

ВАВИЛОВСКИЙ

ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

2026 • 30 • 4



Молекулярная и клеточная биология / Генетика растений / Селекция растений на иммунитет и продуктивность /
Генетика человека / Медицинская генетика / Эволюция видов

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-26-56

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)

Ответственный секретарь

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

Редакционная коллегия

Е.Е. Андронов – д-р биол. наук (Россия)

Ю.С. Аульченко – д-р биол. наук (Нидерланды)

О.С. Афанасенко – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Д.А. Афонников – д-р биол. наук, доцент (Россия)

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

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

А. Бёрнер – д-р наук (Германия)

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

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

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

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

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

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

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)

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

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

С.А. Лашин – д-р биол. наук (Россия)

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)

И.В. Максимов – д-р биол. наук (Россия)

Б.А. Малярчук – д-р биол. наук (Россия)

Ю.Г. Матушкин – канд. биол. наук (Россия)

В.И. Молодин – академик РАН, д-р ист. наук (Россия)

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

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)

Е.В. Шахтшнейдер – д-р мед. наук (Россия)

С.В. Шестаков – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

С.В. Шеховцов – д-р биол. наук (Россия)

Н.С. Юдин – канд. 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-26-56

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**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*, Dr. Sci. (Biology), Russia*Yu.S. Aulchenko*, Dr. Sci. (Biology), The Netherlands*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*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

A.M. Kudryavtsev, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*D.M. Larkin*, Cand. Sci. (Biology), Great Britain*S.A. Lashin*, Dr. Sci. (Biology), Russia*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

I.V. Maksimov, Dr. Sci. (Biology), Russia*B.A. Malyarchuk*, Dr. Sci. (Biology), Russia*Yu.G. Matushkin*, Cand. Sci. (Biology), Russia*V.I. Molodin*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (History), Russia*M.P. Moshkin*, Professor, Dr. 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

E.Y. Rykova, Dr. Sci. (Biology), Russia*E.A. Salina*, Corr. Member of the RAS, Professor,

Dr. Sci. (Biology), Russia

E.V. Shakhshneider, Dr. Sci. (Medicine), Russia*S.V. Shekhovtsov*, Dr. Sci. (Biology), Russia*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

N.S. Yudin, Cand. 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

- 541 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Концепция природной реконструкции генома. Часть 6. Анализ изменения частот встречаемости SNP в экзонах генов, ассоциированных с клональным гемопоэзом неопределенного потенциала у пациента с нейроэндокринной опухолью тонкой кишки в терминальной стадии прогрессии после модификации генома гемопоэтических стволовых клеток препаратом hDNA^{gr} (клинический случай).
Д.Ю. Ощепков, В.С. Рузанова, С.Г. Ошихмина, А.А. Траспов, Е.В. Долгова, Г.С. Риттер, С.С. Кирикович, Е.В. Левитес, Я.Р. Ефремов, О.С. Таранов, Л.Ю. Гривцова, С.В. Сидоров, С.Д. Никонов, О.Ю. Леплина, А.А. Останин, Е.Р. Черных, Н.А. Колчанов, А.С. Брюховецкий, С.С. Богачев
- 557 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Эффекты хронического психосоциального стресса на развитие ооцитов и преимплантационных эмбрионов мышей.
Т.Н. Игонина, И.Д. Чекашов, А.Л. Левинсон, С.Я. Амстиславский

Генетика растений

- 569 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Некоторые аспекты межвидовой гибридизации *Solanum lycopersicum* L. и *Solanum sisymbriifolium* Lam. А.В. Вишнякова, А.П. Федотов, Е.В. Осминина, А.З. Мартиросян, А.Д. Кобяшова, А.А. Александрова, А.А. Миронов, С.Г. Монахос
- 581 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Дифференциация субгеномов среди StY-геномных видов рода *Elymus* (Triticeae, Poaceae) с территории России по данным секвенирования ядерного гена *GBSS1* (*ваху*). А.В. Агафонов, Е.В. Шабанова (Кобозева), А.А. Бондарь, О.В. Дорогина
- 593 **ОБЗОР**
Исследования генетического разнообразия и геномов мискантуса для оптимизации их биотехнологического потенциала.
И.В. Чадаева, Д.И. Каретников, А.Ю. Пронозин, Э.С. Стародубцева, Н.А. Омелянчук, А.В. Кочетов, Д.А. Афонников
- 601 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Создание растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) с инактивированным геном *StPain-1* с помощью CRISPR/Cas9. В.Д. Карлов, М.К. Волков, А.Д. Антипов, Ю.С. Монахова, А.С. Трофимов, Л.Н. Коновалова, А.В. Бабаков, Р.А. Комахин, В.В. Таранов

Селекция растений на иммунитет и продуктивность

- 612 **ОБЗОР**
Грибные патогены растений: расшифровка механизмов фузариозного увядания.
М.П. Банкин, А.А. Самсонова, Т.А. Рожмина, М.Г. Самсонова
- 625 **ОБЗОР**
Использование геномных методов скрининга в создании селекционного материала риса с высоким качеством зерна.
Н.Г. Туманьян, Ж.М. Мухина
- 636 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Создание тритикале с фиолетовой окраской зерна. Н.В. Петраш, П.И. Стёпочкин
- 645 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Получение голозерных гибридов *Triticum durum* с *Triticum dicosum* с антоциановой окраской перикарпа зерновки. Е.И. Гордеева, А.Ю. Новосельская-Драгович, О.Ю. Шоева, Е.К. Хлесткина

Генетика человека

- 658 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Генетическая характеристика и метаанализ населения Северного Причерноморья I тысячелетия н. э. по данным древней ДНК.
Э.Д. Айтуганова, А.С. Коньков, Т.В. Андреева, Е.В. Рождественских, А.Д. Манахов, Е.И. Розаев

Медицинская генетика

- 669 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Отбор и анализ DNase I-гиперчувствительных сайтов для пренатального определения трисомии 21 у плода. А.М. Мазур, А.С. Старшин, Н.В. Богуш, Е.Б. Прохорчук
- 676 **ОБЗОР**
Парадигма соматического мозаицизма при многофакторных заболеваниях.
А.А. Слепцов, М.С. Назаренко, В.П. Пузырев
- 685 **ОБЗОР**
Мобильные генетические элементы в патогенезе репродуктивных нарушений человека. А.А. Бабовская, Е.А. Трифонова, В.А. Степанов

Эволюция видов

- 696 **ОБЗОР**
Эволюция вида *Ovis aries*.
Т.Н. Хамируев

Molecular and cell biology

- 541 ORIGINAL ARTICLE
The concept of natural genome reconstruction. Part 6. Analysis of changes in the frequency of occurrence of SNPs in exons of the genes associated with clonal hematopoiesis of uncertain potential in a patient with a neuroendocrine tumor of the small intestine in the terminal stage of progression after modification of the hematopoietic stem cell genome with hDNAST (a clinical case report).
D.Y. Oshchepkov, V.S. Ruzanova, S.G. Oshikhmina, A.A. Trasopov, E.V. Dolgova, G.S. Ritter, S.S. Kirikovich, E.V. Levites, Y.R. Efremov, O.S. Taranov, L.U. Gritsova, S.V. Sidorov, S.D. Nikonov, O.Y. Leplina, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh, N.A. Kolchanov, A.S. Bryukhovetskiy, S.S. Bogachev

- 557 ORIGINAL ARTICLE
Effects of chronic psychosocial stress on the development of mouse oocytes and preimplantation embryos.
T.N. Igonina, I.D. Chekashov, A.L. Levinson, S.Ya. Amstislavsky

Plant genetics

- 569 ORIGINAL ARTICLE
Issues of interspecific hybridization between *Solanum lycopersicum* L. and *Solanum sisymbriifolium* Lam. A.V. Vishnyakova, A.P. Fedotov, E.V. Osmolina, A.Z. Martirosyan, A.D. Kobyashova, A.A. Alexandrova, A.A. Mironov, S.G. Monakhos
- 581 ORIGINAL ARTICLE
Differentiation of subgenomes in **StY**-genomic species of the genus *Elymus* (Triticeae, Poaceae) from the territory of Russia according to sequencing data of the nuclear gene *GBSS1* (*waxy*). A.V. Agafonov, E.V. Shabanova (Kobozeva), A.A. Bondar, O.V. Dorogina
- 593 REVIEW
Research on genetic diversity and genomes of *Miscanthus* for optimizing their biotechnological potential. I.V. Chadaeva, D.I. Karetnikov, A.Yu. Pronozin, E.S. Starodubtseva, N.A. Omeljanчук, A.V. Kochetov, D.A. Afonnikov
- 601 ORIGINAL ARTICLE
Development of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants with inactivated *StPain-1* gene using CRISPR/Cas9. V.D. Karlov, M.K. Volkov, A.D. Antipov, Yu.S. Monahova, A.S. Trofimov, L.N. Konovalova, A.V. Babakov, R.A. Komakhin, V.V. Taranov

Plant breeding for immunity and performance

- 612 REVIEW
Fungal pathogens of plants: deciphering the mechanisms of Fusarium wilt. M.P. Bankin, A.A. Samsonova, T.A. Rozhmina, M.G. Samsonova
- 625 REVIEW
Using genomic screening methods to create high-quality rice breeding material. N.G. Tumanyan, Zh.M. Mukhina
- 636 ORIGINAL ARTICLE
Development of purple-grain triticale. N.V. Petrash, P.I. Stepochkin
- 645 ORIGINAL ARTICLE
Development of naked *Triticum durum* × *Triticum dicoccum* hybrids with anthocyanin color of the grain pericarp. E.I. Gordeeva, A.Yu. Novoselskaya-Dragovich, O.Yu. Shoeva, E.K. Khlestkina

Human genetics

- 658 ORIGINAL ARTICLE
Genetic characterization and meta-analysis of the population of the Northern Black Sea region in the 1st millennium CE based on ancient DNA data. E.D. Aituganova, A.S. Kon'kov, T.V. Andreeva, E.V. Rozhdestvenskikh, A.D. Manakhov, E.I. Rogaev

Medical genetics

- 669 ORIGINAL ARTICLE
Selection and evaluation of DNase I hypersensitive sites for prenatal screening of trisomy 21 in the fetus. A.M. Mazur, A.S. Starshin, N.V. Bogush, E.B. Prokhortchouk
- 676 REVIEW
The paradigm of somatic mosaicism in complex diseases. A.A. Sleptcov, M.S. Nazarenko, V.P. Puzryev
- 685 REVIEW
Mobile genetic elements in the pathogenesis of human reproductive disorders. A.A. Babovskaya, E.A. Trifonova, V.A. Stepanov

















Evolution of species

- 696 REVIEW
Evolution of the species *Ovis aries*. T.N. Khamiruev

doi 10.18699/vjgb-26-57

Концепция природной реконструкции генома.

Часть 6. Анализ изменения частот встречаемости SNP в экзонах генов, ассоциированных с клональным гемопоэзом неопределенного потенциала у пациента с нейроэндокринной опухолью тонкой кишки в терминальной стадии прогрессии после модификации генома гемопоэтических стволовых клеток препаратом hDNA^{gr} (клинический случай)

Д.Ю. Ощепков , В.С. Рузанова , С.Г. Ошихмина ^{1,2}, А.А. Траспов³, Е.В. Долгова , Г.С. Риттер , С.С. Кирикович , Е.В. Левитес , Я.Р. Ефремов , О.С. Таранов , Л.Ю. Гривцова³, С.В. Сидоров ^{2,5}, С.Д. Никонов⁶, О.Ю. Леплина , А.А. Останин , Е.Р. Черных , Н.А. Колчанов , А.С. Брюховецкий^{8#}, С.С. Богачев ^{1#} 

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

² Новосибирский национальный государственный исследовательский университет, Новосибирск, Россия

³ Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Обнинск, Россия

⁴ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

⁵ Городская клиническая больница № 1, Новосибирск, Россия

⁶ Государственная областная Новосибирская клиническая туберкулезная больница, Новосибирск, Россия

⁷ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

⁸ АО Клинический госпиталь «НейроВита», Москва, Россия

 labmolbiol@mail.ru

Аннотация. В последней части цикла работ приводятся результаты пилотного исследования клинического случая (пациент К.), свидетельствующие о снижении частоты встречаемости SNP в экзонах генов, ассоциированных с клональным гемопоэзом неопределенного потенциала у пациента с нейроэндокринной опухолью тонкой кишки в терминальной стадии прогрессии при применении терапии, позволяющей реконструировать геном гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Основные принципы терапии состояли в следующем. У пациента отбирали контрольные образцы мононуклеаров периферической крови (нулевая точка). Затем проводились мобилизация и сбор CD34+ ГСК. Осуществлялись модификацию генома ГСК с использованием технологии, позволяющей провести *ex vivo* коррекцию нуклеотидных последовательностей ДНК хромосом низкодифференцированных предшественников гемопоэза. Для этого собранную лейкоцитарную массу, обогащенную CD34+ ГСК, обрабатывали фрагментированной депротенизированной геномной ДНК, полученной от ~100 молодых здоровых рожениц (hDNA^{gr}). Пациенту внутривенно реинфузировали обработанные клетки. За 5 дней до реинфузии пациент получал иммуносупрессивную терапию. Через 4, 8, 12 и 27 мес. также забирались образцы мононуклеаров периферической крови. Было проведено полноэкзомное секвенирование ДНК, выделенной из отобранных образцов клеток. В качестве критерия, отражающего изменения в геноме, была выбрана группа общепринятых генов клонального гемопоэза. В нулевой точке, в точках через 4, 8, 12 мес. использовались мультиплексные панели: MGI Easy Exome Capture V5 Probe set, Roche KAPA HyperExome, Nanodigmbio NEXome Plus Panel v1.0, охватывающие весь экзом и некодирующие области анализируемых генов, прилегающие к экзонам с покрытием ~100x. Для верификации выявленных мутаций и более точного определения их долей в прочтениях на последнем этапе анализа, через 27 мес. после терапии, использовалась панель с покрытием ~1000x (Nanodigmbio NanOnco Plus Panel v3.0), включающая выявленные в нулевой точке гены с мутантными аллелями. Также было выполнено полноэкзомное секвенирование препарата hDNA^{gr} (Roche KAPA HyperExome), используемого для реконструкции генома ГСК, фрагменты которого в совокупности составляют полный геном человека. Несмотря на то что анализ прочтений полноэкзомного секвенирования ДНК, выделенной из мононуклеаров крови после проведенного лечения, не позволил выявить у пациента К. известных на данный момент признаков клонального гемопоэза с неопределенным потенциалом, нами обнаружено достоверное в рамках выбранного критерия снижение диапазона частот SNP до 18 % к 27-му месяцу наблюдения в 15 % гетерозиготных аллелей (*DNMT1*, *SF3B1*(1-2)). Последующий анализ частоты встречаемости контролируемых SNP и соответствующих данных по глубине их секвенирования, выполненный с использованием алгоритма All-FIT, свидетельствует, что к 27-му месяцу наблюдения доля клеток, несущих базовый набор SNP, значимо снижается на 12 % (доверительный интервал 5–16 %). Иными словами, в смеси клеток, гетерозиготных по этим SNP, появляется популяция клеток, несущая гомозиготу без SNP. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что для значимой доли клеток произошла коррекция SNP на альтернативный аллель и эта коррекция связана с обработкой исходных ГСК препаратом hDNA^{gr}, причем обнаруженные изменения в группе генов клонального гемопоэза предполагают возможность коррекции других локусов по всему геному ГСК. Как следствие, клинические проявления в развитии патологии болезни имеют ярко выраженную положительную динамику, сохраняющуюся на протяжении четырех лет, до настоящего времени. Предполагается, что положительный клинический эффект после проведенной терапии реконструированными

© Ощепков Д.Ю., Рузанова В.С., Ошихмина С.Г., Траспов А.А., Долгова Е.В., Риттер Г.С., Кирикович С.С., Левитес Е.В., Ефремов Я.Р., Таранов О.С., Гривцова Л.Ю., Сидоров С.В., Никонов С.Д., Леплина О.Ю., Останин А.А., Черных Е.Р., Колчанов Н.А., Брюховецкий А.С., Богачев С.С., 2026

&, # Авторы внесли равный вклад.

Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

стволовыми клетками крови связан с усилением регенеративного потенциала ГСК, произошедшего вследствие генетической коррекции неблагоприятных мутаций в геноме ГСК.

















Ключевые слова: клональный гемопоэз; нейроэндокринная опухоль; технология реконструирования генома; полногеномное секвенирование; гемопоэтические стволовые клетки

Для цитирования: Ощепков Д.Ю., Рузанова В.С., Ошихмина С.Г., Траспов А.А., Долгова Е.В., Риттер Г.С., Кирикович С.С., Левитес Е.В., Ефремов Я.Р., Таранов О.С., Гривцова Л.Ю., Сидоров С.В., Никонов С.Д., Леплина О.Ю., Останин А.А., Черных Е.Р., Колчанов Н.А., Брюховецкий А.С., Богачев С.С. Концепция природной реконструкции генома. Часть 6. Анализ изменения частот встречаемости SNP в экзонах генов, ассоциированных с клональным гемопоэзом неопределенного потенциала у пациента с нейроэндокринной опухолью тонкой кишки в терминальной стадии прогрессии после модификации генома гемопоэтических стволовых клеток препаратом hDNA^{gr} (клинический случай). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(4):541-556. doi 10.18699/vjgb-26-57

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в Институте цитологии и генетики (государственный бюджетный проект № FWNR-2026-0025) и при поддержке И.Н. Зайцевой и АО Клинический госпиталь «НейроВита».

The concept of natural genome reconstruction.

Part 6. Analysis of changes in the frequency of occurrence of SNPs in exons of the genes associated with clonal hematopoiesis of uncertain potential in a patient with a neuroendocrine tumor of the small intestine in the terminal stage of progression after modification of the hematopoietic stem cell genome with hDNA^{gr} (a clinical case report)

D.Y. Oshchepkov , V.S. Ruzanova , S.G. Oshikhmina , A.A. Traspov³, E.V. Dolgova , G.S. Ritter , S.S. Kirikovich , E.V. Levites , Y.R. Efremov , O.S. Taranov , L.U. Grivtsova³, S.V. Sidorov , S.D. Nikonov⁶, O.Y. Leplina , A.A. Ostanin , E.R. Chernykh , N.A. Kolchanov , A.S. Bryukhovetskiy^{8#}, S.S. Bogachev  

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia


⁴ State Scientific Centre of Virology and Biotechnology "Vector" of Rosпотребнадзор, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

⁵ City Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russia

⁶ State Regional Novosibirsk Clinical Tuberculosis Hospital, Novosibirsk, Russia

⁷ Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

⁸ Clinical Hospital "NeuroVita", Moscow, Russia

 labmolbiol@mail.ru

Abstract. The final part of our series of studies reports the results of a pilot study of a clinical case (patient K.), indicating that therapy enabling reconstruction of the genome of hematopoietic stem cells (HSCs) reduces the frequency of SNPs in exons of the genes associated with clonal hematopoiesis of uncertain potential in a patient with a neuroendocrine tumor of the small intestine in the terminal stage of progression. The fundamental principles of the therapy were as follows. Control samples of peripheral blood mononuclear cells (baseline) were collected from the patient. CD34+ HSCs were then mobilized and collected. The HSC genome was modified using a technology enabling *ex vivo* correction of the nucleotide sequences of DNA chromosomes of poorly differentiated hematopoietic progenitor cells. For this purpose, the collected leukocyte suspension enriched with CD34+ HSCs was treated with fragmented deproteinized genomic DNA obtained from approximately 100 young healthy women in labor (hDNA^{gr}). The patient was reinfused intravenously with the treated cells. Five days before reinfusion, the patient received immunosuppressive therapy. Samples of peripheral blood mononuclear cells were also collected 4, 8, 12, and 27 months after the therapeutic intervention. Full-exome sequencing of DNA isolated from selected cell samples was performed. A group of commonly accepted clonal hematopoiesis genes was selected as a criterion demonstrating changes in the genome. The following multiplex panels were used at the initial time point as well as time points after 4, 8, and 12 months: MGIEasy Exome Capture V5 Probe set, Roche KAPA HyperExome, Nanodigmbio NEXome Plus Panel v1.0, covering the entire exome and non-coding regions of the analyzed genes adjacent to exons with ~100× coverage. A ~1000× coated panel (Nanodigmbio NanOnco Plus Panel v3.0), including the genes with mutant alleles identified at the initial time point, was used to verify the identified mutations and more accurately determine their proportions in readings at the last stage of the analysis (27 months after the therapy). Whole-exome sequencing of hDNA^{gr} (Roche KAPA HyperExome), which is used to reconstruct the genome of HSCs whose fragments collectively constitute the complete human genome, was also performed. Although the analysis of readings of whole-exome sequencing of DNA isolated from blood samples after treatment did not reveal any currently known signs of clonal hematopoiesis with uncertain potential in the patient K., we found a significant, within the framework of the selected criterion, decrease in the frequency range of SNPs to 18 % by 27 months of follow-up in 15 % cases of the heterozygous alleles (*DNMT1*, *SF3B1(1–2)*). Subsequent analysis of the frequency of occurrence of controlled SNPs and the corresponding data on the depth of their sequencing, performed using the All-FIT algorithm, indicates that by the 27th month of follow-up, the proportion of cells carrying the basic set of

SNPs significantly decreases by 12 % (confidence interval (CI) = 5–16 %). In other words, in a mixture of cells heterozygous for this SNP, a population of cells carrying a homozygote without an SNP appears. Our findings may indicate that a significant proportion of cells underwent correction of the SNP to an alternative allele, and this correction was associated with the treatment of the original HSCs with hDNA^{gr}. The detected changes in the group of clonal hematopoiesis genes suggest the possibility of correcting other loci throughout the HSCs genome. Therefore, the clinical manifestations in the development of the disease show a pronounced positive trend, which has persisted for four years, until present. It is assumed that the positive clinical outcome after therapy with reconstructed hematopoietic stem cells is associated with an increase in the regenerative potential of HSCs, which resulted from the genetic correction of unfavorable mutations in the HSCs genome.

