в колосе. Схожие результаты были описаны и у мягкой пшеницы, у которой при увеличенной доле дальнего красного света уменьшается количество фертильных цветков, а также озерненность колоса (Ugarte et al., 2010; Drecser et al., 2022), что, вероятно, связано с ингибирующим воздействием дальнего красного света на усвоение растением азота (Lei et al., 2024).

Вопреки негативному влиянию дальнего красного света на элементы продуктивности колоса, масса 1000 зерен у тритикале, выросшей при увеличенной доле дальнего

красного света, оказалась намного выше. Это может быть связано с эффектом Эмерсона, заключающимся в увеличении эффективности фотосинтеза при использовании дальнего красного света совместно с более короткими длинами волн (400–680 нм) (Huber et al., 2024).

В ходе нашей работы также обнаружено статистически значимое негативное влияние дальнего красного света на энергию прорастания и всхожесть семян. Всхожесть прорастания от тритикале, выросшей под светом со спектром, где К/ДК 0.3, варьировала от 77.7 ± 12.7 до 89.0 ± 10.8 % в зависимости от субстрата для выращивания. При этом регенерационные свойства изолированных *in vitro* зародышей были одинаково хороши у всех семян вне зависимости от освещения, при котором росли донорные растения. Так как у злаков спидбридинг совместим с односемянным методом отбора (Alahmad et al., 2018; Watson et al., 2018), при котором для каждого следующего поколения отбирают по одному семени с колоса для сохранения генетического разнообразия и предотвращения расширения площадей, использование большого количества дальнего красного света не станет ограничивающим фактором при выращивании растений таким методом. Однако следует отметить, что, если главной целью выращивания растений являются размножение и получение семян с хорошей всхожестью, необходимо уменьшить долю дальнего красного света до уровня, при котором К/ДК > 1.

Закключение

Нами показано, что использование увеличенной доли дальнего красного света (К/ДК 0.3) по сравнению с вариантом освещения К/ДК 3.75 в условиях спидбридинга приводит к статистически значимому сокращению времени от посева до цветения на 2.6 и 4.1 суток у растений, культивируемых на минеральной вате и почвенной смеси, соответственно. Статистически значимого различия по продолжительности периода от посева до цветения

между вариантами К/ДК 3.75 и К/ДК 0.8 не выявлено. Модифицированный по спектральному составу света протокол спидбридинга позволил инициировать цветение уже на 33.9 ± 1.2 сутки с момента посева. Аналогичный сорт тритикале в полевых условиях Краснодарского края и классических лабораторных условиях выращивания с фотопериодом 18/6 ч день/ночь зацвел на 25–29 суток позже, чем в условиях модифицированного спидбридинга. При использовании увеличенной доли дальнего красного света не обнаружено статистически значимого увеличения высоты растений, однако обнаружено негативное влияние дальнего красного света на параметры колоса – длину и вегетативную массу колоса, число колосков и зерен на колос, а также энергию прорастания и всхожесть семян. С высокой долей уверенности предполагаем, что увеличение доли дальнего красного света (К/ДК 0.3) может быть полезным дополнением при выращивании в условиях спидбридинга не только тритикале, но и других злаков.