Key words: clonal hematopoiesis; neuroendocrine tumor; genome reconstruction technology; whole-genome sequencing; hematopoietic stem cells

For citation: Oshchepkov D.Y., Ruzanova V.S., Oshikhmina S.G., Traspov A.A., Dolgova E.V., Ritter G.S., Kirikovich S.S., Levites E.V., Efremov Y.R., Taranov O.S., Grivtsova L.U., Sidorov S.V., Nikonov S.D., Leplina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bryukhovetskiy A.S., Bogachev S.S. The concept of natural genome reconstruction. Part 6. Analysis of changes in the frequency of occurrence of SNPs in exons of the genes associated with clonal hematopoiesis of uncertain potential in a patient with a neuroendocrine tumor of the small intestine in the terminal stage of progression after modification of the hematopoietic stem cell genome with hDNA^{gr} (a clinical case report). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(4):541-556. doi 10.18699/vjgb-26-57

Введение

В настоящее время активное развитие получило такое направление, как регенеративная медицина. Ее целью является восстановление поврежденных и пораженных болезнью тканей и органов с применением стволовых клеток. Основным методом регенеративной медицины – трансплантация зрелых стволовых клеток. Наиболее широкое применение получили два типа стволовых клеток: мезенхимальные стволовые клетки и гемопоэтические стволовые клетки.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) репарируют повреждения, используя различные механизмы. Они активируются провоспалительными цитокинами: интерфероном гамма (IFN- γ), фактором некроза опухоли альфа (TNF α), интерлейкином 1 бета (IL-1 β), а также различными лигандами толл-подобных рецепторов 3 (TLR3) и 4 (TLR4) (Waterman et al., 2010; English, 2013). Активные МСК выделяют различные цитокины и хемокины, такие как фактор роста фибробластов 2 (FGF2), инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF1), трансформирующий фактор роста бета (TGF β), простагландин E2 (PGE2), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), интерлейкины 6 (IL-6) и 13 (IL-13), индолеамин-2,3-диоксигеназа (IDO). За счет секретируемых факторов МСК воздействуют на многие клетки систем врожденного и адаптивного иммунитета, в том числе макрофаги, дендритные клетки, натуральные киллеры, Т-хелперные и регуляторные клетки, а также В-клетки, смещая локальный баланс в противовоспалительном направлении, что способствует регенерации тканей (Yin, Heit, 2021).

Паракринное действие МСК ингибирует окислительный стресс и обладает антиапоптотическими эффектами (Brown et al., 2019). *In vitro* было показано, что МСК могут мигрировать в направлении некоторых цитокинов и хемокинов, таких как стромальный клеточный фактор роста (SDF1), тромбоцитарный фактор роста-AB (PTGF-AB), IGF1, TNF α , эпидермальный фактор роста (EGF), высвобождающихся в межклеточное пространство в результате повреждения или ишемии, и запускать противовоспалительные реакции. МСК выделяют внеклеточные везикулы, в которых содержатся различные факторы роста, активирующие ангиогенез и клеточную пролиферацию, а

также микроРНК, тРНК, липиды, которые препятствуют апоптозу клеток и поддерживают мультипотентное состояние прогениторов (Maacha et al., 2020).

Еще одним механизмом регенерации является прямой перенос митохондрий МСК в клетки поврежденной ткани через нанотрубки, что, помимо усиления регенеративного потенциала целевых клеток, стимулирует антимикробную активность иммунных клеток (Islam et al., 2012; Li X. et al., 2014; Jackson et al., 2016). МСК способны дифференцироваться в различные типы клеток соединительных тканей, а именно остеобласты, хондроциты, адипоциты и миоциты. Они содержатся в костном мозге, пуповинной крови, плаценте, жировой ткани и др. и участвуют в восстановлении поврежденных клеток и тканей и ускоряют их регенерацию (Spees et al., 2016). Трансплантация МСК показала хорошие результаты в доклинических и клинических испытаниях при лечении множества дегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера (Wang et al., 2018), Паркинсона (Mendes Filho et al., 2018), боковой амиотрофический склероз (Gugliandolo et al., 2019). Помимо трансдифференцировки, была показана возможность слияния МСК с клетками реципиента, в том числе с клетками мозга, мышц, кишечника и печени, что способствовало восстановлению ткани органов (Fan et al., 2020).

Вклад гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в репаративный потенциал организма не менее масштабный. ГСК участвуют в репарации повреждений, в первую очередь связанных с активностью клеток крови. Они дифференцируются во все клетки крови и иммунной системы, тем самым обеспечивая постоянное их обновление в организме. Имеются данные, свидетельствующие о том, что ГСК могут трансдифференцироваться в соматические типы клеток, включая гепатоциты, кардиомиоциты, нейральные, эпителиальные и эндотелиальные клетки, приводя к регенерации соответствующих тканей (Lee, Hong, 2020; Li L. et al., 2021; Yuan et al., 2023). Тем не менее существует точка зрения, что репаративный потенциал ГСК в случае тканевых систем, отличных от лимфогематопоза, скорее всего, определяется паракринным действием ГСК, но не истинной трансдифференцировкой. Считается, что потенциал развития ГСК, как и других взрослых стволовых

клеток, ограничен врожденной системой типа стволовых клеток и тканью (Müller et al., 2016). Подобно МСК, ГСК воздействуют на клетки в очагах повреждения, секретируя различные молекулы, в том числе цитокины, хемокины, ростовые факторы, модулируя про- и противовоспалительные реакции и активируя репаративные механизмы таргетных клеток (Schwarting et al., 2008; Li N. et al., 2010; Wright et al., 2011; Liao et al., 2018; Fast et al., 2021; Biermann, Reya, 2022).

Известно, что репаративный потенциал стволовых клеток системы крови прежде всего зависит от их аллельного разнообразия, формирующего нормальный гемопоэз. Эта характеристика ГСК теряется в ходе жизни, и в стареющем организме гемопоэз приобретает клональные черты.

Классическая модель кроветворения, предполагающая строго иерархический процесс дифференцировки ГСК в зрелые клетки крови, претерпевает развитие. Современное представление о гемопоэзе связано с концепцией кроветворения как функционирования неоднородного пула ГСК и коммитированных клеток-предшественниц со всем множеством путей их дифференцировки и плавными переходами от одного состояния к другому (Jagannathan-Bogdan, Zon, 2013; Velten et al., 2017; Watcham et al., 2019). Гомеостаз гемопоэза обеспечивается сложной сетью взаимодействий механизмов регуляции транскрипции, эпигенетической модификации и метаболической адаптации, находящихся под влиянием внешних факторов, а также гуморальных и локальных сигналов микроокружения костного мозга (Pinho, Frenette, 2019). С возрастом в системе кроветворения происходят как количественные, так и качественные изменения. Пролиферативная активность стволовых клеток крови снижается, наблюдается смещение активности клеток иммунной системы в направлении провоспалительных реакций (Weiskopf et al., 2009; Ainciburu et al., 2023). Одной из причин указанных фенотипических изменений считается развитие клонального гемопоэза.

Нормальное кроветворение поддерживается множеством долго- и короткоживущих, сменяющих друг друга клонов кроветворных клеток. Костный мозг – одна из самых быстро пролиферирующих тканей. В организме человека каждый день производится примерно 1 триллион зрелых клеток крови (Doulatov et al., 2012). В основе системы кроветворения лежат стволовые кроветворные клетки, способные дифференцироваться во все зрелые клетки крови (Phillips, 1991; Bonnet, 2003). Потомство одной стволовой клетки крови представляет собой клон (Siminovitsh et al., 1963). При устойчивом кроветворении система поликлональна, т. е. множество стволовых клеток крови одновременно участвует в поддержании нормальных показателей клеток периферической крови (Drize et al., 1996; Goyal, Zandstra, 2015; Carrelha et al., 2018). Менее 1.3 миллиона стволовых клеток крови поддерживают образование зрелых клеток периферической крови в течение жизни человека (Watson et al., 2020; Петинати, Дризе, 2021). Клональное кроветворение характеризуется непропорциональным увеличением числа потомков только нескольких стволовых клеток крови, несущих определенные мутации, по отношению ко множеству остальных клонов.

По сути, клональный гемопоэз является биологическим состоянием кроветворной системы, а не заболеванием.

Понятие клонального гемопоэза сформировалось после обнаружения типичных соматических мутаций в клетках периферической крови большой когорты пациентов (Genovese et al., 2014; Jaiswal et al., 2014). Во всех группах в образцах периферической крови были выявлены мутации в сходном наборе генов, при этом встречаемость мутаций зависела от возраста. Было идентифицировано более 70 различных генов, несущих определенные мутации (Sleptsov et al., 2023). Это, например, эпигенетические регуляторы (*DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*), гены репарации повреждения ДНК (DDR) (*TP53*, *PPM1D*, *CHEK2*, *ATM*), сигнальные гены клеточного роста (*JAK2*) и факторы сплайсинга (*SF3B1*, *SRSF2*). Наиболее часто мутирующими оказались гены *DNMT3A*, *TET2* и *ASXL1*, на долю которых приходится 80–90 % от всех детектируемых мутаций (Genovese et al., 2014; Jaiswal et al., 2014; Heyde et al., 2021; Joo et al., 2023). В настоящее время известно, что соматические мутации, возникшие и закрепившиеся в генах ГСК, в первую очередь относящихся к регуляторам эпигенетической модификации и клеточного цикла, являются основным движущим фактором клональной экспансии.

Соматические мутации в генах клонального гемопоэза – это результат стохастических событий, однако ускоренный темп их накопления во многом ассоциирован с возрастными изменениями ГСК, которые характеризуются снижением общего регенеративного потенциала (Geiger et al., 2013). Оказалось, что они наблюдаются у 10 % лиц старше 65 лет и лишь у 1 % лиц моложе 50 лет. При этом темпы накопления мутаций зависят непосредственно от гена. *DNMT3A*-мутантные клоны возникают в раннем возрасте и имеют постоянную скорость появления новых: ~5 % в год. Клоны, имеющие мутации в генах факторов сплайсинга (*SF3B1*, *SRSF2*), обнаруживаются в более позднем возрасте, а скорость появления новых составляет ~50 % в год. *TET2*-мутантные клоны постоянно возникают и фиксируются в течение всей жизни (Fabre et al., 2022).

Формирование мутантных ГСК происходит вследствие накопления мутаций, и клетка теряет свой регенеративный потенциал. В результате этого процесса мутировавший клон приобретает селективное пролиферативное преимущество, которое приводит к его клональной экспансии. Развивается клональный гемопоэз, и гемопоэтическая система теряет способность восстанавливать повреждения, возникшие в организме. Дополнительным механизмом клональной экспансии является элиминация мутантных клонов ГСК, накопивших соматические мутации, несовместимые с жизнеспособностью клетки. Данный защитный механизм сокращает стволовую и прогениторную пул клеток, что приводит к увеличению темпов накопления мутаций ввиду повышенной пролиферативной нагрузки на оставшиеся ГСК (Sleptsov et al., 2023).

Укорочение теломер, связанное с возрастом и возникающее в результате полуконсервативного механизма деления ДНК хромосом, увеличивает вероятность повреждений ДНК, тем самым тоже способствуя накоплению мутаций (D'Adda Di Fagnana et al., 2003).

Экспансия мутантных клонов не всегда сопровождается нарушением показателей крови и клиническими признаками. То есть количество клеток с соматической мутацией в периферической крови растет, но злокачественной трансформации еще не наблюдается. Такое состояние получило название «клональный гемопоэз с неопределенным потенциалом» (КГНП) (Heuser et al., 2016; Shlush, 2018; Steensma, 2018). Основным критерием КГНП считается определение частоты специфического вариантного аллеля, т. е. мутационной нагрузки, пропорциональной количеству аномальных клеток, которая при клональном гемопоэзе с неопределенным потенциалом равна или превышает 2 % (Duncavage, Tandon, 2015).

Существуют внешние причины, которые приводят к соматическому мутагенезу. Это возраст, генетическая предрасположенность, медикаментозная терапия и риски воздействия окружающей среды (Joo et al., 2023). Предлагаемые варианты, тем не менее, не дают понимания молекулярных и клеточных механизмов возникновения соматических мутаций в ГСК, что и является основой клональности предшественников гемопоэза.

На основании данных о существовании механизма интернализации экстраклеточной ДНК в стволовые клетки различного генеза можно предположить следующую логику накопления неблагоприятных SNP в ГСК.

В организме в периферийных тканях происходит постоянное появление и накопление мутаций (Шамаль, 2017; Cagan et al., 2022). После апоптотической или некротической гибели клетки с мутациями поставляют фрагменты, содержащие генетические нарушения, в кровотоки (Anker et al., 1999; Jahr et al., 2001; Laktionov et al., 2004). Эти фрагменты достигают ГСК (и, по-видимому, других типов стволовых клеток) и интернализуются в них естественным природным механизмом за счет характерной структуры гликокаликса ГСК, отличающегося положительным зарядом (Dolgova et al., 2014; Petrova et al., 2022; Ritter et al., 2022; Potter et al., 2024). Доставленные в ГСК экстраклеточные фрагменты инициируют процесс терминальной дифференцировки ГСК, основным ярко выраженным событием которой является возникновение пангеномных однопочечных разрывов (Vatolin et al., 1997; Potter et al., 2024; Ruzanova et al., 2024). Это событие влечет за собой активацию репаративно-рекомбинационных систем клетки и индукцию так называемой рекомбиногенной ситуации (Likhacheva et al., 2008). Предполагается, что в процессе развития рекомбиногенной ситуации экстраклеточные фрагменты способны вступать в рекомбинационные отношения с геномной ДНК и интегрировать в геном в гомологичных локусах, замещая геномные последовательности (Yakubov et al., 2007; García-Olmo et al., 2012). Поскольку рекомбинация в условиях пангеномных однопочечных разрывов имеет высокую степень точности (Xu, 2015; Vriend, Krawczyk, 2017; Maizels, Davis, 2018; Zilio, Ulrich, 2021), такое замещение функционально и не будет нарушать последовательность ДНК генома, за исключением привнесения мутации. Со временем происходит накопление мутаций, и ГСК может приобрести клональные черты со всеми вытекающими последствиями. Этот механизм

становится более вероятным в случае активации апоптоза или появления очагов некротической деструкции в любой из тканей организма вследствие возникших патологий.

В связи с вышесказанным анализ генов клонального гемопоэза естественным образом оказался главным направлением исследований для выяснения последствий проводимой терапии, поскольку, если предложенная концепция верна, то в прямом эксперименте, используя обработку ГСК препаратом фрагментированной ДНК (hDNA^{gr}) и современные методы полногеномного секвенирования, можно обнаружить соответствующие изменения в маркерных генах клонального гемопоэза. Если в организме развился КГНП, то общепринятые гены этой группы со специфическими для такого состояния драйверными мутациями могут представлять собой адекватную модель, позволяющую детектировать произошедшие аллельные замещения в их нуклеотидных последовательностях. Причем в данном случае, если такие изменения будут найдены, то анализируемая группа генов может стать маркерной платформой, отражающей сам факт *ex vivo* коррекции, который можно будет экстраполировать на весь геном. Однако в случае, если ни одно из известных маркерных событий (в известных генах) клонального гемопоэза не будет обнаружено, найденные изменения частот SNP могут в принципе свидетельствовать об изменении клонального состава ГСК. Это, в свою очередь, будет говорить о потенциальной коррекции неблагоприятных аллелей других генов и появлении клонов с другим набором аллелей SNP, отвечающих за регенеративный потенциал ГСК. В клиническом плане коррекция мутантных аллелей, относящихся или к системе генов клонального гемопоэза, или ко всему другому разнообразию генов, участвующих в поддержании регенеративных свойств стволовых клеток крови, на альтернативные благоприятные аллели будет свидетельствовать о восстановлении исходного регенеративного потенциала ГСК.

В настоящей части цикла работ приведены данные пилотного исследования клинического случая, которые свидетельствуют, что после терапии МНК, обогащенными CD34+ стволовыми клетками крови, которые были обработаны препаратом двупочечной ДНК человека (hDNA^{gr}), произошло снижение частоты встречаемости определенного набора SNP, маркирующих общепринятые гены КГНП.

В рамках выбранных критериев обнаружено изменение частот определенных зародышевых мутантных аллелей генов клонального гемопоэза *ASXL1*, *DNMT1*, *RAD21*, *SF3B1(1-3)*, находящихся в гетерозиготе: для них наблюдается снижение частоты нуклеотидных замен до 18 % от нормального распределения чистых гетерозигот 50 %. Это свидетельствует о значимом отклонении от ожидаемого распределения частот для одной клональной линии клеток с характерным для гетерозиготы набором SNP и о появлении смеси клональных линий, несущих исследуемые SNP в разных пропорциях.

Основываясь на данных по частотам аллелей SNP и соответствующей глубине их секвенирования с использованием платформы All-FIT (Loh et al., 2020), мы провели

оценку содержания клеток разных клональных линий с определенным набором SNP и обнаружили достоверное свидетельство появления 12 % (доверительный интервал (CI) от 5 до 16 %) клеток с альтернативным набором SNP. Выдвигается гипотеза, что в результате проведенного лечения произошла коррекция мутантных аллелей на немутантные. При этом восстановился регенеративный потенциал ГСК (возможно, и других типов стволовых клеток, например МСК), проявившийся яркими положительными клиническими изменениями состояния пациента. Предполагается, что это восстановление связано не только и не столько с коррекцией в генах клонального гемопоэза, сколько с восстановлением других мутантных локусов в значимой доле ГСК, генетические нарушения в которых стали причиной его ослабления.

Материалы и методы

Законодательная база клинических исследований. При проведении исследования авторы руководствовались принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации. Клиническая часть регулировалась соответствующими Протоколами лечения и сопровождалась добровольным согласием пациента (Приложение 1)¹.

Препарат hDNA^{gr}. Для обработки клеток использовалась фрагментированная геномная ДНК человека (препарат hDNA^{gr} ТУ 20.42.15-001-58179831-2023, патент № 2855434 от 02.02.2026), полученная от ~100 здоровых рожениц и прошедшая real-time ПЦР верификацию и несколько анализов, характеризующих эпидемиологическую чистоту препарата согласно нормативным документам.

Пациент. Анамнез. Онкологический пациент К., 67 лет, с выраженными сердечно-сосудистыми нарушениями. История болезни № 2022/0025, находился в клинике АО Клинический госпиталь «НейроВита» с 13.07.2022 по 29.07.2022, 16 койко-дней.

Диагноз основного заболевания: С17. Нейроэндокринная опухоль тонкой кишки Т3N0M0. Резекция тонкой кишки, формирование илеостомы. Гистологическое заключение от 29.10.2018: нейроэндокринная опухоль G2 с вовлечением стенки тонкой кишки, с признаками лимфососудистой инвазии и периневральной инвазии, без метастазов. Край резекции кишки без признаков опухолевого роста. Сопутствующие заболевания: ишемическая болезнь сердца, постинфарктный кардиосклероз, стенозирующий атеросклероз коронарных артерий.

29.10.2018 был проведен один курс программной химиотерапии по схеме XELOX. Лекарственная терапия октреотидом-депо (до 05.2019).

Прогрессирование заболевания 26.10.2021: рост очагов (вероятно, МТС) в печени, лекарственная терапия соматулином.

Химиоэмболизация сегментарных ветвей правой печеночной артерии иринотеканом от 11.11.2021. ТБКА со стентированием ПКА, ПМЖВ, АО от 19.11.2021.

Гипертоническая болезнь 3 ст., риск 4. Нарушение ритма и проводимости сердца: пароксизмальная форма фи-

брилляции предсердий, пароксизмальная наджелудочковая тахикардия, радиочастотная абляция медленного пути АВ-соединения, каватрикуспидального истмуса 31.01.2022. Атриовентрикулярная блокада 1 ст. Наджелудочковая экстрасистолия. ХСН 2а, 2 ФК (NYHA), субкомпенсация.

08.02.2022, терапия соматулином по 120 мг 1 раз в 28 дней. Стабилизация.

Осложнение заболевания: ДВС от 15.05.2022. Системная воспалительная реакция от 15.05.2022 без установленного патогена. Абсцесс печени от 16.02.2022. Нижнедолевая пневмония справа от 16.05.2022 в стадии разрешения. Кандидоз ротовой полости от 20.02.2022. Консилиумом онкологов больной признан некурабельным, предложено нахождение в хосписе для онкологических больных.

С 11.05.2022 отмечено повышение температуры тела выше 38.0 °С. Самостоятельно принимал Амоксиклав + НПВС – без эффекта. Лихорадка два-три раза в день выше 38.0 °С сохранялась до момента госпитализации. Госпитализирован в клинику «НейроВита» 13.07.2022 с явлениями лихорадки неясного генеза. Жалобы при поступлении: на боли в правом подреберье, общую слабость, вялость, периодические боли в области сердца, боли в суставах. Цель госпитализации: уточнение этиологии лихорадки неясного генеза и проведение корректирующей терапии.

У пациента прогрессирующее злокачественное новообразование с признаками резистентности к проводимой терапии. Пациент соответствовал критериям включения и был введен в «Протокол персонализированной адаптивной генотерапии в лечении злокачественных опухолей»: морфологически подтвержденный диагноз злокачественного новообразования, прогрессирование на фоне проводимой стандартной терапии или резистентность к терапии, возраст 18–85 лет.

Основные фазы персонализированной адаптивной генотерапии. Все терапевтические процедуры проводились в соответствии с регламентом, описанным в работах (Брюховецкий, Богачев, 2023; Брюховецкий, Шурдов, 2024), и с клиническим протоколом лечения (см. Приложение 1). По желанию и добровольному согласию пациента в рамках программы и согласно указанному протоколу выполнен забор гемопоэтических клеток крови и костного мозга. Первоначально проводились мобилизация и сбор CD34+ ГСК. Для этого пациент начиная с 22.06.2022 получал 8 инъекций гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) подкожно, с интервалом 10–12 ч в течение 4 дней, согласно стандартной методике стимуляции кроветворения с целью мобилизации ГСК в периферическое русло. Использовалась схема Г-КСФ (филграстим): на 1–2-й день – 4.4 мкг/кг в день, на 3–4-й день – 8.8 мкг/кг в день. На 5-й день был выполнен лейкоцитоферез и проведены сбор гемопоэтических стволовых клеток в составе мононуклеаров крови, а также трепанобиопсия и забор материала костного мозга. Клеточность полученного материала была достаточной для проведения дальнейших манипуляций. Для фракции мононуклеаров крови количество CD34+ ГСК составило ~2 %. Далее биоматериал аутологичных МНК пациента очищали от эритроцитов, тромбоцитов и гранулоцитов на градиенте фикола

¹ Приложения 1–4 см. по адресу:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx30.zip>

(«БиолоТ», Россия). Очищенный лейкоконцентрат МНК криоконсервировали согласно стандартному методу криоконсервации. К клеточной суспензии добавляли диметилсульфоксид (Beijing Solarbio Science & Technology Co., Ltd, Китай) в конечной концентрации 6–10 %, смесь замораживали со скоростью 1 градус/мин до –80 °С и хранили в парах азота.

Клиническая часть терапии. С 13.07.2022 была начата иммуносупрессия метилпреднизолоном № 2, с 14.07.2022 – сиролимусом № 4. 19.07.2022 была выполнена *ex vivo* генотерапия в виде реинфузии реставрированных лекарственной субстанцией hDNA^{gr}, аутологичных ГСК. Образец криоконсервированных МНК, обогащенных CD34+ ГСК, размораживали. Непосредственно перед реинфузией была проведена модификация генома ГСК с использованием технологии, позволяющей выполнить *ex vivo* коррекцию нуклеотидных последовательностей ДНК хромосом низкодифференцированных предшественников гемопоэза. Для этого собранную лейкоцитарную массу, обогащенную CD34+ ГСК, отмывали от консерванта, ресуспендировали в физиологическом растворе и обрабатывали фрагментированной депротенизированной геномной ДНК, полученной от ~100 молодых здоровых рожениц (hDNA^{gr}), в течение 60 мин при 37 °С. Лейкоцитарную массу отмывали от препарата hDNA^{gr}. С информированного согласия пациента К. в асептических условиях блока реанимации и интенсивной терапии внутривенно введен составной аутологичный клеточный генотерапевтический препарат, содержащий 3.6×10^{10} аутологичных мононуклеаров периферической крови в 100.0 мл полиглюкина. Трансфузию проводили в центральный венозный катетер. Начало трансфузии на фоне премедикации 2.0 мл супрастина внутримышечно. Гемодинамический контроль состояния пациента в период реинфузии: АД 170/70 мм рт. ст., PS 62 уд. в минуту, SpO₂ 97 %. В целях профилактики аллергических реакций по окончании процедуры внутривенно капельно был введен дексаметазон. Через час после инфузии гемодинамический контроль: АД 115/60 мм рт. ст., PS 67 уд. в минуту, SpO₂ 97–96 %. Пациент перенес процедуру удовлетворительно. Осложнений во время процедуры не было. Копии документов, сопровождающие «Протокол персонализированной адаптивной иммунотерапии в лечении прогрессирующего рака и других злокачественных новообразований», и информированное согласие пациента приведены в Приложении 1.

Пациент. Катamnез на 28.10.2022. Больной чувствует себя удовлетворительно, дома ходил в горы, купался в горном озере. При обследовании КТ с контрастным усилением данных, указывающих на прогрессирование онкологического процесса, нет. Вызывает внимание увеличение забрюшинных лимфоузлов на 1–2 мм. Состояние расценено как стабилизация онкологического заболевания.

Пациент. Катamnез на 10.04.2023. 10 апреля 2023 г. прибыл на стационарное обследование в госпиталь. Состояние удовлетворительное. При КТ/ПЭТ обследовании грудной полости, брюшной полости и малого таза данных, указывающих на прогрессирование заболевания, не выявлено. Онкомаркеры заболевания в пределах нормы. У больного отмечается улучшение состояния по кардиологии.

С учетом наличия сердечно-сосудистой недостаточности, ИБС и стентов в сердечных сосудах последние полгода более в сердце нет (до терапии приходилось вызывать скорую медицинскую помощь до 3–4 раз в неделю). Ушла подагра, которая беспокоила последние 5 лет, компенсировался геморрой. Восстановился цвет волос (ушла седина), волосы стали густые и шелковистые, восстановился нормальный цвет лица пациента. Живет обычной нормальной жизнью. Если бы не колостома, чувствовал бы себя абсолютно здоровым человеком.

Полногеномное секвенирование. Для анализа произошедших изменений в системе клеток гемопоэза после терапии (реинфузии МНК, обогащенных реставрированными лекарственной субстанцией hDNA^{gr} аутологичными ГСК) был проведен забор клеточного материала. До мобилизации ГСК и сбора МНК были отобраны контрольные образцы костного мозга и периферической крови. После лечебной интервенции через 4, 8, 12 и 27 мес. также забиралась образцы костного мозга и периферической крови. Было проведено полноэкзомное секвенирование ДНК, выделенной из отобранных образцов клеток периферической крови. Также выполнено полноэкзомное секвенирование препарата hDNA^{gr}, используемого для реконструкции генома ГСК, фрагменты которого в совокупности составляют полный геном человека.

Из всех собранных биологических образцов была выделена геномная ДНК и оценены изменения в генах клонального гемопоэза методом секвенирования нового поколения (NGS).

Целевое парноконцевое секвенирование осуществлялось на приборе MGISEQ-G400 (MGI, Китай) с использованием мультиплексных панелей MGIEasy Exome Capture V5 Probe set, Roche KAPA HyperExome, NanodigmBio NEXome Plus Panel v1.0 или NanodigmBio NanOnco Plus Panel v3.0 (указано в графе “Тест-система” в приведенных в Приложении 2 таблицах) с целью поиска герминальных мутаций и клональных соматических мутаций в генах, ассоциированных с клональным гемопоэзом (*AKT1*, *ASXL1*, *ASXL2*, *BCOR*, *BCORL1*, *BRCC3**, *CBL*, *CTCF*, *CUX1**, *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3b*, *ETNK1**, *GNAS*, *GNB1**, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *KIT*, *KRAS*, *MPL*, *MTOR*, *MYD88*, *NLRP3**, *NRAS*, *PPM1D*, *PTEN*, *PTPN11*, *RAD21*, *RUNX1*, *SETBP1**, *SF3B1*, *SOX2*, *SRSF2*, *TET2*, *TP53*, *U2AF1*, *UBA1**). Гены, отмеченные звездочкой (*), не входят в панель NanodigmBio NanOnco Plus Panel v3.0 и в таблице отмечены индексом н/д (нет данных). Целевое покрытие составляет $\times 100$ для экзомных панелей (MGIEasy Exome Capture V5 Probe set, Roche KAPA HyperExome и NanodigmBio NEXome Plus Panel v1.0) (Schema for Exome Probesets – Exome Capture Probesets and Targeted Region, n. d.) и $\sim \times 1000$ или более для NanodigmBio NanOnco Plus Panel v3.0 (NanOnco Plus Panel v3.0, n. d.).

Для обработки результатов секвенирования использовались два биоинформатических пайплайна, первый из которых был оптимизирован для поиска герминальных мутаций, а второй – соматических.

Для герминального пайплайна применялись следующие программные инструменты: выравнивание на референсный геном человека (GRCh37) – BWA-MEM2 v2.2.1, мар-

кирование и удаление ПЦР-дубликатов – StreamMD v4.3.0, фильтрация картированных вариантов – Sambamba v1.0.1, контроль качества и метрики картирования – GATK Picard, поиск нуклеотидных замен – Google DeepVariant v1.6.1, фильтрация вариантов – BCFtools v1.20, аннотация вариантов – Ensembl Variant Effect Predictor (VEP) release 112.

Для соматического пайплайна использовались: выравнивание на референсный геном человека (GRCh37) – BWA-MEM2 v2.2.1, маркирование и удаление ПЦР-дубликатов – StreamMD v4.3.0, фильтрация картированных вариантов – Sambamba v1.0.1, контроль качества и метрики картирования – GATK v4.4.0.0, поиск нуклеотидных замен – GATK Mutect 2, фильтрация вариантов – FINGRS v1.7.2, аннотация вариантов – Ensembl Variant Effect Predictor (VEP) release 112.

Кодирующие и некодирующие варианты приведены в Приложении 2. К кодирующим отнесены варианты, расположенные в белок-кодирующей части гена, включая синонимичные варианты, а также варианты донорных и акцепторных сайтов сплайсинга. К некодирующим отнесены варианты вне белок-кодирующей части гена, не включая варианты донорных и акцепторных сайтов сплайсинга.

Оценка риска патогенности выполнялась согласно рекомендациям ACMG (SF v2.0)/МГНЦ, включая критерии: низкой популяционной частоты (частота варианта 1000 genomes и/или ExAC C NM_015338.6 < 0.01), повреждающий эффект (nonsense, frameshift), наличие информации о варианте в локус-специфических базах данных и др.

Данные о частотах вариантного аллеля (variant allele frequency, VAF) представлены в Приложении 2 и являются официальным отчетом о проведенном анализе МНИОИ им. П.А. Герцена – филиала ФГБУ «НМИЦ Радиологии» Минздрава России. Приведены данные в форме табличных значений. В обобщенной таблице по экзонам и прилегающим областям частоты вариантных аллелей визуализированы при помощи цветовой шкалы в оттенках зеленого цвета.

Анализ частот встречаемости SNP программой All-FIT (Loh et al., 2020) был проведен с настройками, выставленными по умолчанию. На вход подавались данные по выявленному на предыдущем этапе SNP и по глубине секвенирования (Приложение 2, табл. 1). Общее количество SNP составило 15. В результатах учитывались данные без удаления из расчета SNP зародышевой линии (germline), без LOH (Loss of Heterozygosity) и субклональных SNP, поскольку в клональном наборе ГСК не предполагалось наличия малигнизированных вариантов ткани. В расчетах программы All-FIT использовались только кодирующие варианты SNP, для которых были получены данные по VAF и в начальной (до обработки), и в конечной (27 мес. после обработки) точках. Таким образом, набор выбранных для расчетов SNP не отличался, и разница в результатах обусловлена только изменениями частот.

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения Statistica 8 (StatSoft, Талса, США). Достоверность различий оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Выявленные различия считались статистически значимыми при * $P_v < 0.05$.

Результаты

Общие данные по результатам полноэкзомного секвенирования. Выбор генной платформы для анализа изменения частоты встречаемости SNP

Была проведена терапия пациента К. с нейроэндокринной опухолью тонкой кишки в терминальной стадии прогрессии (4-я стадия с метастазами в печени, лимфатических узлах и левой почке) аутологичными МНК, обогащенными ГСК, обработанными препаратом hDNA[®]. Пациент К. был госпитализирован в клинику «НейроВита» с явлениями лихорадки неясного генеза с выпиской консилиума онкологов, в которой значилось, что пациент признан некурабельным. Предложено нахождение в хосписе для онкологических больных. Целью госпитализации являлось уточнение этиологии лихорадки неясного генеза и проведение коррегирующей терапии. У пациента прогрессирующее злокачественное новообразование с признаками резистентности к проводимой терапии. В ходе коррегирующей терапии установлено, что пациент соответствует критериям включения в «Протокол персонализированной адоптивной иммунотерапии в лечении прогрессирующего рака и других злокачественных новообразований», после чего он был включен в протокол.

В результате проведенной терапии состояние пациента К. резко и стабильно улучшилось. Ремиссия основного заболевания наблюдается в течение четырех лет до настоящего времени. Сделано предположение, что произошедшие позитивные изменения в клинических проявлениях основного и сопутствующих заболеваний у пациента К. связаны с воздействием на стволовые клетки крови, присутствующие в составе МНК. Мы предположили, что в результате такого воздействия произошла генетическая коррекция мутантных локусов в клетках-предшественниках гемопоэтической системы (Ruzanova et al., 2024, 2025) и восстановлен репаративно-регенеративный потенциал ГСК, что и стало причиной ярко выраженного клинического эффекта.

Известно, что терапия МНК в виде монопрепарата, или в различных сочетаниях с физическими (обработка ультрафиолетом) (Andreu et al., 1994; Greinix et al., 2000) либо гуморальными (например, IL-2) (Dummer et al., 1993; Mendelenko et al., 1997; Пальцев и др., 2000) дополнительными обработками, или использование кондиционной среды МНК (Beer et al., 2016) стимулирует противовоспалительный ответ на всех уровнях. Это связывают с факторами, высвобождающимися в результате апоптоза МНК, и активацией противовоспалительных свойств макрофагов различной локализации (Beer et al., 2016). Также трансфузия МНК стимулирует васкуляризацию, что активно изучается для случаев нарушения трофики при сахарном диабете первого типа, сердечно-сосудистых патологиях, включая ишемический инфаркт миокарда, и при инсульте. Этот эффект, как предполагается, связан с активацией эндотелиальных клеток-предшественников, присутствующих в лейкомассе (Zhang, Huang, 2012; Vahidy et al., 2016; Gurusamy et al., 2018; Yunir et al., 2021). Однако столь длительных и разнообразных клинических

эффектов, как в случае с пациентом К., для терапии МНК *per se* в проанализированной в PubMed научной литературе не обнаружено. Как уже было сказано, мы связываем восстановление регенеративного потенциала ГСК с исправлением закрепившихся в геноме ГСК соматических мутаций. Восстановленная способность ГСК эффективно репарировать повреждения различного типа в различных тканях и органах аддитивно и синергично накладывается на регенеративный потенциал, описанный для мононуклеарной массы, где эффект тканевой регенерации также может быть связан с активированными, но не реконструированными ГСК, что объясняет ограниченность видимого регенеративного спектра МНК *per se*.

Базовые элементы адаптивной клеточной терапии (генотерапии) представляют собой следующие манипуляции. Первоначально проводится мобилизация предшественников гемопоэза с использованием колониестимулирующего фактора. Терапевтическая процедура состоит из обработки МНК препаратом hDNA^{gr}, исчерпывающей отмывки клеток от привнесенной, экстраклеточной ДНК и реинфузии обработанных мононуклеаров в кровотоки пациента. Реинфузируется мононуклеарная масса в исходном состоянии за исключением того, что присутствующие в лейкоконцентрате ГСК захватили экстраклеточные фрагменты дцДНК и в клетках стартовали процессы, приводящие к генетической реконструкции.

Фрагменты ДНК препарата hDNA^{gr} в совокупности составляют полный геном человека и содержат широкую аллельную представленность здоровых аллелей по всем последовательностям генома. В результате проведенной обработки фрагменты дцДНК препарата hDNA^{gr} интернализуются в ГСК естественным природным механизмом и индуцируют развитие рекомбиногенной ситуации (Likhacheva et al., 2008; Ruzanova et al., 2024). Согласно «концепции природной реконструкции генома», происходит обмен гомологичными последовательностями экстрахромосомальных фрагментов и геномной ДНК по механизму однопочечной ассимиляции (*ss assimilation*) (Leung et al., 1997; Langston, Symington, 2005; Symington, 2014; Yakubov et al., 2024). Такой обмен приводит к замещению мутантных аллелей генома на аллели фрагментов. Если аллели фрагментов представлены «не мутантной, здоровой нормой», то произойдет корректирующее восстановление мутантного локуса. Высказанные соображения позволяют предполагать, что ярко выраженный положительный клинический эффект проведенной терапии связан в большей степени с генетической коррекцией ГСК и, как было сказано выше, в меньшей степени с активацией неизвестных факторов интегральной популяции мононуклеаров крови.

В настоящем исследовании мы выдвинули гипотезу, что в результате стохастической реконструкции генома стволовые клетки крови вернули утраченный в течение жизни и вследствие развившейся патологии регенеративный потенциал и распространили его на организм в целом.

Для проверки предположения о том, что следствием обработки ГСК в составе МНК будет коррекция SNP и появление клонов ГСК с немутантными аллелями, было проведено полноэкзомное секвенирование образцов ДНК, выделенной из МНК пациента. Предполагалось, что ис-

правление мутантных аллелей приведет к восстановлению регенеративного потенциала ГСК, что будет являться причиной выраженного клинического эффекта. В анализ были взяты только результаты секвенирования образцов МНК крови. Контрольные образцы отбирали до лечебной интервенции. Через 4, 8, 12 и 27 мес. после процедуры образцы МНК крови были отобраны повторно. Из этих проб была выделена ДНК и выполнено полноэкзомное секвенирование. В нулевой точке, в точках через 4, 8, 12 мес. использовались мультиплексные панели MGIEasy Exome Capture V5 Probe set, Roche KAPA HyperExome, Nanodigmbio NEXome Plus Panel v1.0, охватывающие весь экзом с покрытием ~100× (Schema for Exome Probesets – Exome Capture Probesets and Targeted Region, n. d.). Для верификации выявленных мутаций и более точного определения их долей на последнем этапе анализа, через 27 мес. после проведенной терапии, использовалась таргетная панель с покрытием ~1000× (Nanodigmbio NanOnco Plus Panel v3.0) (NanOnco Plus Panel v3.0, n. d.), включающая определенные в нулевой точке гены с мутантными аллелями. Дополнительно были секвенированы некодирующие области анализируемых генов, прилегающие к экзонам. Также было проведено полноэкзомное секвенирование препарата hDNA^{gr}, Roche KAPA HyperExome, используемого для реконструкции генома ГСК, фрагменты которого в совокупности составляют полный геном человека (Приложение 2, рис. 1). Использование нескольких мультиплексных панелей было техническим решением, при этом их специфичность при выбранном покрытии близка по требуемым для анализа критериям (мишень, вне-мишени, дупликации), что делает выбор приемлемым для оценки частот SNP (Schema for Exome Probesets – Exome Capture Probesets and Targeted Region, n. d.; Belova et al., 2025).

Для анализа изменений в геноме после проведенной обработки была выбрана группа генов, ассоциированных с КГНП. Выбор геномной платформы обусловлен тем, что изменения, затрагивающие указанные гены, создают молекулярную основу механизма клональной экспансии мутировавшего клона ГСК. Возникшее доминирующее положение нескольких таких клонов является причиной развития клонального гемопоэза с неопределенным потенциалом, снижающего защитные функции организма.

Предполагалось, что в системе кроветворения у больного К. произошло формирование доминирующих клонов, что могло быть отягощающим фактором основной патологии.

Было сделано предположение, что одним из критериев, отражающих возможные изменения в геноме ГСК после проведенных обработок, могла стать оценка снижения частоты SNP в выбранной группе генов. Преимущества такого выбора заключаются в простой детекции изменений в экзومه с использованием современных методов секвенирования (NGS), относительной дешевизне метода и наличии биоинформационных технологий, позволяющих анализировать именно эту группу генов. Если будут обнаружены изменения на генетическом уровне в анализируемых генах, это будет означать высокую вероятность аналогичных событий по всему геному. Следует подчеркнуть, что восстановление регенеративного потенциала ГСК, скорее всего,

будет связано не только и не столько с коррекцией в генах клонального гемопоэза, сколько с восстановлением других мутантных локусов, генетические нарушения в которых стали причиной его ослабления. Если такие генетические изменения будут обнаружены, то они могут являться и показателем усиления регенеративного потенциала гемопоэтической системы, и одновременно маркером самого факта *ex vivo* коррекции. Более того, предполагается, что аналогичные события могут происходить с другими типами стволовых клеток, присутствующими в лейкомасте и интернализирующими экстраклеточные фрагменты (МСК, эндотелиальные предшественники) (Dolgova et al., 2014), что также будет значимым фактором усиления общего регенеративного потенциала организма.

По результатам полноэкзомного секвенирования не обнаружено известных на данный момент драйверных SNP, принадлежащих генам клонального гемопоэза и определяющих развитие этого состояния (Genovese et al., 2014; Jaiswal et al., 2014; Heyde et al., 2021; Joo et al., 2023). Это означает, что у пациента не было детектируемых на уровне генетического анализа системных изменений в гемопоэзе и, на основании текущих литературных данных, не возникло доминирующих клонов ГСК с нарушенными механизмами, определяющими их регенеративный потенциал. То есть фактически у пациента клональный гемопоэз в его классическом проявлении не детектируется. Одновременно сказанное предполагает, что выраженные позитивные изменения в состоянии пациента после проведенного лечения связаны с генетическими изменениями других мутантных аллелей генов ГСК, непосредственно участвующих в указанных выше механизмах регенерации.