Список литературы / References

- Лебедева М.А., Додуева И.Е., Ганчева М.С., Творогова В.Е., Кузнецова К.А., Лутова Л.А. Эволюционные аспекты регуляции цветения: «флоригены» и «антифлоригены». *Генетика*. 2020; 56(11):1279-1303. doi 10.31857/S0016675820110065
- [Lebedeva M.A., Dodueva I.E., Gancheva M.S., Tvorogova V.E., Kuznetsova K.A., Lutova L.A. The evolutionary aspects of flowering control: Florigens and Anti-florigens. *Russ J Genet*. 2020; 56(11):1323-1344. doi 10.1134/S102279542011006X]
- Леконцева Т.А., Юферева Н.И., Стаценко Е.С. Оценка исходного материала для создания сортов яровой тритикале в условиях Волго-Вятского региона. *Дальневосточный аграрный вестник*. 2019;2(50):45-52. doi 10.22450/1999-6837-2019-2-45-52
- [Lekontzeva T.A., Yufereva N. I., Statzenko E.S. Assessment of initial material (base line) for creation of spring triticale varieties in the climate of Volgo-Vyatka region. *Dal'nevostochnyy Agrarnyy Vestnik = The Far East Agrarian Herald*. 2019;2(50):45-52. doi 10.24411/1999-6837-2019-2-45-52 (in Russian)]
- Радивон В.А., Жуковский А.Г. Анализ поражаемости сортов яровой тритикале болезнями за 2012–2022 гг. *Защита растений*. 2023;1(47):128-135
- [Radivon V.A., Zhukovsky A.G. Analysis of the susceptibility of spring triticale varieties to diseases for 2012–2022. *Zashchita Rasteniy = Plant Protection*. 2023;1(47):128-135 (in Russian)]
- Тимонова Е.М., Адонина И.Г., Салина Е.А. Изучение влияния чужеродных транслокаций на показатели андрогенеза *in vitro* у линий мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2022;183(1):127-134. doi 10.30901/2227-8834-2022-1-127-134
- [Timonova E.M., Adonina I.G., Salina E.A. The influence of combinations of alien translocations on *in vitro* androgenesis in spring common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektzii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2022;183(1):127-134. doi 10.30901/2227-8834-2022-1-127-134 (in Russian)]
- Alahmad S., Dinglasan E., Leung K.M., Riaz A., Derbal N., Voss-Fels K.P., Able C.J., Bassi F.M., Christopher C.J., Hickey L.T. Speed breeding for multiple quantitative traits in durum wheat. *Plant Methods*. 2018;14:36. doi 10.1186/s13007-018-0302-y
- Arseniuk E. Recent developments in triticale breeding research and production – an Overview. *Ekin J Crop Breed Genet*. 2019;5(2): 68-73
- Cha J.K., Lee J.H., Lee S.M., Ko J.M., Shin D.J. Heading date and growth character of Korean wheat cultivars by controlling photoperiod for rapid generation advancement. *Korean J Breed Sci*. 2020; 52(1):20-24. doi 10.9787/KJBS.2020.52.1.20
- Cha J.K., Park M.R., Shin D., Kwon Y., Lee S.M., Ko J.M., Kim K.M., Lee J.H. Growth characteristics of triticale under long-day photoperiod for rapid generation advancement. *Korean J Breed Sci*. 2021; 53(3):200-205. doi 10.9787/KJBS.2021.53.3.200
- Cha J.K., O'Connor K., Alahmad S., Lee J.H., Dinglasan E., Park H., Lee S.M., ... Kim K.M., Ko J.M., Hickey L.T., Shin D., Dixon L.E. Speed vernalization to accelerate generation advance in winter cereal crops. *Mol Plant*. 2022;15(8):1300-1309. doi 10.1016/j.molp.2022.06.012
- Choi H., Back S., Kim G.W., Lee K., Venkatesh J., Lee H.B., Kwon J.K., Kang B.C. Development of a speed breeding protocol with flowering gene investigation in pepper (*Capsicum annuum*). *Front Plant Sci*. 2023;14:1151765. doi 10.3389/fpls.2023.1151765