В ходе анализа, тем не менее, были выявлены SNP, принадлежащие общепринятым генам клонального гемопоэза, но не относящиеся к их драйверным аллелям и, по всей видимости, имеющие герминальное происхождение (100 % частота встречаемости – гомозигота; ~50 % частота встречаемости – гетерозигота) (см. Приложение 2, табл. 1).

Первичный анализ показал, что у части выявленных герминальных SNP частота встречаемости в конечной точке наблюдения по сравнению с нулевой значительно падает. Возможно, в процессе взаимодействия экстраклеточных фрагментов ДНК и стволовой клетки крови в геноме части ГСК произошло замещение части SNP, влияющих на регенеративный потенциал ГСК, на альтернативные аллели, единственным источником которых мог быть препарат hDNA^{gr}, т. е. обнаружена соматическая коррекция. В результате исправления мутантных SNP возникла новая клональная линия ГСК, отличная от линии, существовавшей до начала лечения.

Важно, что воздействие было оказано на аллели генов ГСК с герминальными SNP. Наличие герминальных SNP предполагает, что все клетки организма имеют только такой генотип и нет других стволовых клеток крови, которые могли бы нести альтернативный. Этот факт снимает вопросы, связанные с возможной активацией молчащих с момента эмбрионального развития ГСК, активированных обработками. То есть, если появились новые SNP (или исчезли существующие), то такие изменения могли прои-

зойти только в постгерминальном периоде и являются следствием соматических процессов.

Требовалось найти подходы, доказывающие достоверность таких изменений, где основным могла быть оценка частоты встречаемости выявленных SNP.

Анализ частот встречаемости SNP

Для оценки частот встречаемости SNP было выбрано два подхода: сравнительный анализ изменения частот SNP выбранных генов в нулевой и конечной (27 мес.) точках наблюдения и алгоритм All-FIT (Loh et al., 2020) (см. Приложение 2, табл. 2).

Анализ изменения частот SNP выбранных генов в нулевой и конечной (27 мес.) точках наблюдения. В этой части работы, чтобы доказать факт замещения SNP на альтернативные аллели, был использован следующий подход. Суть его заключалась в том, что анализировались изменения частот в экзонах генов, имеющих гетерозиготное состояние. Результаты первоначально нормировались на имеющиеся литературные данные, полученные в различных лабораториях в разное время и на разных NGS платформах. На втором этапе была определена средняя ошибка оценки распределения частот в экзонах и прилегающих некодирующих областях гетерозиготных генов для данных исключительно настоящего исследования («внутренняя» ошибка эксперимента), где при анализе использовались четыре различные NGS платформы (см. Приложение 2, табл. 3).

Для сравнительного анализа были отобраны шесть генов (*ASXL1*, *RAD21*, *DNMT1*, *SF3B1-1*, *SF3B1-2*, *SF3B1-3*), у которых частота встречаемости SNP составляла ~40–60 %, т. е. эти аллели находились в гетерозиготе. Гомозиготные SNP во всех точках анализа демонстрировали частоту близкую к 100 %. Проведенное сравнение свидетельствует, что снижение частоты встречаемости SNP трех выбранных генов, *ASXL1*, *DNMT1*, *SF3B1-2*, в конечной точке наблюдения достоверно в рамках выбранного критерия (рис. 1) (логика и основные этапы анализа представлены в Приложении 3). По-видимому, обнаруженное снижение связано с генетической коррекцией SNP, произошедшей в результате гомологичного обмена мутантной последовательности генома на немутантный аллель, присутствующий во фрагментах экстраклеточной ДНК препарата hDNA^{gr}.

Алгоритм All-FIT (Allele-Frequency-based Imputation of Tumor Purity – оценка чистоты опухоли на основе частоты аллелей). Во втором подходе была использована биоинформационная платформа All-FIT, позволяющая методом взвешенных наименьших квадратов через итерационные шаги на основе частот аллелей вариантов (Variant Allele Frequency, VAF) SNP, обнаруженных в данных высокопроизводительного целевого клинического секвенирования, и глубины секвенирования каждого из выбранных аллелей определить в операционном образце опухоли долю опухолевых клеток и сопутствующей соматической ткани (клеток) с соответствующим доверительным интервалом (CI). С помощью смоделированных и клинических данных была продемонстрирована точность и улучшенная производительность All-FIT по сравнению

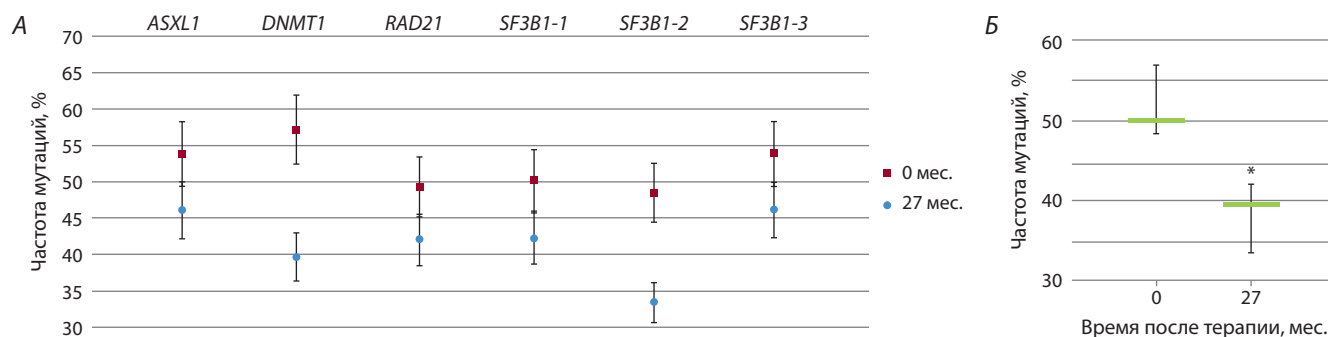


Рис. 1. Снижение частоты SNP анализируемых генов в конечной точке наблюдения через 27 мес. после проведенного вмешательства.

А – графики перекрытия значений суммарной процентной ошибки для значений частот встречаемости SNP гетерозиготных генов в нулевой и конечной точках наблюдения; Б – изменения частот встречаемости SNP выбранных гетерозиготных генов в нулевой и конечной точках наблюдения, значения которых в нулевой точке колеблются вокруг 50 % (три SNP аллеля). Сравниваются медианы частот с учетом суммарной процентной ошибки значений, полученных при использовании разных мультиплексных панелей. * Отличия достоверны, $P_v < 0.05$, U-критерий Манна–Уитни.

с аналогичными ведущими вычислительными подходами. Программа была апробирована на конкретных клинических образцах и показала высокую предсказательную эффективность (Loh et al., 2020).

Следуя идее целевого назначения платформы, с использованием предлагаемого алгоритма можно определить соотношение доли клеток, несущих разный набор SNP, по анализу изменения частот (VAF) небольшого количества доступных для анализа SNP и глубины секвенирования, отражающей достоверность получаемых оценок частот. Снижение частоты анализируемых аллелей от установленных алгоритмом маркерных (якорных) частот будет свидетельствовать об уменьшении количества клеток, несущих обобщенный набор выбранных SNP, что полностью соответствует задачам нашего исследования.

В работе были проанализированы частоты SNP генов, относящихся к группе клонального гемопоэза, поскольку исходно было высказано предположение о наличии КГНП. Согласно полученным результатам, у пациента клонального гемопоэза не наблюдается. Тем не менее полученное ограниченное количество доступных для анализа частот (VAF) SNP (с данными по глубине секвенирования), относящихся только к генам выбранной группы, позволяет провести All-FIT анализ, который будет указывать на достоверное изменение частот встречаемости контролируемых SNP, если таковое будет обнаружено.

Гемопоэтические стволовые клетки в составе МНК крови были обработаны препаратом hDNA^{gr}, содержащим смесь из ~100 образцов различных ДНК, включающих, как ранее сказано, всю совокупность последовательностей генома человека (100×). На основании концепции природной реконструкции генома и ее экспериментального подтверждения фрагменты ДНК, интернализированные в ГСК, стохастически и гомологично будут рекомбинировать с доступными участками гомологии геномной ДНК. Сделано предположение, что, если будет обнаружено снижение частот выявленных SNP, то это может свидетельствовать о замене части SNP, в том числе за пределами исследуемого набора SNP, на альтернативные аллели вследствие указан-

ного гомологичного обмена. Произшедшая коррекция привела к изменению соотношения VAF наблюдаемых SNP, которое, как предполагается, можно будет обнаружить с помощью расчета программой All-FIT. Существует наиболее обоснованный источник такой коррекции – это фрагменты экстраклеточной геномной дцДНК, которые захватили ГСК, находящиеся в массе МНК. Результаты проведенного сравнения представлены на рис. 2.

Установлено, что в нулевой точке чистота, т. е. доля клеток, несущих исходный набор SNP, составила 0.99, доверительный интервал (CI) варьировал от 92 до 99 %, что фактически означает наличие одного «клона». При этом через 27 мес. наблюдения чистота составила уже 0.88, а доверительный интервал изменялся от 84 до 95 %. Это указывает на то, что появилось около 12 % (CI = 5–16 %) клеток с другим набором аллелей SNP, причем в смеси клеток, гетерозиготных по контролируемому SNP, возникла клональная линия клеток, несущая гомозиготу без SNP. Наиболее вероятным объяснением полученных значений может быть произошедшее замещение части аллелей SNP альтернативными аллелями, находящимися в препарате hDNA^{gr}, закрепившимися в части линий ГСК и имеющими (повышенный) регенеративный потенциал.

Полученные данные двух независимых подходов позволяют с большей уверенностью говорить о том, что провозглашенный механизм взаимодействия экстраклеточных фрагментов дцДНК и ДНК хромосом объективно существует. То есть предполагаемая концепция природной реконструкции генома имеет право на существование.

Гипотетический сценарий происходящих событий при реинфузии пациенту К. реконструированных ГСК приведен в Приложении 4.

Обсуждение

В целом полученные данные находятся в согласии с предложенной концепцией реконструкции генома природным механизмом (Ruzanova et al., 2024, 2025; Yakubov et al., 2024). Главным вопросом всего исследования является вопрос возможности негомологичной интеграции в геном

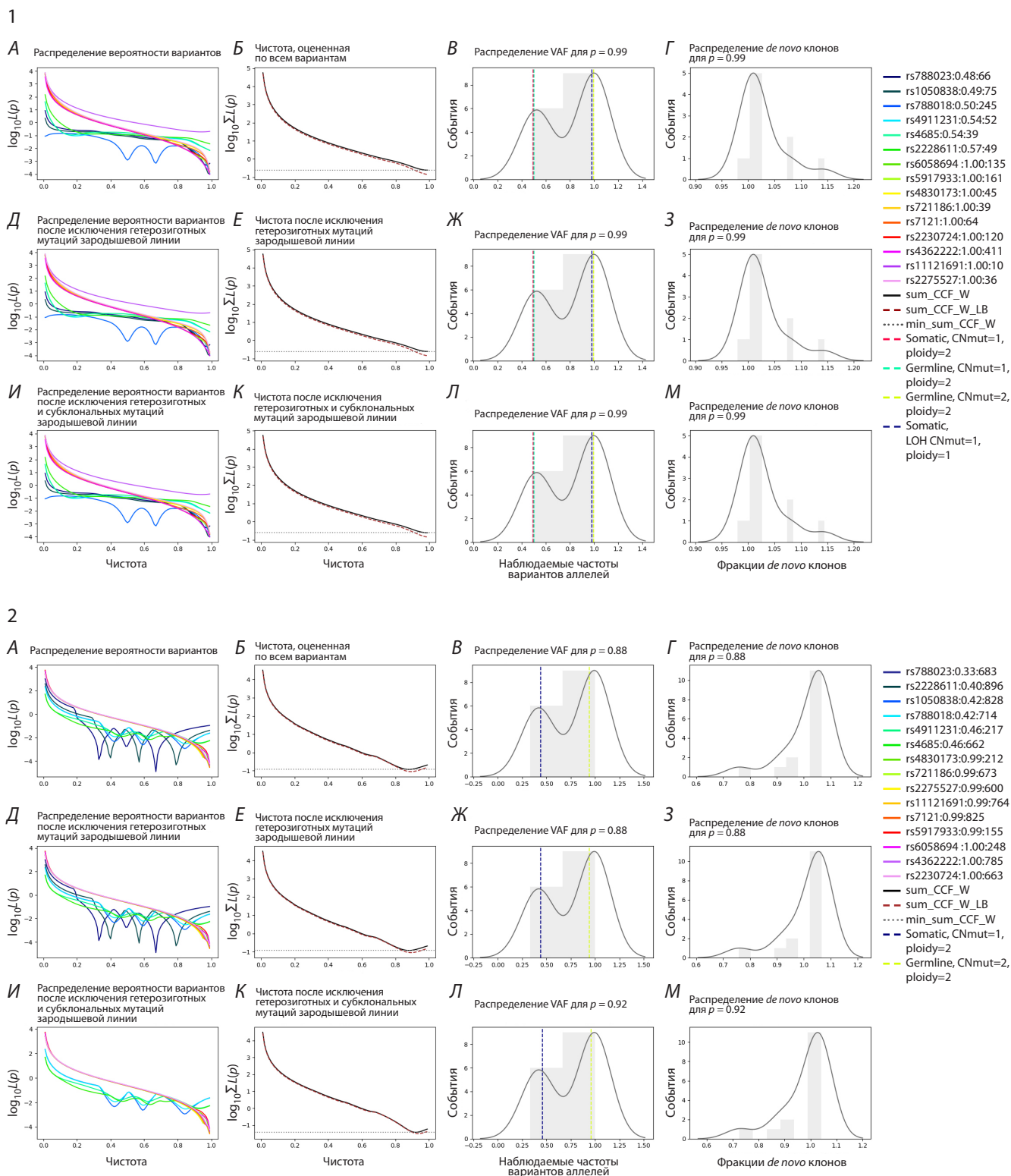


Рис. 2. Представление результатов All-FIT анализа для обнаруженных вариантов генов клонального гемопоэза (Loh et al., 2020). Анализировались частоты аллелей SNP в экзонах генов клонального гемопоэза, полученные в нулевой точке (1) и в конечной точке (2) наблюдения (27 мес. после проведенной терапии).

A – вклад каждого варианта в сумму вероятностей; B – сумма вероятностей по всем вариантам, а также кривая 2σ (коричневая штриховая линия). Точки пересечения кривой 2σ и линии, касательной к логарифму суммы вероятностей при ее минимуме (серая штриховая линия), указывают доверительный интервал (CI) вокруг расчетного значения чистоты p . B – распределение наблюдаемых частот аллелей. Штриховые линии представляют ожидаемые частоты аллелей включенных мутационных моделей для предполагаемого p . Г – распределение доли клонов для предполагаемого p ; Д–З – результаты после исключения нефилтрированных гетерозиготных вариантов зародышевой линии; И–М – результаты после исключения субклональных соматических вариантов. В условных обозначениях указаны мутировавшие гены и VAF каждого обнаруженного варианта.

и точности гомологичной интеграции. От ответа на этот вопрос зависит клиническая применимость концепции.

Несомненно, в ядре происходят определенные события, в результате которых возможны репаративно-рекомбинационные отношения между внехромосомными фрагментами экстраклеточной дцДНК и ДНК хромосом. Об этом свидетельствуют следующие данные.

Ранее мы показали, что при интернализации в ГСК фрагментов дцДНК возрастает количество теломерной ДНК, что может быть сопряжено как с истинной интеграцией теломерных повторов в геном, так и с активностью механизма альтернативного увеличения теломерной ДНК (Ruzanova et al., 2025). Кроме того, появляются кольцевые формы ДНК, которые состоят из замыкающихся в кольцо внехромосомных экстраклеточных фрагментов, формируют множественные ассоциаты с нитями ДНК хромосом, сохраняются до метафаз и детектируются FISH или прямым анализом распределения флуоресцентно меченого ДНК-зонда (Ruzanova et al., 2025).

Результаты настоящего исследования демонстрируют, что, по-видимому, происходит восстановление мутантных аллелей генов стволовых клеток гемопоэтической системы, что, предположительно, отражает основную идею концепции, а именно стохастическое замещение различных участков ДНК хромосом гомологиями из внехромосомных экстраклеточных фрагментов, интернализированных в ГСК. Важным обстоятельством в этом вопросе является тот факт, что на основании данных полногеномного секвенирования, выполненного в работах (Oshikhmina et al., 2026), не обнаруживается негомологичной интеграции зонда, а значит, более вероятен именно вариант гомологичного аллельного замещения.

Витальные тесты свидетельствуют, что процедура сингенной реинфузии ГСК мышей и крыс, обработанных гетерологичной человеческой ДНК (hDNA^{gr}), не вызывает сиюминутных и отдаленных (один год) патологических последствий. Это также предполагает отсутствие незаконной интеграции в геном в генетически активных локусах хромосом экстрахромосомальной чужеродной ДНК и, как следствие, отсутствие генетических аномалий, выраженных в немедленном функциональном ответе (Ruzanova et al., 2025).

Важнейшим результатом проделанного исследования можно считать данные клинического случая с пациентом К., у которого произошла длительная стабилизация онкологического процесса. Помимо стабилизации прогрессии основного заболевания, прослеживаются явные позитивные процессы в кардиоваскулярной системе. Феномен роста новых волос свидетельствует о процессе миграции стволовых клеток и их фиксации в волосяных фолликулах. Но главным в этом клиническом случае является детекция изменений на генетическом уровне мутантных гетерозиготных аллелей герминального происхождения. ***То есть нами обнаружена соматическая коррекция в стволовых клетках крови, произошедшая естественным путем в результате захвата гемопоэтическими предшественниками экстраклеточных дцДНК фрагментов.***

Основным критическим вопросом всей технологии (в том числе для приведенного примера) был вопрос воз-

можности длительного (до 4, 9, 12 и 27 мес.) сохранения экстраклеточных фрагментов ДНК, исходно попавших в ГСК, в их потомках, с возможной детекцией этих ДНК (SNP) в клетках лейкомазсы при полноэкзомном секвенировании по прошествии времени. Мы полагаем, что такой исход, а именно длительное сохранение внехромосомной экстраклеточной ДНК в потомках кровяных клеток, которое может давать артефакт присутствия, маловероятен. Данные наших исследований свидетельствуют, что активированные препаратом дцДНК ГСК постоянно делятся, по крайней мере до 15 сут наблюдения (Ruzanova et al., 2024). Через 8 мес. клетки крови, которые потенциально могли содержать экстраклеточные фрагменты, доставшиеся им от материнской ГСК, способной захватить до 1 % от гаплоидного генома (Dolgoва et al., 2013, 2016; Potter et al., 2024), или будут элиминированы по признаку продолжительности жизни, или будут составлять исчезающе малую долю от всех клеток крови, так что детекция этих фрагментов будет невозможна по количественным соображениям. Более того, в нашем исследовании (статья находится в редакции) достоверно показано, что в клетках через ~22 дня не остается экстраклеточного ДНК материала. То есть результаты полноэкзомного секвенирования образцов МНК пациента К. через 4, 8, 12 и 27 мес. после проведенной терапии отражают реальную картину изменений в геноме и появления генетически реконструированных, обновленных клонов гемопоэтических стволовых клеток.

Интересен факт, что гомозиготные герминальные аллели генов не претерпели корректирующих изменений. Это предполагает, что они находятся под давлением отбора. Коррекции подверглись гены, на которые отбор не действует и которые находятся в гетерозиготе, при этом достоверно и значительно увеличился регенеративный потенциал терапии. Появление во внутреннем пространстве ГСК экстраклеточных фрагментов сопровождается гомологичной коррекцией и одновременно инициирует деление клеток (Potter et al., 2024; Ruzanova et al., 2024). Причем делятся предшественники как симметрично, так и несимметрично (Potter et al., 2024; Ruzanova et al., 2024). Их потомки, появившиеся в результате как симметричного, так и несимметричного деления, циркулируют в периферической крови. Можно предположить, что коррекции подверглись гены, отвечающие за регенерацию тканей, вследствие чего был восстановлен исходный регенеративный потенциал ГСК, и что именно за счет этих клеток, получивших новый «статус», произошла масштабная регенерация в организме пациента К.

Заключение

В совокупности можно считать, что технология природной реконструкции генома с использованием терапевтической hDNA^{gr} (патент № 2855434 от 02.02.2026) может быть использована при лечении пациентов с болезнями цивилизации и возрастных пациентов без выраженных патологий. Тем не менее требуются серьезные экспериментальные исследования всех тонкостей молекулярных и клеточных процессов, которые запускаются при взаимодействии стволовой клетки, в частности ГСК, и фрагментов экстраклеточной ДНК.

Список литературы / References

- Брюховецкий А.С., Богачев С.С. На переднем крае борьбы с клональным гемопоэзом при болезнях цивилизации: от трансплантации костного мозга к персонализированной геноориентированной и протеом-основанной реституции костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток. *Национальная ассоциация ученых*. 2023;97-2:26-45. doi 10.31618/NAS.2413-5291.2023.2.97.845
[Bryukhovetskiy A.S., Bogachev S.S. At the front edge of the fight against clonal hematopoiesis in diseases of civilization: from bone marrow transplantation to personalized gene-oriented and proteome-based restitution of bone marrow and hemopoietic stem cells. *National Association of Scientists*. 2023;97(2):26-45. doi 10.31618/nas.2413-5291.2023.2.97.845 (in Russian)]
- Брюховецкий А.С., Шурдов М.А. Старение и антиэйджинг: медико-биологические подходы к увеличению продолжительности жизни и активному долголетию. *Ridero*, 2024
[Bryukhovetskiy A.S., Shurdov M.A. Aging and Anti-aging: Biomedical Approaches to Increasing Life Expectancy and Active Longevity. *Ridero*, 2024 (in Russian)]
- Пальцев А.В., Овечкин А.В., Захарова Н.Ф., Ровина А.К., Леплина О.Ю., Шевела Е.Я., Останин А.А., Черных Е.Р. Цитокины в лечении генерализованной хирургической инфекции. *Анестезиология и реаниматология*. 2000;2:27-30
[Pal'tsev A., Ovechkin A., Zakharova N., Rovina A., Leplina O., Shevela E., Ostanin A., Chernykh E. Cytokines in the treatment of a generalized surgical infection. *Anesteziol Reanimatol*. 2000;2:27-30 (in Russian)]
- Петинати Н.А., Дризе Н.И. Клональное кроветворение и его роль в развитии гематологических заболеваний. *Гематология и трансфузиология*. 2021;66(4):580-592. doi 10.35754/0234-5730-2021-66-4-580-592
[Petinati N.A., Drize N.J. Clonal hematopoiesis and its role in the development of hematological diseases. *Gematologiya i Transfuziologiya = Russ J Hematol Transfusiol*. 2021;66(4):580-592. doi 10.35754/0234-5730-2021-66-4-580-592 (in Russian)]
- Шамаль Н.В. Соматические мутации в природе. Институт радиобиологии НАН Беларуси, 2017. URL: <https://www.irb.basnet.by/ru/somaticheskie-mutacii-v-prirode/>
[Shamal N. Somatic Mutations in Nature [www document]. 2017. Available at: <https://www.irb.basnet.by/ru/somaticheskie-mutacii-v-prirode/> (in Russian)]
- Ainciburu M., Ezponda T., Berastegui N., Alfonso-Pierola A., Vilas-Zornoza A., Martin-Uriz P.S., Alignani D., ... Diez-Campelo M., Valcarcel D., Hernaez M., Romero J.P., Prosper F. Uncovering perturbations in human hematopoiesis associated with healthy aging and myeloid malignancies at single-cell resolution. *eLife*. 2023;12:e79363. doi 10.7554/eLife.79363
- Andreu G., Leon A., Heshmati F., Tod M., Menkes C.J., Baudelot J., Laroche L. Extracorporeal photochemotherapy: evaluation of two techniques and use in connective tissue disorders. *Transfus Sci*. 1994;15(4):443-454. doi 10.1016/0955-3886(94)90178-3
- Anker P., Mulcahy H., Chen X.Q., Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev*. 1999;18(1):65-73. doi 10.1023/A:1006260319913
- Beer L., Mildner M., Gyöngyösi M., Ankersmit H.J. Peripheral blood mononuclear cell secretome for tissue repair. *Apoptosis*. 2016;21(12):1336-1353. doi 10.1007/S10495-016-1292-8
- Belova V., Vasiliadis I., Repinskaia Z., Samitova A., Shmitko A., Poni-karovskaya N., Suchalko O., Cheranev V., Shatalov P., Shegai P., Kaprin A., Rebrikov D., Korostin D. Comparative evaluation of four exome enrichment solutions in 2024: Agilent, Roche, Vazyme and Nanodigmbio. *BMC Genomics*. 2025;26(1):76. doi 10.1186/S12864-024-11196-Z
- Biermann M., Reya T. Hematopoietic stem cells and regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2022;14(8):a040774. doi 10.1101/CSHPERSPECT.A040774
- Bonnet D. Biology of human bone marrow stem cells. *Clin Exp Med*. 2003;3(3):140-149. doi 10.1007/S10238-003-0017-9
- Brown C., McKee C., Bakshi S., Walker K., Hakman E., Halassy S., Svinarich D., Dodds R., Govind C.K., Chaudhry G.R. Mesenchymal stem cells: cell therapy and regeneration potential. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019;13(9):1738-1755. doi 10.1002/TERM.2914
- Cagan A., Baez-Ortega A., Brzozowska N., Abascal F., Coorens T.H.H., Sanders M.A., Lawson A.R.J., ... Gerstung M., Campbell P.J., Murchison E.P., Stratton M.R., Martincorena I. Somatic mutation rates scale with lifespan across mammals. *Nature*. 2022;604(7906):517-524. doi 10.1038/s41586-022-04618-z
- Carrelha J., Meng Y., Kettle L.M., Luis T.C., Norfo R., Alcolea V., Boukarabila H., ... Lord A.M., Sanjuan-Pla A., Woll P.S., Nerlov C., Jacobsen S.E.W. Hierarchically related lineage-restricted fates of multipotent haematopoietic stem cells. *Nature*. 2018;554(7690):106-111. doi 10.1038/NATURE25455
- D'Adda Di Fagnana F., Reaper P.M., Clay-Farrace L., Fiegler H., Carr P., Von Zglinicki T., Saretzki G., Carter N.P., Jackson S.P. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*. 2003;426(6963):194-198. doi 10.1038/NATURE02118
- Dolgova E.V., Efremov Y.R., Orishchenko K.E., Andrushkevich O.M., Alyamkina E.A., Proskurina A.S., Bayborodin S.I., ... Omigov V.V., Minkevich A.M., Rogachev V.A., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Delivery and processing of exogenous double-stranded DNA in mouse CD34+ hematopoietic progenitor cells and their cell cycle changes upon combined treatment with cyclophosphamide and double-stranded DNA. *Gene*. 2013;528(2):74-83. doi 10.1016/j.gene.2013.06.058
- Dolgova E.V., Alyamkina E.A., Efremov Y.R., Nikolin V.P., Popova N.A., Tyrinova T.V., Kozel A.V., ... Mayorov V.I., Shurdov M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Identification of cancer stem cells and a strategy for their elimination. *Cancer Biol Ther*. 2014;15(10):1378-1394. doi 10.4161/cbt.29854
- Dolgova E.V., Potter E.A., Proskurina A.S., Minkevich A.M., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Efremov Y.R., Bayborodin S.I., Nikolin V.P., Popova N.A., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Properties of internalization factors contributing to the uptake of extracellular DNA into tumor-initiating stem cells of mouse Krebs-2 cell line. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7(1):76. doi 10.1186/s13287-016-0338-8
- Doulatov S., Notta F., Laurenti E., Dick J.E. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*. 2012;10(2):120-136. doi 10.1016/j.stem.2012.01.006
- Drize N., Keller J., Chertko J. Local clonal analysis of the hematopoietic system shows that multiple small short-living clones maintain life-long hematopoiesis in reconstituted mice. *Blood*. 1996;88(8):2927-2938. doi 10.1182/blood.V88.8.2927.bloodjournal8882927
- Dummer R., Becker J.C., Eilles C., Schafer E., Borner W., Burg G. T cells migrate to tumour sites after extracorporeal interleukin 2 stimulation and reinfusion in a patient with metastatic melanoma. *Br J Dermatol*. 1993;128(4):399-403. doi 10.1111/J.1365-2133.1993.TB00198.X
- Duncavage E.J., Tandon B. The utility of next-generation sequencing in diagnosis and monitoring of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Int J Lab Hematol*. 2015;37(S1):115-121. doi 10.1111/IJLH.12361
- English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol*. 2013;91(1):19-26. doi 10.1038/ICB.2012.56
- Fabre M.A., de Almeida J.G., Fiorillo E., Mitchell E., Damaskou A., Rak J., Orrù V., ... Campbell P.J., McKinney E.F., Cucca F., Gerstung M., Vassiliou G.S. The longitudinal dynamics and natural history of clonal haematopoiesis. *Nature*. 2022;606(7913):335-342. doi 10.1038/S41586-022-04785-Z
- Fan X.L., Zhang Y., Li X., Fu Q.L. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(14):2771-2794. doi 10.1007/S00018-020-03454-6
- Fast E.M., Sporrij A., Manning M., Rocha E.L., Yang S., Zhou Y., Guo J., Baryawno N., Barkas N., Scadden D., Camargo F., Zon L.I. External signals regulate continuous transcriptional states in hematopoietic stem cells. *eLife*. 2021;10:e66512. doi 10.7554/eLife.66512
- García-Olmo D.C., Picazo M.G., García-Olmo D. Transformation of non-tumor host cells during tumor progression: theories and evidence. *Expert Opin Biol Ther*. 2012;12(Suppl.1):S199-207. doi 10.1517/14712598.2012.681370

- Geiger H., De Haan G., Florian M.C. The ageing haematopoietic stem cell compartment. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(5):376-389. doi 10.1038/NRI3433
- Genovese G., Kähler A.K., Handsaker R.E., Lindberg J., Rose S.A., Bakhoum S.F., Chambert K., ... Sullivan P.F., Sklar P., Grönberg H., Hultman C.M., McCarroll S.A. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2477-2487. doi 10.1056/NEJMoa1409405
- Goyal S., Zandstra P.W. Stem cells: chasing blood. *Nature.* 2015; 518(7540):488-490. doi 10.1038/nature14203
- Greinix H., Volc-Platzer B., Kalhs P., Fischer G., Rosenmayr A., Keil F., Hönigsmann H., Knobler R. Extracorporeal photochemotherapy in the treatment of severe steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a pilot study. *Blood.* 2000;96(7):2426-2431. doi 10.1182/blood.V96.7.2426
- Gugliandolo A., Bramanti P., Mazzon E. Mesenchymal stem cells: a potential therapeutic approach for amyotrophic lateral sclerosis? *Stem Cells Int.* 2019;2019:3675627. doi 10.1155/2019/3675627
- Gurusamy N., Alsayari A., Rajasingh S., Rajasingh J. Adult stem cells for regenerative therapy. In: Teplow D.B. (Ed.) *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* Vol. 160. Academic Press, 2018;160:1-22. doi 10.1016/bs.pmbts.2018.07.009
- Heuser M., Thol F., Ganser A. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential. *Dtsch Arztebl Int.* 2016;113(18):317-322. doi 10.3238/arztebl.2016.0317
- Heyde A., Rohde D., McAlpine C.S., Zhang S., Hoyer F.F., Gerold J.M., Cheek D., ... Craig M., Swirski F.K., Nahrendorf M., Nowak M.A., Naxerova K. Increased stem cell proliferation in atherosclerosis accelerates clonal hematopoiesis. *Cell.* 2021;184(5):1348-1361.e22. doi 10.1016/j.cell.2021.01.049
- Islam M.N., Das S.R., Emin M.T., Wei M., Sun L., Westphalen K., Rowlands D.J., Quadri S.K., Bhattacharya S., Bhattacharya J. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat Med.* 2012;18(5):759-765. doi 10.1038/NM.2736
- Jackson M.V., Morrison T.J., Doherty D.F., McAuley D.F., Matthay M.A., Kissenpfennig A., O’Kane C.M., Krasnodembskaya A.D. Mitochondrial transfer via tunneling nanotubes is an important mechanism by which mesenchymal stem cells enhance macrophage phagocytosis in the in vitro and in vivo models of ARDS. *Stem Cells.* 2016;34(8):2210-2223. doi 10.1002/stem.2372
- Jagannathan-Bogdan M., Zon L.I. Hematopoiesis. *Development.* 2013; 140(12):2463-2467. doi 10.1242/dev.083147
- Jahr S., Hentze H., Englisch S., Hardt D., Fackelmayer F.O., Hesch R.D., Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001;61(4):1659-1665
- Jaiswal S., Fontanillas P., Flannick J., Manning A., Grauman P.V., Mar B.G., Lindsley R.C., ... Atzmon G., Wilson J.G., Neuberger D., Altshuler D., Ebert B.L. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2488-2498. doi 10.1056/NEJMoa1408617
- Joo L.J., Bradley C.C., Lin S.H., Scheet P.A., Nead K.T. Causes of clonal hematopoiesis: a review. *Curr Oncol Rep.* 2023;25(3):211-220. doi 10.1007/S11912-023-01362-Z
- Laktionov P.P., Tamkovich S.N., Rykova E.Y., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P., Sumarokov S.V., Kolomiets S.A., Sevostianova N.V., Vlassov V.V. Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2004;23(6-7):879-883. doi 10.1081/NCN-200026035
- Langston L.D., Symington L.S. Opposing roles for DNA structure-specific proteins Rad1, Msh2, Msh3, and Sgs1 in yeast gene targeting. *EMBO J.* 2005;24(12):2214-2223. doi 10.1038/sj.emboj.7600698
- Lee J.Y., Hong S.H. Hematopoietic stem cells and their roles in tissue regeneration. *Int J Stem Cells.* 2020;13(1):1-12. doi 10.15283/IJSC19127
- Leung W.Y., Malkova A., Haber J.E. Gene targeting by linear duplex DNA frequently occurs by assimilation of a single strand that is subject to preferential mismatch correction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(13):6851-6856. doi 10.1073/pnas.94.13.6851
- Li L., Zhang S., Ge C., Ji L., Lv Y., Zhao C., Xu L., Zhang J., Song C., Chen J., Wei W., Fang Y., Yuan N., Wang J. HSCs transdifferentiate primarily to pneumocytes in radiation-induced lung damage repair. *Aging (Albany NY).* 2021;13(6):8335-8354. doi 10.18632/aging.202644
- Li N., Zhang L., Li H., Fang B. Human CD34+ cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor ameliorate radiation-induced liver damage in mice. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1(3):22. doi 10.1186/SCRT22
- Li X., Zhang Y., Yeung S.C., Liang Y., Liang X., Ding Y., Ip M.S.M., Tse H.F., Mak J.C.W., Lian Q. Mitochondrial transfer of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells to airway epithelial cells attenuates cigarette smoke-induced damage. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014;51(3):455-465. doi 10.1165/rcmb.2013-0529OC
- Liao F.L., Tan L., Liu H., Wang J.J., Ma X.T., Zhao B., Chen Y., Bihl J., Yang Y., Chen R.L. Hematopoietic stem cell-derived exosomes promote hematopoietic differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro via inhibiting the miR126/Notch1 pathway. *Acta Pharmacol Sin.* 2018;39(4):552-560. doi 10.1038/aps.2017.130
- Likhacheva A.S., Rogachev V.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Shilov A.G., Sebeleva T.E., Strunkin D.N., Chernykh E.R., Gel’fagat E.L., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Involvement of exogenous DNA in the molecular processes in somatic cell. *Informatsionny Vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders.* 2008;12(3):426-473 (in Russian)
- Loh J.W., Guccione C., Di Clemente F., Riedlinger G., Ganesan S., Khiabani H. All-FIT: allele-frequency-based imputation of tumor purity from high-depth sequencing data. *Bioinformatics.* 2020; 36(7):2173-2180. doi 10.1093/bioinformatics/btz865
- Maacha S., Sidahmed H., Jacob S., Gentilcore G., Calzone R., Grivel J.C., Cugno C. Paracrine mechanisms of mesenchymal stromal cells in angiogenesis. *Stem Cells Int.* 2020;2020:4356359. doi 10.1155/2020/4356359
- Maizels N., Davis L. Initiation of homologous recombination at DNA nicks. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(14):6962-6973. doi 10.1093/nar/gky588
- Mendelenko M.M., Kravtsov S.A., Rodionov E.P. Clinical effectiveness of immunotherapy with extracorporeally activated blood mononuclear cells for complex treatment of sepsis. *Russ J Immunol.* 1997; 2(3-4):191-198
- Mendes Filho D., Ribeiro P.D.C., Oliveira L.F., De Paula D.R.M., Capuano V., De Assunção T.S.F., Da Silva V.J.D. Therapy with mesenchymal stem cells in Parkinson disease. *Neurologist.* 2018;23(4): 141-147. doi 10.1097/NRL.0000000000001188
- Müller A.M., Huppertz S., Henschler R. Hematopoietic stem cells in regenerative medicine: astray or on the path? *Transfus Med Hemother.* 2016;43(4):247-254. doi 10.1159/000447748
- NanOnco Plus Panel v3.0 n.d. <https://nanodigmbo.com/Solid-Tumor/819.html>
- Oshikhmina S.G., Ruzanova V.S., Ritter G.S., Dolgova E.V., Kirikov S.S., Levites E.V., Efremov Y.R., ... Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Proskurina A.S., Bogachev S.S. Concept of natural genome reconstruction. Part 4. Integration of extracellular double-stranded DNA fragments into the genome of hematopoietic stem cells and the formation of extrachromosomal intermediates. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(2):163-180. doi 10.18699/vjgb-26-18
- Petrova D.D., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Ritter G.S., Ruzanova V.S., Efremov Y.R., Potter E.A., Kirikov S.S., Levites E.V., Taranov O.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. The new general biological property of stem-like tumor cells. Part II: Surface molecules, which belongs to distinctive groups with particular functions, form a unique pattern characteristic of a certain type of tumor stem-like cells. *Int J Mol Sci.* 2022;23(24): 15800. doi 10.3390/IJMS232415800/S1
- Phillips R. Hematopoietic stem cells: concepts, assays, and controversies. *Semin Immunol.* 1991;3(6):337-347
- Pinho S., Frenette P.S. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(5):303-320. doi 10.1038/s41580-019-0103-9






- Potter E.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Ruzanova V.S., Efremov Y.R., Kirikovich S.S., Oshikhmina S.G., ... Grivtsova L.U., Kolchanov N.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Stimulation of mouse hematopoietic stem cells by angiogenin and DNA preparations. *Braz J Med Biol Res.* 2024;57:e13072. doi 10.1590/1414-431X2024e13072
- Ritter G.S., Dolgova E.V., Petrova D.D., Efremov Y.R., Proskurina A.S., Potter E.A., Ruzanova V.S., Kirikovich S.S., Levites E.V., Taranov O.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. The new general biological property of stem-like tumor cells. Part I. Peculiarities of the process of the double-stranded DNA fragments internalization into stem-like tumor cells. *Front Genet.* 2022;13:954395. doi 10.3389/fgene.2022.954395
- Ruzanova V.S., Oshikhmina S.G., Proskurina A.S., Ritter G.S., Kirikovich S.S., Levites E.V., Efremov Y.R., ... Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Dolgova E.V., Bogachev S.S. A concept of natural genome reconstruction. Part 2. Effect of extracellular double-stranded DNA fragments on hematopoietic stem cells. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov J Genet Breed.* 2024;28(8):993-1007. doi 10.18699/vjgb-24-106
- Ruzanova V.S., Oshikhmina S.G., Ritter G.S., Dolgova E.V., Kirikovich S.S., Levites E.V., Efremov Y.R., ... Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Proskurina A.S., Bogachev S.S. Concept of natural genome reconstruction. Part 3. Analysis of changes in the amount of telomeric DNA in colony cells as a new amplified feature that arose during the processing of hematopoietic bone marrow stem cells. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(4):479-495. doi 10.18699/vjgb-25-52
- Schema for Exome Probesets – Exome Capture Probesets and Targeted Region [www document]. URL https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables?db=hg38&hgta_group=map&hgta_track=exomeProbesets&hgta_table=KAPA_HyperExome_hg38_capture_targets&hgta_doSchema=describe+table+schema (Accessed 5.27.25)
- Schwarting S., Litwak S., Hao W., Bähr M., Weise J., Neumann H. Hematopoietic stem cells reduce postischemic inflammation and ameliorate ischemic brain injury. *Stroke.* 2008;39(10):2867-2875. doi 10.1161/STROKEAHA.108.513978
- Shlush L.I. Age-related clonal hematopoiesis. *Blood.* 2018;131(5):496-504. doi 10.1182/blood-2017-07-746453
- Siminovitch L., McCulloch E.A., Till J.E. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Comp Physiol.* 1963;62:327-336. doi 10.1002/jcp.1030620313
- Sleptsov A.A., Nazarenko M.S., Puzryev V.P. Common in atherogenesis and carcinogenesis: clonal hematopoiesis. *Russ J Cardiol.* 2023;28(10):57-65. doi 10.15829/1560-4071-2023-5511
- Spees J.L., Lee R.H., Gregory C.A. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1):125. doi 10.1186/S13287-016-0363-7
- Steensma D.P. Clinical implications of clonal hematopoiesis. *Mayo Clin Proc.* 2018;93(8):1122-1130. doi 10.1016/j.mayocp.2018.04.002
- Symington L.S. End resection at double-strand breaks: mechanism and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(8):a016436. doi 10.1101/cshperspect.a016436
- Vahidy F.S., Rahbar M.H., Zhu H., Rowan P.J., Bambhroliya A.B., Savitz S.I. Systematic review and meta-analysis of bone marrow-derived mononuclear cells in animal models of ischemic stroke. *Stroke.* 2016;47(6):1632-1639. doi 10.1161/STROKEAHA.116.012701
- Vatolin S.Y., Okhapkina E.V., Matveeva N.M., Shilov A.G., Baiborodin S.I., Philimonenko V.V., Zhdanova N.S., Serov O.L. Scheduled perturbation in DNA during in vitro differentiation of mouse embryo-derived cells. *Mol Reprod Dev.* 1997;47(1):1-10. doi 10.1002/(SICI)1098-2795(199705)47:1<1::AID-MRD1>3.0.CO;2-R
- Velten L., Haas S.F., Raffel S., Blaszkiewicz S., Islam S., Hennig B.P., Hirche C., ... Ho A.D., Huber W., Trumpp A., Essers M.A.G., Steinmetz L.M. Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process. *Nat Cell Biol.* 2017;19(4):271-281. doi 10.1038/ncb3493
- Vriend L.E.M., Krawczyk P.M. Nick-initiated homologous recombination: protecting the genome, one strand at a time. *DNA Repair (Amst).* 2017;50:1-13. doi 10.1016/j.dnarep.2016.12.005
- Wang X., Ma S., Yang B., Huang T., Meng N., Xu L., Xing Q., ... Zhang T., Wu J., Yang G.L., Guan F., Wang J. Resveratrol promotes hUC-MSCs engraftment and neural repair in a mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res.* 2018;339:297-304. doi 10.1016/j.bbr.2017.10.032
- Watcham S., Kucinski I., Gottgens B. New insights into hematopoietic differentiation landscapes from single-cell RNA sequencing. *Blood.* 2019;133(13):1415-1426. doi 10.1182/blood-2018-08-835355
- Waterman R.S., Tomchuck S.L., Henkle S.L., Betancourt A.M. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One.* 2010;5(4):e10088. doi 10.1371/journal.pone.0010088
- Watson C.J., Papula A.L., Poon G.Y.P., Wong W.H., Young A.L., Druley T.E., Fisher D.S., Blundell J.R. The evolutionary dynamics and fitness landscape of clonal hematopoiesis. *Science.* 2020;367(6485):1449-1454. doi 10.1126/science.aay9333
- Weiskopf D., Weinberger B., Grubeck-Loebenstein B. The aging of the immune system. *Transpl Int.* 2009;22(11):1041-1050. doi 10.1111/j.1432-2277.2009.00927.x
- Wright K.T., El Masri W., Osman A., Chowdhury J., Johnson W.E.B. Concise review: bone marrow for the treatment of spinal cord injury: mechanisms and clinical applications. *Stem Cells.* 2011;29(2):169-178. doi 10.1002/stem.570
- Xu S.Y. Sequence-specific DNA nicking endonucleases. *Biomol Concepts.* 2015;6(4):253-267. doi 10.1515/bmc-2015-0016
- Yakubov L.A., Rogachev V.A., Likhacheva A.C., Bogachev S.S., Sebeleva T.E., Shilov A.G., Baiborodin S.I., Petrova N.A., Mechetina L.V., Shurdov M.A., Wickstrom E. Natural human gene correction by small extracellular genomic DNA fragments. *Cell Cycle.* 2007;6(18):2293-2301. doi 10.4161/cc.6.18.4729
- Yakubov L.A., Taranov O.S., Sidorov S.V., Nikonov S.D., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. The concept of natural genome reconstruction. Part I. Basic provisions of the "natural genome reconstruction" concept. Changing the genome of hematopoietic stem cells using several natural cellular mechanisms that are inherent in the hematopoietic cell and determine its biological status as "the source of the body's reparative potential". *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov J Genet Breed.* 2024;28(7):696-705. doi 10.18699/vjgb-24-78
- Yin C., Heit B. Cellular responses to the efferocytosis of apoptotic cells. *Front Immunol.* 2021;12:631714. doi 10.3389/fimmu.2021.631714
- Yuan N., Wei W., Ji L., Qian J., Jin Z., Liu H., Xu L., ... He Y., Wang M., Tang L., Fang Y., Wang J. Young donor hematopoietic stem cells revitalize aged or damaged bone marrow niche by transdifferentiating into functional niche cells. *Aging Cell.* 2023;22(8):e13889. doi 10.1111/acel.13889
- Yunir E., Kurniawan F., Rezaprasga E., Wijaya I.P., Suroyo I., Matondang S., Irawan C., Soewondo P. Autologous bone-marrow vs. peripheral blood mononuclear cells therapy for peripheral artery disease in diabetic patients. *Int J Stem Cells.* 2021;14(1):21-32. doi 10.15283/ijsc20088
- Zhang M., Huang B. The multi-differentiation potential of peripheral blood mononuclear cells. *Stem Cell Res Ther.* 2012;3(6):48. doi 10.1186/scrt139
- Zilio N., Ulrich H.D. Exploring the SSBreakome: genome-wide mapping of DNA single-strand breaks by next-generation sequencing. *FEBS J.* 2021;288(13):3948-3961. doi 10.1111/FEBS.15568