- Davis M.H., Simmons S.R. Far-red light reflected from neighbouring vegetation promotes shoot elongation and accelerates flowering in spring barley plants. *Plant Cell Environ*. 1994;17(7):829-836. doi 10.1111/j.1365-3040.1994.tb00177.x
- Deitzer G.F., Hayes R., Jabben M. Kinetics and time dependence of the effect of far-red light on the photoperiodic induction of flowering in Wintex barley. *Plant Physiol*. 1979;64(6):1015-1021. doi 10.1104/pp.64.6.1015
- Demotes-Mainard S., Peron T., Corot A., Bertheloot J., Gourrierc J.L., Pelleschi-Travier S., Crespel L., Morel P., Huche-Thelier L., Boumaza R., Vian A., Guerin V., Leduc N., Sakr S. Plant responses to red and far-red lights, applications in horticulture. *Envir Exp Bot*. 2016; 121:4-21. doi 10.1016/j.envexpbot.2015.05.010
- Dreecer M.F., Zwart A.B., Schmidt R.C., Condon A.G., Awasi M.A., Grant T.J., Galle A., Bourrot S., Frohberg C. Wheat yield potential can be maximized by increasing red to far-red light conditions at critical developmental stages. *Plant Cell Environ*. 2022;45(9):2652-2670. doi 10.1111/pce.14390
- Faccini N., Morcia C., Terzi V., Rizza F., Badeck F.W. Triticale in Italy. *Biology*. 2023;2(10):1308. doi 10.3390/biology12101308
- Fedyayeva A.V., Salina E.A., Shummy V.K. Pre-harvest sprouting in soft winter wheat (*Triticum aestivum* L.) and evaluation methods. *Russ J Genet*. 2023;59(1):1-11. doi 10.1134/S1022795423010052
- Ficht A., Bruch A., Rajcan I., Pozniak C., Lyons E.M. Evaluation of the impact of photoperiod and light intensity on decreasing days to maturity in winter wheat. *Crop Sci*. 2023;63(2):812-821. doi 10.1002/csc2.20886
- Ghosh S., Watson A., Gonzalez-Navarro O.E., Ramirez-Gonzalez R.H., Yanes L., Mendoza-Suarez M., Simmonds J., ... Domoney C., Uauy C., Hazard B., Wulff B.B.H., Hickey L.T. Speed breeding in growth chambers and glasshouses for crop breeding and model plant research. *Nat Protoc*. 2018;13(12):2944-2963. doi 10.1038/s41596-018-0072-z
- Hickey L.T., German S.E., Pereyra S.A., Diaz J.E., Ziems L.A., Fowler R.A., Platz G.J., Franckowiak J.D., Dieters M.J. Speed breeding for multiple disease resistance in barley. *Euphytica*. 2017;213:64. doi 10.1007/s10681-016-1803-2
- Huber M., de Boer H.J., Romanowski A., van Veen H., Buti S., Kahlon P.S., van der Meijden J., Koch J., Pierik R. Far-red light enrichment affects gene expression and architecture as well as growth and photosynthesis in rice. *Plant Cell Environ*. 2024;47(8):2936-2953. doi 10.1111/pce.14909
- Jähne F., Hahn V., Würschum T., Leiser W.L. Speed breeding short-day crops by LED-controlled light schemes. *Theor Appl Genet*. 2020; 133(8):2335-2342. doi 10.1007/s00122-020-03601-4
- Kalituho L.N., Chaika M.T., Kabashnikova L.F., Makarov V.N., Khirpach V.A. On the phytochrome mediated action of brassinosteroids. *Proc Plant Growth Regul Soc Am*. 1997;24:140-145
- Kegge W., Ninkovic V., Glinwood R., Welschen R.A.M., Voese-nek L.A.C.J., Pierik R. Red: far-red light conditions affect the emission of volatile organic compounds from barley (*Hordeum vulgare*), leading to altered biomass allocation in neighbouring plants. *Ann Bot*. 2015;115(6):961-970. doi 10.1093/aob/mcv036
- Kigoni M., Choi M., Arbelaez J.D. 'Single-Seed-SpeedBulks': a protocol that combines 'speed breeding' with a cost-efficient modified