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 05.07.2025. После доработки 14.07.2025. Принята к публикации 12.12.2025.

doi 10.18699/vjgb-26-58

Эффекты хронического психосоциального стресса на развитие ооцитов и преимплантационных эмбрионов мышей

Т.Н. Игонина ¹ , И.Д. Чекашов ^{1, 2}, А.А. Левинсон², С.Я. Амтиславский ¹¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия egik_00@mail.ru

Аннотация. Эффекты хронического психосоциального стресса на созревание ооцитов, оплодотворение и ранние этапы развития эмбрионов млекопитающих остаются недостаточно изученными. Настоящее исследование направлено на изучение влияния хронического психосоциального стресса на репродуктивные показатели самок мышей и развитие эмбрионов, полученных после оплодотворения *in vitro* и *in vivo*. Хронический стресс моделировали с помощью 21-дневного протокола, включавшего период социальной изоляции, за которым следовало содержание в условиях высокой скученности. Проведены два эксперимента с воздействием стресса на стадии фолликулогенеза, различавшихся способом оплодотворения. В эксперименте 1 у самок мышей после воздействия стресса были извлечены ооциты, проведено дозревание ооцитов *in vitro*, экстракорпоральное оплодотворение и исследовано раннее развитие полученных эмбрионов. Эксперимент 2 отличался тем, что оплодотворение было *in vivo*, полученные эмбрионы культивировали *in vitro* с двухклеточной стадии. Для оценки преимплантационного развития эмбрионов бластоцисты фиксировали, окрашивали методом TUNEL/DAPI и анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии, подсчитывая число интерфазных ядер и индекс апоптоза. Эксперимент 1 показал, что хронический стресс не оказывает влияния на дозревание ооцитов и их способность к оплодотворению. Однако эмбрионы из группы «стресс» содержали меньшее число интерфазных ядер ($p < 0.001$), что указывает на замедленную скорость дробления. Между тем уровень апоптоза в этих бластоцистах был сопоставим с таковым в контрольной группе. В эксперименте 2 хронический стресс вызвал снижение процентной доли эмбрионов, достигших стадии бластоцисты в течение периода культивирования, и увеличение доли морул ($p < 0.01$), а также снижение числа интерфазных ядер в бластоцистах ($p < 0.001$). Эксперименты показали, что хронический психосоциальный стресс оказывает умеренное, но значимое влияние на раннее эмбриональное развитие, главным образом за счет снижения пролиферативной активности клеток. Эти результаты, полученные на мышах, имеют трансляционное значение для репродуктивной медицины и подчеркивают важность учета материнского стресса при анализе исходов ВРТ.

Ключевые слова: хронический психосоциальный стресс; ооциты; эмбрионы; оплодотворение *in vitro*; раннее эмбриональное развитие; TUNEL-анализ; апоптоз; вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ)


Для цитирования: Игонина Т.Н., Чекашов И.Д., Левинсон А.А., Амтиславский С.Я. Эффекты хронического психосоциального стресса на развитие ооцитов и преимплантационных эмбрионов мышей. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(4):557-568. doi 10.18699/vjgb-26-58

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-25-00139. Содержание животных осуществлялось за счет средств бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН (FWNR-2026-0028).

Благодарности. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» Института цитологии и генетики СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023).

Вклад авторов. Идея работы и планирование эксперимента – С.Я.А., Т.Н.И., А.Л.Л., проведение экспериментов – Т.Н.И., И.Д.Ч., обработка и обсуждение результатов – Т.Н.И., И.Д.Ч., А.Л.Л., С.Я.А., написание и редактирование рукописи – Т.Н.И., И.Д.Ч., А.Л.Л., С.Я.А.

Effects of chronic psychosocial stress on the development of mouse oocytes and preimplantation embryos

T.N. Igonina ¹ , I.D. Chekashov ^{1, 2}, A.L. Levinson², S.Ya. Amstislavsky ¹¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia egik_00@mail.ru

Abstract. The impact of psychosocial chronic stress on mammalian oocyte maturation, fertilization and early stages of embryonic development remains poorly understood. This study addresses the effects of chronic psychosocial stress on the reproductive outcome in female mice, i.e. the development of *in vitro*- and *in vivo*-derived embryos. The model of

chronic stress used in the study comprised a 21-day protocol consisting of a period of social isolation followed by the overcrowding. Two experiments were conducted, varying in the type of fertilization. In experiment 1, female mice were stressed at the folliculogenesis stages; then oocyte maturation and *in vitro* fertilization were performed, and the early development of the *in vitro*-derived embryos was studied. Experiment 2 differed in that fertilization was performed *in vivo*, and the resulting *in vivo*-derived embryos were cultured *in vitro* since the two-cell stage. To assess preimplantation embryo development, blastocysts were fixed, stained with the TUNEL/DAPI method and analyzed using fluorescence microscopy, i.e. the number of interphase nuclei and the apoptosis index were estimated. The results of Experiment 1 showed that chronic stress did not affect oocyte maturation or their fertilization capacity. However, embryos from the stress group contained fewer interphase nuclei ($p < 0.001$), which points to a lower cleavage rate. Meanwhile, the apoptosis rate in these blastocysts was comparable to controls. Experiment 2 showed that chronic stress caused a decrease in the proportion of embryos that achieved the blastocyst stage during the culture period and an increase in the proportion of morulae ($p < 0.01$), as well as a decrease in the number of interphase nuclei in blastocysts ($p < 0.001$). Experiments demonstrated that the chronic psychosocial stress exerts a moderate but significant effect on early embryonic development, primarily via the reduced proliferative activity of embryonic cells. These results obtained in mice have a translational value for reproductive medicine and highlight the importance of maternal stress when analyzing ART outcomes.

Key words: chronic psychosocial stress; oocytes; embryos; *in vitro* fertilization; early embryonic development; TUNEL assay; apoptosis; assisted reproductive technologies (ART)

For citation: Igonina T.N., Chekashov I.D., Levinson A.L., Amstislavsky S.Ya. Effects of chronic psychosocial stress on the development of mouse oocytes and preimplantation embryos. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(4):557-568. doi 10.18699/vjgb-26-58

Введение

Хронический психосоциальный стресс стал неотъемлемым атрибутом жизни в современном мегаполисе. Урбанизация порождает комплекс преимущественно психологических стрессоров, включая социальную перегрузку (скученность, избыток поверхностных контактов) в сочетании с дефицитом значимых связей, профессиональные нагрузки и неопределенность, что негативно сказывается на психоэмоциональном состоянии и репродуктивной функции (Ochnik et al., 2024; Orquiza, 2024).

Хронический стресс активирует гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую (ГГН) ось, что сопровождается повышением синтеза глюкокортикоидов (James et al., 2023). Их воздействие на репродуктивную функцию реализуется через прямые и опосредованные механизмы (Zhai et al., 2020; Bhaumik et al., 2023; Jeon et al., 2023).

Прямое влияние осуществляется через глюкокортикоидные рецепторы в клетках яичника (гранулезных, тека-клетках) и в раннем эмбрионе (Bhaumik et al., 2023; Jeon et al., 2023). В яичнике активация этих рецепторов подавляет пролиферацию, индуцирует апоптоз гранулезных клеток, нарушает стероидогенез и ухудшает качество ооцитов (Prasad et al., 2016; Bhaumik et al., 2023). На преимплантационном этапе развития повышенный уровень кортикостерона у матери может напрямую подавлять деление эмбриональных клеток, снижать количество клеток в бластоцисте и приводить к задержке хетчинга (Liu et al., 2012; Zhai et al., 2020).

Опосредованным механизмом влияния стресса на репродукцию является подавление гипоталамо-гипофизарно-гонадной (ГГГ) оси. Повышенный уровень глюкокортикоидов ингибирует секрецию гонадолиберина (GnRH) в гипоталамусе, тем самым снижая выработку гонадотропинов – лютеинизирующего (ЛГ) и фолликулостимулирующего (ФСГ) гормонов (Zhou et al., 2019). Недостаток этих гормонов нарушает ключевые овариальные процессы: фолликулогенез, овуляцию и синтез половых стероидов (Zhai et al., 2020).

Такое системное нарушение регуляции создает риски для репродуктивного здоровья и может способствовать развитию бесплодия, распространенность которого достигает 12.6–17.5 % среди пар репродуктивного возраста (Cox et al., 2022). Для лечения бесплодия в клинической практике все чаще применяют вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) (Abdullah et al., 2023). В то же время накапливаются данные, указывающие на то, что хронический стресс является значимым фактором, способным влиять на эффективность ВРТ (Zhou et al., 2019; Левинсон и др., 2022). Большинство исследований в этой области сосредоточено на изучении системных гормональных изменений (Valsamakis et al., 2019), тогда как воздействие стрессовых факторов на созревание ооцитов и раннее развитие эмбрионов в условиях применения ВРТ остается недостаточно изученным. При этом актуальность таких исследований возрастает в связи с увеличением числа женщин, прибегающих к процедурам ВРТ (Chambers et al., 2021).

Эксперименты на лабораторных животных также показывают, что стрессовые воздействия различной природы у самок мышей нарушают регуляцию ГГГ оси, что сопровождается изменением гормонального фона и негативно сказывается на репродуктивной системе (Zhai et al., 2020). Однако работ, в которых изучали эффекты стресса именно психосоциальной природы на репродуктивную функцию самок и результат применения ВРТ, крайне мало (Левинсон и др., 2022).

В настоящем исследовании применена модель хронического психосоциального стресса, адаптированная нами ранее для самок мышей (Лебедева и др., 2024; Igonina et al., 2024a, b). Основное внимание уделено изучению созревания ооцитов *in vitro* и *in vivo*, эффективности ЭКО и последующего развития эмбрионов в условиях хронического психосоциального стресса. Новизна подхода заключается в моделировании хронического психосоциального стресса у животных с последующей оценкой его влияния на ключевые этапы протоколов ВРТ – от созревания ооцитов до

культивирования эмбрионов, что обеспечивает высокую трансляционную ценность данной работы.

Цель исследования – оценить влияние хронического психосоциального стресса на репродуктивную функцию самок мышей и раннее эмбриональное развитие как при *in vitro*, так и при *in vivo* оплодотворении.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. Исследования проводили на половозрелых самках ($n = 27$) и фертильных самцах ($n = 25$) мышей линии CD1 в возрасте 2.5 месяца, выращенных в условиях SPF (specific pathogen free) вивария Института цитологии и генетики СО РАН. Животных содержали в индивидуально вентилируемых клетках OptiMice (Animal Care, США) размером $34.3 \times 29.2 \times 15.5$ см (длина \times ширина \times высота) при температуре 22–24 °C и относительной влажности 40–50 %. В качестве подстилки использовали стерильную березовую щепу фракционную для лабораторных животных (ТУ 16.10.23-001-0084157135-2019). Все животные имели свободный доступ к стандартизированному автоклавированному комбикорму для лабораторных мышей и крыс «Дельта Фидс» («БиоПро», Россия) и очищенной воде «Северянка» («Экопроект», Россия), обогащенной минеральными добавками. В течение всего эксперимента поддерживался стабильный световой режим: 12 ч свет/12 ч темнота (включение освещения в 3:00).

Модель хронического психосоциального стресса. Животных опытной группы содержали в условиях социальной изоляции (по одной самке в клетке) в течение 11 сут, после чего переводили в условия скученности (социальной перегрузки) – по 11 самок в одной клетке на протяжении следующих 10 сут. Общая продолжительность стресс-протокола составляла 21 сут. Животных

контрольной группы содержали в стандартных условиях вивария – группами по 5 самок в клетке. Верификацию применяемой модели хронического стресса проводили по уровню кортикостерона в сыворотке крови.

Дизайн эксперимента. Самки мышей были случайным образом распределены между двумя группами: контрольная группа – без стресса; стрессовая группа – хронический психосоциальный стресс согласно описанному выше протоколу.

Для оценки влияния хронического психосоциального стресса на репродуктивную функцию и раннее эмбриональное развитие были проведены два последовательных эксперимента, различающихся по способу оплодотворения (рис. 1). Все самки были гормонально стимулированы с целью суперовуляции (протокол представлен ниже).

Эксперимент 1. Влияние стресса на созревание ооцитов, оплодотворение *in vitro* и раннее развитие эмбрионов. Самки обеих групп (контроль, $n = 6$; стресс, $n = 6$) подвергались эвтаназии с использованием углекислого газа через 4 ч после введения ХГЧ. Производили забор крови и яичников. Из яичниковой ткани выделяли незрелые ооциты на стадии герминального везикула (GV). Ооциты дозревали *in vitro*, затем оплодотворяли с помощью ЭКО. Полученные эмбрионы культивировали в CO₂-инкубаторе в течение 96 ч, после чего эмбрионы фиксировали в 4 % формалине на фосфатно-солевом буфере, окрашивали TUNEL/DAPI и анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии.

Эксперимент 2. Влияние стресса на развитие эмбрионов, оплодотворенных *in vivo*. Самок обеих групп (контроль, $n = 8$; стресс, $n = 7$) спаривали с фертильными самцами. Через 48 ч после ссаживания животных подвергали эвтаназии с использованием углекислого газа, осуществляли забор крови и извлекали эмбрионы из яйце-

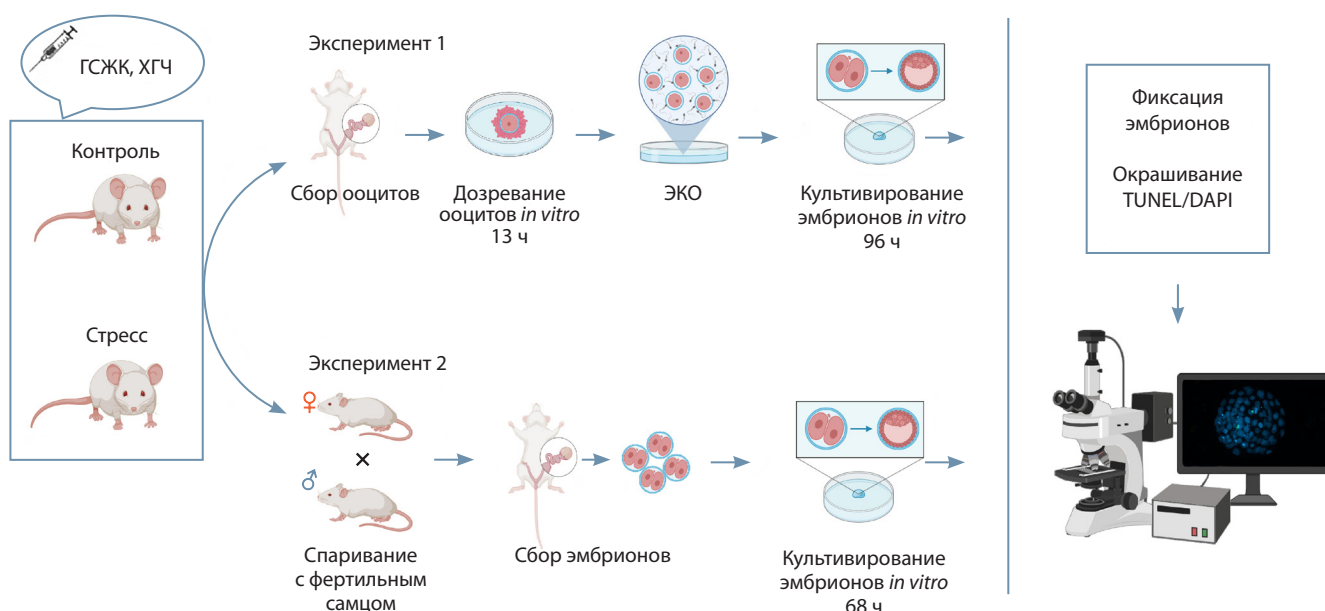


Рис. 1. Схема дизайна эксперимента.

ГСЖК – гонадотропин сыворотки жеребых кобыл; ХГЧ – хорионический гонадотропин человека.

водов на стадии двух-четырёх бластомеров. Полученные эмбрионы культивировали *in vitro* в CO₂-инкубаторе в течение 68 ч. По завершении культивирования эмбрионы фиксировали, окрашивали TUNEL/DAPI и анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии.

Определение уровня кортикостерона в сыворотке крови. Кровь (0,5 мл) собирали в пробирки непосредственно после декапитации животных. Образцы инкубировали 25 мин при комнатной температуре для формирования сгустка, затем центрифугировали (1000 g, 10 мин, Hermle Z 326, Германия). Полученную сыворотку хранили при –80 °С. Концентрацию кортикостерона в сыворотке определяли методом иммуноферментного анализа с использованием набора «Кортикостерон крыса/мышь–ИФА» («Хема», Россия) согласно инструкции производителя. Оптическую плотность измеряли при 450 нм на планшетном спектрофотометре (Thermo Fisher Scientific, США) через 15 мин после остановки реакции. Концентрацию рассчитывали по калибровочной кривой.

Гормональная стимуляция яичников. С целью суперовуляции мышам внутрибрюшинно вводили 7,5 МЕ гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК, фоллигон, Intervet, Нидерланды), а через 46 ч – 7,5 МЕ хорионического гонадотропина человека (ХГЧ, хорулон, Intervet, Нидерланды) в соответствии со стандартным протоколом (Shindo et al., 2022).

Получение незрелых ооцитов и их дозревание *in vitro*. Через 4 ч после введения ХГЧ проводили эвтаназию. Яичники извлекали и помещали в предварительно подогретую среду FertiCult Flushing medium (FertiPro, Бельгия). Из ткани яичников с помощью тонкой иглы и пинцета аккуратно извлекали незрелые ооциты на стадии герминального везикула (GV). Ооциты переносили в капли среды НТФ объемом 50 мкл, которые были нанесены на чашки Петри (Corning Incorporated, США), покрыты стерильным минеральным маслом (FertiPro, Бельгия) и предварительно уравновешены в CO₂-инкубаторе. Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе (New Brunswick™ Galaxy 48R, Eppendorf, Германия) при 37 °С, 5 % CO₂ и 90 % влажности в течение 13–14 ч. Зрелость ооцитов оценивали по наличию первого полярного тельца, после чего осуществляли их ЭКО.

Получение эпидидимального семени. Эпидидимисы извлекали у эвтаназированных самцов. Ткань помещали в 100 мкл подогретой среды НТФ и надрезали для выхода сперматозоидов. Чашку инкубировали 30 мин при 37 °С и 5 % CO₂ для капацитации. Затем 10 мкл суспензии переносили в 60 мкл свежей среды НТФ и инкубировали еще 30 мин. Полученный материал использовали для ЭКО.

Экстракорпоральное оплодотворение. Зрелые ооциты помещали в капли среды НТФ объемом 60 мкл и культивировали в условиях CO₂-инкубатора в течение 30 мин. Среда была покрыта минеральным маслом и предварительно уравновешена. Затем к ооцитам добавляли 10 мкл суспензии эпидидимальных сперматозоидов и инкубировали еще 4 ч. После этого ооциты промывали и переносили в среду KSOM AA для дальнейшего культивирования. Успешное

оплодотворение подтверждали по наличию в ооците двух пронуклеусов.

Получение эмбрионов *in vivo*. Непосредственно после инъекции ХГЧ самок спаривали с фертильными самцами. Успешность спаривания определяли через 18 ч по наличию копулятивной пробки и/или сперматозоидов в вагинальных мазках. Через 48 ч после инъекции ХГЧ проводили эвтаназию оплодотворенных мышей. Затем извлекали яйцеводы и матку, которые промывали раствором FertiCult Flushing medium (FertiPro, Бельгия) с целью получения эмбрионов. Эмбрионы на стадии двух-четырёх бластомеров собирали для последующего культивирования *in vitro*.

Культивирование эмбрионов *in vitro*. Эмбрионы культивировали в каплях среды KSOM AA объемом 20 мкл под минеральным маслом. Инкубацию проводили в CO₂-инкубаторе (New Brunswick™ Galaxy 48R, Eppendorf, Германия) при 37 °С, 5 % CO₂ и 90 % влажности.

Качество и темп развития эмбрионов определяли ежедневно с помощью световой микроскопии (Leica S80 APO, Германия). Для эмбрионов на стадиях дробления анализировали число, форму и размер бластомеров, а также общую морфологию. Для бластоцист оценивали размер бластоцеля, компактность внутренней клеточной массы (ВКМ), а также плотность расположения клеток трофэктодермы (ТЭ). Эмбрион считали нормально развивающимся, если он соответствовал ожидаемой для срока культивирования стадии, не имел признаков повреждения (вакуолизация, грануляция цитоплазмы), степень фрагментации не превышала 20 %, бластоцисты имели компактную ВКМ и бластоцель, окруженный клетками ТЭ. При отсутствии возрастания числа клеток или перехода на следующую стадию в течение 24 ч наблюдения эмбрионы классифицировали как неразвивающиеся. Полученные качественные оценки (развивающийся/неразвивающийся) и процентное содержание эмбрионов, достигших каждой конкретной стадии, использовали для последующего статистического анализа динамики развития *in vitro*.

Окрашивание бластоцист DAPI и TUNEL с последующей флуоресцентной микроскопией. Эмбрионы фиксировали и окрашивали с помощью набора TUNEL FITC (Vazyme, Китай) по протоколу производителя. После трехкратной промывки фосфатно-солевым буфером образцы обрабатывали протеиназой К (5 мин), инкубировали в уравновешивающем буфере (15 мин), а затем в растворе TUNEL (1 ч, 37 °С). Затем их промывали, окрашивали DAPI (5 мин) и помещали на предметные стекла. Визуализацию проводили на микроскопе Zeiss Axio Imager 2 (Германия) с фильтрами DAPI-FITC. Число ядер и апоптотических клеток подсчитывали в программе ImageJ. Индекс апоптоза рассчитывали как отношение апоптотических клеток к общему числу клеток.

Всего было проанализировано 124 рандомно взятых для анализа эмбриона, полученных *in vitro* в результате ЭКО (65 – в контрольной группе, 59 – в стрессовой группе), и 274 эмбриона, полученных *in vivo* после естественного спаривания (166 – в контрольной группе, 108 – в стрессовой группе).

Приготовление культуральных сред. Для проведения ЭКО готовили среду human tubal fluid (HTF) (Quinn et al., 1985). Для дозревания ооцитов применяли модификацию этой среды (HTFm). Эмбрионы культивировали в KSOM AA по (Chatot et al., 1989). Все среды готовили самостоятельно из отдельных компонентов (табл. S1 Приложения)¹ в очищенной воде, стерилизовали фильтрованием через мембрану 0.22 мкм и уравнивали в CO₂-инкубаторе под слоем минерального масла при 37 °C ≥ 4 ч.

Статистический анализ. Данные анализировали с использованием пакета STATISTICA v. 8.0 (StatSoft Inc). Нормальность распределения проверяли критерием Шапиро–Уилка. Параметры с нормальным распределением (уровень кортикостерона, доля зрелых и оплодотворенных ооцитов) сравнивали *t*-критерием Стьюдента. Динамику развития эмбрионов оценивали двухфакторным дисперсионным анализом с повторными измерениями (two-way repeated measures ANOVA). Данные представлены как M ± SEM. Параметры с ненормальным распределением (число интерфазных ядер, индекс апоптоза) анализировали U-критерием Манна–Уитни и представляли как медиану с 25-м и 75-м перцентилями. Данные по стадиям развития эмбрионов сравнивали с применением критерия χ² (хи-квадрат). Уровень значимости – *p* < 0.05.

Результаты

Верификация модели стресса

У самок, подвергнутых хроническому психосоциальному стрессу, уровень кортикостерона в сыворотке крови был достоверно выше (*p* < 0.05, *t*-критерий Стьюдента), чем в контроле (рис. 2), что верифицирует модель стресса.

Влияние стресса на созревание ооцитов, оплодотворение *in vitro* и раннее развитие эмбрионов

От самок контрольной группы (*n* = 6) и группы, подвергнутой хроническому стрессу (*n* = 6), было получено соответственно 184 и 140 незрелых ооцитов на стадии герминативного пузырька (GV). После культивирования *in vitro* в течение 13–14 ч до стадии MII дозрело 155 (84.2 %) ооцитов в контроле и 105 (75.0 %) в группе стресса. Последующее их оплодотворение методом ЭКО привело к образованию зигот в 80.4 % (119/155) случаев в контрольной группе и в 84.6 % (88/105) случаев в группе стресса. Статистический анализ полученных данных с использованием *t*-критерия Стьюдента не выявил достоверных различий между группами ни по доле дозревших ооцитов (*p* > 0.05), ни по эффективности оплодотворения (*p* > 0.05) (рис. 3, а).

Развитие эмбрионов *in vitro* на всех этапах культивирования протекало сходным образом в контрольной и стрессовой группах (см. рис. 3, б, табл. 1). Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями не выявил значимого влияния хронического психосоциального стресса: отсутствовали как основной эффект фактора «стресс» (*F*(1,10) = 1.2, *p* > 0.05), так и его взаимодействие

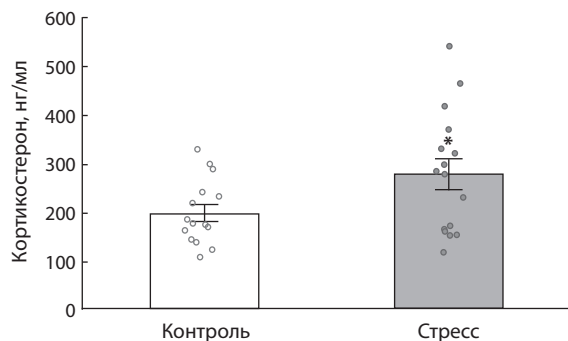


Рис. 2. Содержание кортикостерона в сыворотке крови у контрольных и подвергнутых хроническому стрессу животных.

Данные представлены как M ± SEM. Число животных/образцов: *n* = 15 (группа «контроль»); *n* = 16 (группа «стресс»). * *p* < 0.05 при сравнении с контрольной группой (*t*-критерий Стьюдента).

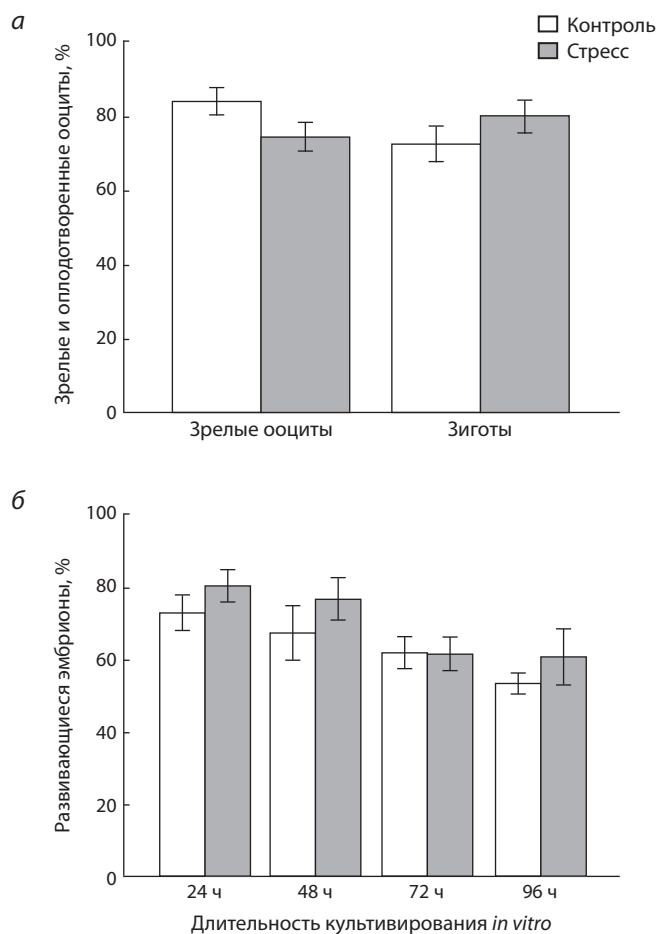


Рис. 3. Влияние хронического психосоциального стресса на дозревание ооцитов, их фертилизационный потенциал и развитие эмбрионов *in vitro*.

а – процентное содержание ооцитов, достигших стадии MII (число зрелых ооцитов в группе «контроль»: *n* = 155, в группе «стресс»: *n* = 105) и зигот, образовавшихся после ЭКО (число полученных зигот в группе «контроль»: *n* = 119, в группе «стресс»: *n* = 88); б – развитие эмбрионов в зависимости от длительности культивирования (исходное число эмбрионов, поставленных на культуру в группе «контроль»: *n* = 119, в группе «стресс»: *n* = 88). Данные представлены как M ± SEM (в среднем на самку).

¹ Табл. S1 и рис. S1 Приложения см. по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx31.pdf>

Таблица 1. Стадии развития эмбрионов, оплодотворенных *in vitro*, после 96 ч культивирования

Группа	Морулы	Бластоцисты	Остановка развития
Контроль	43.1 (28)	50.8 (33)	6.2 (4)
Стресс	39.0 (23)	44.1 (26)	16.9 (10)

с длительностью культивирования ($F(3,30) < 1, p > 0.05$). В то же время был обнаружен значимый эффект фактора «длительность культивирования» ($F(3,30) = 7.8, p < 0.01$), отражающий общую динамику эмбрионального развития *in vitro*.

Эмбрионы, полученные методом ЭКО от стрессированных самок, через 96 ч культивирования *in vitro* характеризовались значимо меньшим числом интерфазных ядер по сравнению с контролем ($p < 0.001$, U-критерий Манна–Уитни) (рис. 4, а). Доля апоптотических ядер значимо не различалась (см. рис. 4, в).

Влияние стресса на развитие эмбрионов, оплодотворенных *in vivo*

От самок контрольной группы ($n = 8$) и группы, подвергнутой хроническому стрессу ($n = 7$), было получено 139

и 115 эмбрионов соответственно. В контрольной группе 127 (91.4 %) эмбрионов находились на стадии двух бластомеров, а 12 (8.6 %) – на стадии трех-четырёх бластомеров; в стрессовой группе 96 (83.5 %) и 19 (16.5 %) эмбрионов были на стадиях двух и трех-четырёх бластомеров соответственно. Хронический психосоциальный стресс не повлиял на фертильность самок мышей, что выражалось в отсутствии различий между контрольной (17.4 ± 2.3) и стрессовой (16.4 ± 1.8) группами ($p > 0.05$; *t*-критерий Стьюдента), в среднем числе эмбрионов на самку на 2-й день развития *in vivo*.

Динамика последующего развития эмбрионов *in vitro* была сопоставима в контрольной и стрессовой группах на протяжении всего периода культивирования (рис. S1). Дисперсионный анализ с повторными измерениями не выявил статистически значимого основного эффекта фактора «стресс» ($F(1,13) = 1.20, p > 0.05$), фактора «длительность культивирования» ($F(2,26) = 2.06, p > 0.05$), а также взаимодействия между факторами «стресс» и «длительность культивирования» ($F(2,26) = 2.82, p > 0.05$).

При этом на позднем этапе культивирования *in vitro* (68 ч) в группе, подвергнутой хроническому стрессу, были обнаружены сдвиги в распределении стадий развития эмбрионов: доля бластоцист оказалась статистически значимо ниже, а доля морул – выше по сравнению с контрольной группой ($p < 0.01$) (табл. 2).

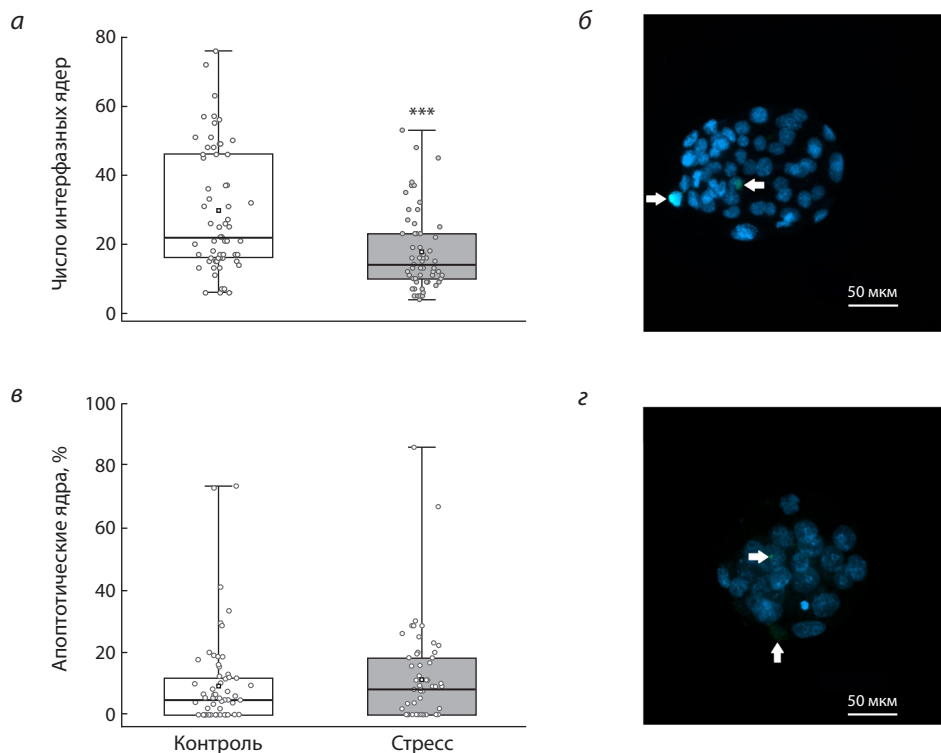


Рис. 4. Влияние хронического психосоциального стресса на число интерфазных ядер (а) и долю апоптотических ядер (в) в эмбрионах мыши, оплодотворенных *in vitro*. Репрезентативные изображения эмбрионов контрольной (б) и стрессовой (г) групп после окрашивания DAPI (синим, ядра) и TUNEL (зеленым, апоптотические клетки, отмечено стрелками).

Данные представлены в виде медианы с 25 % и 75 % квантилями. *** $p < 0.001$ (U-критерий Манна–Уитни). Число исследованных эмбрионов: $n = 65$ в контрольной группе, $n = 59$ в стрессовой группе.

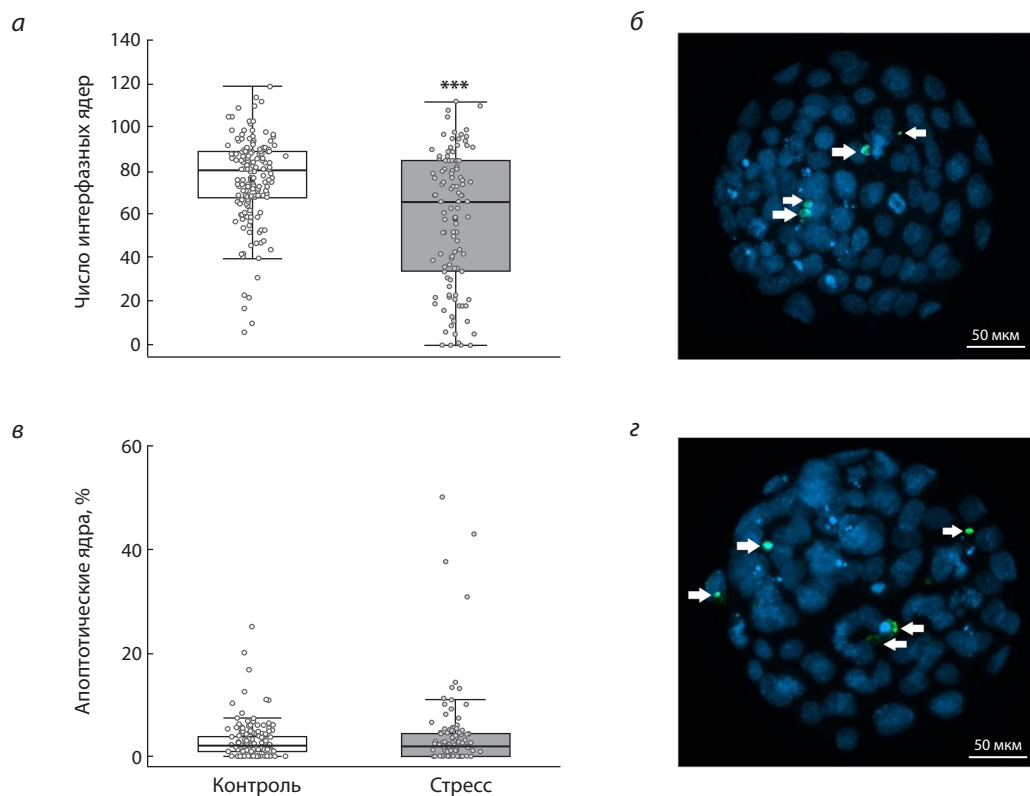


Рис. 5. Влияние хронического психосоциального стресса на число интерфазных ядер (а) и долю апоптотических ядер (в) в эмбрионах мыши, оплодотворенных *in vivo*, после 68 ч культивирования *in vitro*. Репрезентативные изображения эмбрионов контрольной (б) и стрессовой (з) групп после окрашивания DAPI (синим, ядра) и TUNEL (зеленым, апоптотические клетки, отмечено стрелками).

Данные представлены в виде медианы с 25 % и 75 % квантилями. *** $p < 0.001$ (U-критерий Манна–Уитни). Число исследованных эмбрионов: $n = 166$ в контрольной группе, $n = 108$ в стрессовой группе.

Таблица 2. Стадии развития эмбрионов, оплодотворенных *in vivo*, после 68 ч культивирования *in vitro*

Группа	Морулы	Бластоцисты		Остановка развития
		% (n)		
Контроль	1.7 (3)	94.2 (162)	4.1 (7)	
Стресс	8.8 (10)**	82.5 (94)**	8.8 (10)	

** $p < 0.01$ по сравнению с контрольной группой (критерий χ^2).

Последующий анализ эмбрионов, развивавшихся *in vitro* в течение 68 ч, показал статистически значимое снижение числа интерфазных ядер в группе стресса по сравнению с контролем ($p < 0.001$, U-критерий Манна–Уитни) (рис. 5, а). Этот результат свидетельствует о снижении пролиферативной активности клеток под влиянием стресса. В то же время доля апоптотических клеток в эмбрионах достоверно не различалась между группами ($p > 0.05$, U-критерий Манна–Уитни), что указывает на отсутствие выраженного влияния стресса на уровень программируемой клеточной гибели на данном этапе развития (см. рис. 5, в).

Обсуждение

Ганс Селье одним из первых определил стресс с биологической точки зрения как неспецифическую реакцию организма на угрозу гомеостазу (Selye, 1950). Стрессоры, воспринимаемые как реальная или потенциальная опасность, запускают каскад нейроэндокринных реакций, ключевым звеном которых является активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС) (James et al., 2023). В зависимости от продолжительности воздействия стрессоры могут вызывать развитие острого или хронического стресса (Godoy et al., 2018). Помимо временной характеристики, стрессоры классифицируют и по их природе: физиологические, связанные с угрозой физическому благополучию, и психологические, охватывающие психоэмоциональные и психосоциальные воздействия (Godoy et al., 2018). Известно, что повторяющийся или длительный хронический стресс способен приводить к развитию различных патологий (Kalisch et al., 2024).