- single-seed descent method for rapid-generation-advancement in oat (*Avena sativa* L.). *Plant Methods*. 2023;19(1):92. doi 10.1186/s13007-023-01067-1
- Kippes N., VanGessel C., Hamilton J., Akpınar A., Budak H., Dubcovsky J., Pearce S. Effect of *phyB* and *phyC* loss-of-function mutations on the wheat transcriptome under short and long day photoperiods. *BMC Plant Biol*. 2020;20:297. doi 10.1186/s12870-020-02506-0
- Lei K., Tan Q., Zhu L., Xu L., Yang S., Hu J., Gao L., Hou P., Shao Yu., Jiang D., Cao W., Dai T., Tian Z. Low red/far-red ratio can induce cytokinin degradation resulting in the inhibition of tillering in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Front Plant Sci*. 2022;13:971003. doi 10.3389/fpls.2022.971003
- Lei K., Hu H., Chang M., Sun C., Ullah A., Yu J., Dong C., Gao Q., Jiang D., Cao W., Tian Z., Dai T. A low red/far-red ratio restricts nitrogen assimilation by inhibiting nitrate reductase associated with downregulated *TaNR1.2* and upregulated *TaPIL5* in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol Biochem*. 2024;206:107850. doi 10.1016/j.plaphy.2023.107850
- Li H., Zhou Y., Xin W., Wei Y., Zhang J., Guo L. Wheat breeding in northern China: achievements and technical advances. *Crop J*. 2019; 7(6):718-729. doi 10.1016/j.cj.2019.09.003
- Liu H., Zwer P., Wang H., Liu C., Lu Z., Wang Y., Yan G. A fast generation cycling system for oat and triticale breeding. *Plant Breed*. 2016;135(5):574-579. doi 10.1111/pbr.12408
- Losert D., Maurer H.P., Marulanda J.J., Würschum T. Phenotypic and genotypic analyses of diversity and breeding progress in European triticale (*Triticosecale* Wittmack). *Plant Breed*. 2017;136(1): 18-27. doi 10.1111/pbr.12433
- Marenkova A.G., Blinkov A.O., Radzeniece S., Kocheshkova A.A., Karlov G.I., Divashuk M.G. Testing and modification of the protocol for accelerated growth of malting barley under speed breeding conditions. *Nanobiotechnol Rep*. 2024;19(5):808-814. doi 10.1134/S2635167624601955
- Markham M.Y., Stoltenberg D.E. Corn morphology, mass, and grain yield as affected by early-season red: Far-red light environments. *Crop Sci*. 2010;50(1):273-280. doi 10.2135/cropsci2008.10.0614
- Mergoum M., Singh P.K., Pena R.J., Lozano-del Río A.J., Cooper K.V., Salmon D.F., Gómez Macpherson H. Triticale: A "New" Crop with Old Challenges. In: Carena M. (Eds). *Cereals. Handbook of Plant Breeding*. Vol. 3. Springer, 2009;267-287. doi 10.1007/978-0-387-72297-9
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 1962;15(3):473-497. doi 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Rajcan I., Chandler K.J., Swanton C.J. Red-far-red ratio of reflected light: a hypothesis of why early-season weed control is important in corn. *Weed Sci*. 2004;52(5):774-778. doi 10.1614/WS-03-158R
- Sheerin D.J., Hiltbrunner A. Molecular mechanisms and ecological function of far-red light signalling. *Plant Cell Environ*. 2017;40(11): 2509-2529. doi 10.1111/pce.12915
- Smith H. Phytochromes and light signal perception by plants – an emerging synthesis. *Nature*. 2000;407(6804):585-591. doi 10.1038/35036500
- Song Y., Duan X., Wang P., Li X., Yuan X., Wang Z., Li X., Yuan X., Wang Z., Wan L., Yang G., Hong D. Comprehensive speed breeding: a high-throughput and rapid generation system for long-day crops. *Plant Biotechnol J*. 2022;20(1):13-15. doi 10.1111/pbi.13726
- Tanaka J., Hayashi T., Iwata H. A practical, rapid generation-advancement system for rice breeding using simplified biotron breeding system. *Breed Sci*. 2016;66(4):542-551. doi 10.1270/jsbs.15038
- Toyota M., Tatewaki N., Morokuma M., Kusutani A. Tillering responses to high red/far-red ratio of four Japanese wheat cultivars. *Plant Prod Sci*. 2014;17(2):124-130. doi 10.1626/pp.17.124
- Ugarte C.C., Trupkin S.A., Ghiglione H., Slafer G., Casal J.J. Low red/far-red ratios delay spike and stem growth in wheat. *J Exp Bot*. 2010;61(11):3151-3162. doi 10.1093/jxb/erq140
- Vikas V.K., Sivasamy M., Jayaprakash P., Vinod K.K., Geetha M., Nisha R., Peter J. Customized speed breeding as a potential tool to advance generation in wheat. *Indian J Genet Plant Breed*. 2021; 81(2):199-207. doi 10.31742/IJGPB.81.2.3
- Watson A., Ghosh S., Williams M.J., Cuddy W.S., Simmonds J., Rey M.D., Hatta M.A.M., ... Uauy C., Boden S.A., Park R.F., Wulff B.B.H., Hickey L.T. Speed breeding is a powerful tool to accelerate crop research and breeding. *Nat Plants*. 2018;4(1):23-29. doi 10.1038/s41477-017-0083-8
- Zadoks J.C., Chang T.T., Konzak C.F. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res*. 1974;14(6):415-421. doi 10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x
- Zakieh M., Gaikpa D.S., Leiva Sandoval F., Alamrani M., Henriksen T., Odilbekov F., Chawade A. Characterizing winter wheat germplasm for fusarium head blight resistance under accelerated growth conditions. *Front Plant Sci*. 2021;12:705006. doi 10.3389/fpls.2021.705006
- Zheng Z., Gao S., Wang H., Liu C. Shortening generation times for winter cereals by vernalizing seedlings from young embryos at 10 degree Celsius. *Plant Breed*. 2023;142(2):202-210. doi 10.1111/pbr.13074

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 05.11.2024. После доработки 13.05.2025. Принята к публикации 14.05.2025.

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 СМИ Эл № ФС77-85772, зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 14 августа 2023 г.

Издание включено ВАК Минобрнауки России в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, Russian Science Citation Index, Российский индекс научного цитирования, ВИНИТИ, Web of Science CC, Scopus, PubMed Central, DOAJ, ROAD, Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar.

Открытый доступ к полным текстам:
русскоязычная версия – на сайте <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. Саватеева.

Дата выхода в свет 30.09.2025. Формат 60 × 84 1/8. Уч.-изд. л. 23.9