При изучении влияния хронического психоэмоционального стресса на репродуктивную систему часто используют модели, созданные на мышах, такие как хронический непредсказуемый стресс и ограничение подвижности (Gao Y. et al., 2016; Левинсон и др., 2022). Эти стрессоры оказывают как психологическое, так и физическое воз-

действие на организм и могут вызывать нежелательные эффекты, включая потерю массы тела, что негативно сказывается на общем состоянии животных (Gao Y. et al., 2016; Furman et al., 2022). В некоторых работах в качестве модели психоэмоционального стресса используют предъявление мышам хищника (голодного кота), что создает чрезмерное психогенное воздействие, обусловленное потенциальной угрозой жизни (Liu et al., 2012). Между тем стрессовые воздействия, с которыми сталкивается человек в условиях мегаполиса, не связаны с непосредственной угрозой жизни и имеют в большинстве своем психосоциальную природу, тогда как физические стрессоры являются менее актуальными (Orquiza, 2024).

В условиях современной городской среды у человека могут одновременно наблюдаться дефицит значимых социальных связей и обилие поверхностных или нежелательных контактов, возникающих из-за высокой плотности населения и ограниченной приватности (Hammoud et al., 2021; Zhang Z. et al., 2023). Такое сочетание факторов усиливает переживание одиночества и социального стресса, что подтверждается данными о связи переполненности городских пространств с повышением физиологических стресс-реакций (Lederbogen et al., 2011). Чередование периодов социальной изоляции и вынужденной вовлеченности в интенсивное социальное взаимодействие может усугублять психоэмоциональную нагрузку и оказывать негативное влияние на психофизиологическое состояние человека (Hawkey, Cascioppo, 2010; Lederbogen et al., 2011). Исследования на млекопитающих показывают, что увеличение плотности популяции, ведущее к скученности, оказывает выраженное влияние на репродуктивные процессы (Suvogov, 2021).

Хотя на лабораторных животных изучали как социальную изоляцию, так и скученность, эти два фактора никогда не исследовали в комбинации (Gavrilov et al., 2022). В настоящем исследовании мы использовали модель, основанную на чередовании периодов изоляции и скученности, ранее апробированную на крысах (Gadek-Michalska et al., 2019) и адаптированную нами для самок мышей (Лебедева и др., 2024; Igonina et al., 2024a, b). В отличие от традиционных моделей стресса, данная модель представляется более релевантной социальным условиям, с которыми сталкиваются женщины в современном мегаполисе (Ochnik et al., 2024; Orquiza, 2024).

Согласно полученным нами результатам, чередование периодов изоляции и скученности у самок мышей сопровождается повышением уровня кортикостерона в крови, что подтверждает эффективность этой модели для индукции стресса. Психосоциальный стресс не нарушал созревание ооцитов *in vitro* и не влиял на их способность к оплодотворению. Ранее нами было показано, что в условиях *in vivo* хронический психосоциальный стресс приводит к снижению качества и степени зрелости ооцитов, накоплению в них активных форм кислорода и усилению апоптоза в кумулюсных клетках (Лебедева и др., 2024; Igonina et al., 2024b). Выраженное влияние стресса на созревание ооцитов *in vivo* при его отсутствии *in vitro*, вероятно, объясняется тем, что в культуральной среде нет

физиологического микроокружения, необходимого для передачи стрессового сигнала. Известно, что это микроокружение, включающее клетки фолликула, паракринные и эндокринные сигналы, необходимо для нормального созревания ооцита *in vivo* (Gilchrist et al., 2004; Yeo et al., 2009). Мы предполагаем, что стресс в первую очередь нарушает именно эти коммуникационные пути (Huang, Zeng, 2021; Igonina et al., 2024a). Поскольку прямое влияние стресса на ооцит, по-видимому, менее значительно, чем его опосредованные эффекты через фолликулярные клетки и гормональный фон (Prasad et al., 2016), в условиях *in vitro*, где системное влияние минимизировано, ооциты могут сохранять компетентность даже после предшествующего стрессового воздействия на организм.

Исследования на других моделях показывают, что хронический стресс вызывает схожие нарушения фолликулогенеза, ведущие к ухудшению качества ооцитов, созревающих *in vivo*. Содержание животных в условиях скученности сопровождалось повышением уровней кортикостерона и ангиотензина II, нарушением гормонального баланса, индукцией апоптоза в гранулезных клетках и снижением овариального резерва (Kim, You, 2022). На фоне стресса, связанного с ограничением подвижности, наблюдались нарушения мейоза и гибель ооцитов, что приводило к снижению овариального резерва (Jiang et al., 2023), а также увеличению числа аномальных ооцитов (Tsuji et al., 2021). Кроме того, при этом виде стресса в ооцитах нарушалась морфология мейотического веретена (Sun et al., 2018) и снижался их потенциал развития как *in vitro*, так и *in vivo* (Zhang S.Y. et al., 2011; Wu X.F. et al., 2015; Zhao et al., 2020). Хронический непредсказуемый стресс оказывал аналогичное воздействие, вызывая снижение овариального резерва (Gao L. et al., 2020), ухудшение качества и уменьшение числа ооцитов (Wu L.M. et al., 2012a, b), в отдельных случаях – ановуляцию (Kala, Nivsarkar, 2016), а также нарушая пролиферацию гранулезных клеток и ускоряя их старение (Sun et al., 2021; Ma et al., 2024).

Основным системным звеном, опосредующим эффекты хронического стресса, является активация ГГНС и устойчивое повышение уровня глюкокортикоидов в крови (James et al., 2023). В литературе до последнего времени имелись противоречивые данные о том, влияют ли глюкокортикоиды непосредственно на ооциты (Bhaumik et al., 2023), но недавно было показано, что у мышей глюкокортикоидные рецепторы (GR) на ооцитах отсутствуют (Cincotta et al., 2024). Между тем хорошо документировано, что их созревание чувствительно к повышенному уровню этих гормонов через опосредованное воздействие на соматические клетки фолликула, включая гранулезные и кумулюсные клетки, экспрессирующие GR (Bhaumik et al., 2023; Cincotta et al., 2024). Действие глюкокортикоидов реализуется преимущественно через классический геномный путь, включающий связывание с цитоплазматическим рецептором GR, его транслокацию в ядро и последующую регуляцию транскрипции, а также посредством быстрых негеномных и изоформ-специфичных механизмов, определяя сложный и тканеспецифичный ответ клетки (Bhaumik et al., 2023).

Кроме того, активация ГГНС подавляет гипоталамо-гипофизарно-гонадную ось, в том числе воздействуя на уровне гипоталамуса и гипофиза (Bhaumik et al., 2023), что приводит к снижению синтеза половых гормонов и нарушению нормального гормонального фона, необходимого для фолликулогенеза (Kalantaridou et al., 2004; Whirlledge, Cidlowski, 2013). Важно отметить, что в настоящем исследовании использовалась гормональная стимуляция суперовуляции, которая, вероятно, могла компенсировать данный дефицит, нивелируя этот путь влияния стресса. Однако, как показывают наши и другие данные, стресс продолжает негативно влиять на ооциты и через иные механизмы, прежде всего через прямое нарушение локального овариального микроокружения, что проявляется в индукции апоптоза гранулезных клеток и изменении секреции паракринных факторов (Prasad et al., 2016; Лебедева и др., 2024; Igolina et al., 2024a). Ключевым звеном в этом процессе является воздействие глюкокортикоидов на соматические клетки фолликула (Bhaumik et al., 2023; Cincotta et al., 2024).

Таким образом, глюкокортикоидные сигналы изменяют метаболизм соматических клеток фолликула, секрецию локальных регуляторных факторов и окислительно-восстановительный статус, что, в свою очередь, приводит к изменению цитоплазматической среды ооцита, включая процессы накопления материнских мРНК, белков и эпигенетических ферментов (Wu X.F. et al., 2015; Joseph, Whirlledge, 2017; Sun et al., 2018). Возникающий при стрессе дефицит метаболической и гормональной поддержки со стороны фолликулярного эпителия создает неоптимальные условия для заключительных этапов созревания ооцита.

Важно отметить, что наряду с опосредованным влиянием через соматические клетки продемонстрирована и прямая чувствительность ооцитов к некоторым стрессовым сигналам, например, к кортикотропин-рилизинг-фактору (Zaidan et al., 2013). Однако вклад этого пути, по-видимому, существенно меньше, чем комплексного воздействия, реализуемого через изменение фолликулярного микроокружения.

Результаты нашего исследования показали, что эмбрионы, полученные от стрессированных самок, характеризуются снижением числа клеток в бластоцистах независимо от способа оплодотворения, а в случае оплодотворения *in vivo* – и задержкой достижения этой стадии. Параметры «время достижения стадии бластоцисты» и «число клеток в бластоцисте» являются ключевыми индикаторами преимплантационного развития у млекопитающих (Ajduk, Zernicka-Goetz, 2012). Снижение числа клеток, в частности, может свидетельствовать о замедлении темпов дробления и раннего развития эмбрионов в целом (Nishizono et al., 2017).

Важнейшим аспектом настоящего исследования является то, что снижение числа клеток в бластоцистах наблюдалось независимо от того, произошло ли оплодотворение *in vivo* или было проведено экстракорпорально с использованием ооцитов, изъятых из стресс-измененного

микроокружения, но дозревших *in vitro* в контролируемых условиях. Эти результаты подтверждают выдвинутую ранее гипотезу о том, что вызванные стрессом изменения в транскриптом ооцитов проявляются в эмбрионах, развившихся из этих ооцитов (Roth, 2018). Представляется вероятным, что стрессовое воздействие на ранних стадиях фолликулогенеза приводит к стойким функциональным изменениям ооцитов, обусловленным, в частности, их эпигенетическим перепрограммированием.

Действительно, наиболее ранние преимплантационные этапы развития эмбрионов млекопитающих критически зависят от накопленных в ооцитах «материнских» мРНК и белков, синтез которых завершается до оплодотворения (Wang et al., 2019; Kojima et al., 2025). Именно эти материнские транскрипты обеспечивают подготовку активации зиготического генома и быстрые циклы деления на ранних стадиях дробления зародыша, до момента, когда собственный транскриптом зародыша начинает управлять развитием (Wang et al., 2019; Kojima et al., 2025). Индуцированные стрессом изменения в количестве, составе или функциональной активности этих молекул способны нарушать этот тонкий баланс, негативно влияя на репродуктивную успешность и последующие этапы эмбриогенеза (Roth, 2018). Этим можно объяснить феномен, наблюдаемый как в нашем, так и в других исследованиях: снижение числа клеток в бластоцистах у стрессированных самок и замедление их развития при отсутствии видимых морфологических дефектов в ооцитах (Liu et al., 2012; Casillas et al., 2021).

Гипотеза о том, что воздействия на ооцит до оплодотворения могут программировать развитие эмбриона, по-видимому, достаточно универсальна, поскольку подтверждается исследованиями не только на млекопитающих (Roth, 2018), но и на рыбах (Li et al., 2012). Воздействие кортизола на ооциты рыб до оплодотворения приводит к устойчивым изменениям транскриптома эмбрионов и модулирует их рост (Li et al., 2012). Важно отметить, что у млекопитающих, в отличие от рыб, этот механизм, по-видимому, является опосредованным. Поскольку ооциты мыши не экспрессируют классические глюкокортикоидные рецепторы (Cincotta et al., 2024), стрессовый сигнал, вероятно, сначала нарушает функцию соматических клеток фолликула, что, в свою очередь, создает условия для латентного перепрограммирования развивающейся гаметы.

Таким образом, наши результаты демонстрируют, что хронический психосоциальный стресс, опосредованный активацией ГГНС и нарушением овариального микроокружения, вызывает функциональное перепрограммирование ооцитов. Не затрагивая их морфологию, это перепрограммирование предопределяет снижение качества и замедление развития эмбрионов. Выявленный механизм предоставляет биологическое обоснование для наблюдаемых в клинике ассоциаций между стрессом и снижением эффективности ВРТ (Koumparou et al., 2021; Abdoli et al., 2025; Lu et al., 2025). Несмотря на существующие противоречия в эпидемиологических данных, что может быть связано с трудностями объективной оценки стресс-

са (Zanettoullis et al., 2024; Hu et al., 2025), наша работа указывает на то, что хроническое стрессовое воздействие способно формировать латентный дефект ооцитов, потенциально влияющий на успешность репродуктивных технологий.

Заключение

Наше исследование подтверждает гипотезу о негативном влиянии хронического психосоциального стресса на репродуктивную функцию и предоставляет экспериментальную основу для интерпретации клинических данных. Модель адекватно воспроизводит ключевые аспекты стресса, которому подвержены жители современного мегаполиса. Изучение эффектов психоэмоционального стресса в яичниках (Igonina et al., 2024a) и последствий этих изменений для развития ооцитов и ранних эмбрионов открывает перспективы для разработки новых стратегий коррекции этих изменений (Wu L.M. et al., 2012b; Igonina et al., 2024b). Интеграция подобных подходов в клиническую практику позволит формировать персонализированные стратегии лечения бесплодия, направленные на снижение негативного влияния хронического стресса и повышение эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий.

Соблюдение этических стандартов. Все исследования были одобрены Комитетом по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 143 от 15.03.2023) и соответствовали требованиям европейской Директивы 2010/63/ЕС по защите животных, используемых в научных целях.

Список литературы / References

Лебедева Д.А., Игонина Т.Н., Брусенцев Е.Ю., Шавшаева Н.А., Амстиславский С.Я. Влияние гонадотропной стимуляции яичников в условиях хронического психосоциального стресса на качество ооцитов мышей. *Российский физиологический журнал*. 2024;110(6):930-944. doi 10.31857/S0869813924060044
[Lebedeva D.A., Igonina T.N., Brusentsev E.Yu., Shavshaeva N.A., Amstislavskij S.Ya. Effects of ovarian stimulation with gonadotropins in the conditions of chronic psychosocial stress on the quality of murine oocyte. *Russian Journal of Physiology*. 2024;110(6):930-944. doi 10.31857/S0869813924060044 (in Russian)]
Левинсон А.Л., Игонина Т.Н., Рожкова И.Н., Брусенцев Е.Ю., Амстиславский С.Я. Психоэмоциональный стресс, фолликулогенез и репродуктивные технологии: клинические и экспериментальные данные. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022; 26(5):431-441. doi 10.18699/VJGB-22-53
[Levinson A.L., Igonina T.N., Rozhkova I.N., Brusentsev E.Yu., Amstislavskij S.Ya. Psycho-emotional stress, folliculogenesis, and reproductive technologies: clinical and experimental data. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov J Genet Breed*. 2022;26(5): 431-441. doi 10.18699/VJGB-22-53]
Abdoli S., Gholami A.H., Masoumi S.Z., Najafi-Vosough R., Azimi M., Jenabi E., Aliabadi S., Soltanian A.R., Ghaleiha A., Pilehvari S. The association of anxiety and perceived stress with *in vitro* fertilization outcomes in infertile women: a cross-sectional study. *J Hum Reprod Sci*. 2025;18(1):16-22. doi 10.4103/jhrs.jhrs_168_24
Abdullah K.A.L., Atazhanova T., Chavez-Badiola A., Shivhare S.B. Automation in ART: paving the way for the future of infertility treatment. *Reprod Sci*. 2023;30(4):1006-1016. doi 10.1007/s43032-022-00941-y

Ajduk A., Zernicka-Goetz M. Advances in embryo selection methods. *F1000 Biol Rep*. 2012;4:11. doi 10.3410/B4-11
Bhaumik S., Lockett J., Cuffe J., Clifton V.L. Glucocorticoids and their receptor isoforms: roles in female reproduction, pregnancy, and foetal development. *Biology*. 2023;12(8):1104. doi 10.3390/biology12081104
Casillas F., Betancourt M., Juárez-Rojas L., Ducolomb Y., López A., Ávila-Quintero A., Zamora J., Ommati M.M., Retana-Márquez S. Chronic stress detrimentally affects *in vivo* maturation in rat oocytes and oocyte viability at all phases of the estrous cycle. *Animals (Basel)*. 2021;11(9):2478. doi 10.3390/ani11092478
Chambers G.M., Dyer S., Zegers-Hochschild F., de Mouzon J., Ishihara O., Banker M., Mansour R., Kupka M.S., Adamson G.D. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: assisted reproductive technology, 2014. *Hum Reprod*. 2021;36(11):2921-2934. doi 10.1093/humrep/deab198
Chatot C.L., Ziomek C.A., Bavister B.D., Lewis J.L., Torres I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. *J Reprod Fertil*. 1989;86(2):679-688. doi 10.1530/jrf.0.0860679
Cincotta S.A., Richardson N., Foecke M.H., Laird D.J. Differential susceptibility of male and female germ cells to glucocorticoid-mediated signaling. *eLife*. 2024;12:RP90164. doi 10.7554/eLife.90164
Cox C.M., Thoma M.E., Tchangelova N., Mburu G., Bornstein M.J., Johnson C.L., Kiarie J. Infertility prevalence and the methods of estimation from 1990 to 2021: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Open*. 2022;2022(4):hoac051. doi 10.1093/hropen/hoac051
Furman O., Tsoory M., Chen A. Differential chronic social stress models in male and female mice. *Eur J Neurosci*. 2022;55(9-10): 2777-2793. doi 10.1111/ejn.15481
Gadek-Michalska A., Tadeusz J., Bugajski A., Bugajski J. Chronic isolation stress affects subsequent crowding stress-induced brain Nitric Oxide Synthase (NOS) isoforms and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis responses. *Neurotox Res*. 2019;36(3):523-539. doi 10.1007/s12640-019-00067-1
Gao L., Zhao F., Zhang Y., Wang W., Cao Q. Diminished ovarian reserve induced by chronic unpredictable stress in C57BL/6 mice. *Gynecol Endocrinol*. 2020;36(1):49-54. doi 10.1080/09513590.2019.1631274
Gao Y., Chen F., Kong Q.Q., Ning S.F., Yuan H.J., Lian H.Y., Luo M.J., Tan J.H. Stresses on female mice impair oocyte developmental potential: effects of stress severity and duration on oocytes at the growing follicle stage. *Reprod Sci*. 2016;23(9):1148-1157. doi 10.1177/1933719116630416
Gavrilov V.V., Onufriev M.V., Moiseeva Y.V., Alexandrov Y.I., Gulyaeva N.V. Chronic social isolation stress and crowding in rats have different effects on learning an operant behavior and the state of the hypothalamo-hypophyseal-adrenocortical system. *Neurosci Behav Physiol*. 2022;52(5):698-704. doi 10.1007/s11055-022-01295-3
Gilchrist R.B., Ritter L.J., Armstrong D.T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci*. 2004;82-83:431-446. doi 10.1016/j.anireprosci.2004.05.017
Godoy L.D., Rossignoli M.T., Delfino-Pereira P., Garcia-Cairasco N., de Lima Umeoka E.H. A comprehensive overview on stress neurobiology: basic concepts and clinical implications. *Front Behav Neurosci*. 2018;12:127. doi 10.3389/fnbeh.2018.00127
Hammoud R., Tognin S., Bakolis I., Ivanova D., Fitzpatrick N., Burgess L., Smythe M., Gibbons J., Davidson N., Mechelli A. Lonely in a crowd: investigating the association between overcrowding and loneliness using smartphone technologies. *Sci Rep*. 2021;11(1):24134. doi 10.1038/s41598-021-03398-2
Hawkey L.C., Cacioppo J.T. Loneliness matters: a theoretical and empirical review of consequences and mechanisms. *Ann Behav Med*. 2010;40(2):218-227. doi 10.1007/s12160-010-9210-8
Hu Y., Wang W., Ma W., Wang W., Ren W., Wang S., Fu F., Li Y. Impact of psychological stress on ovarian function: insights, mechanisms










- and intervention strategies (Review). *Int J Mol Med*. 2025;55(2):34. doi 10.3892/ijmm.2024.5475
- Huang J., Zeng H. The influence of environmental factors on ovarian function, follicular genesis, and oocyte quality. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1300:41-62. doi 10.1007/978-981-33-4187-6_3
- Igonina T., Lebedeva D., Tsybko A., Rozhkova I., Babochkina T., Levinson A., Amstislavsky S. Chronic psychosocial stress affects insulin-like growth factor 1 and its receptors in mouse ovaries. *Reprod Fertil Dev*. 2024a;36:RD24101. doi 10.1071/RD24101
- Igonina T.N., Lebedeva D.A., Shavshaeva N.A., Brusentsev E.Yu., Levinson A., Amstislavsky S. Effects of in vivo administration of insulin-like growth factor-1 on oocyte and embryo development in mice under chronic psychosocial stress. *J Evol Biochem Phys*. 2024b;60:1725-1740. doi 10.1134/S0022093024050065
- James K.A., Stromin J.I., Steenkamp N., Combrinck M.I. Understanding the relationships between physiological and psychosocial stress, cortisol and cognition. *Front Endocrinol*. 2023;14:1085950. doi 10.3389/fendo.2023.1085950
- Jeon H., Choi Y., Brännström M., Akin J.W., Curry T.E., Jo M. Cortisol/glucocorticoid receptor: a critical mediator of the ovulatory process and luteinization in human periovulatory follicles. *Hum Reprod*. 2023;38(4):671-685. doi 10.1093/humrep/dead017
- Jiang Y., Xu J., Tao C., Lin Y., Lin X., Li K., Liu Q., ... Sun Y., Zhang F., Kang Y., Xu C., Zhang L. Chronic stress induces meiotic arrest failure and ovarian reserve decline via the cAMP signaling pathway. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14:1177061. doi 10.3389/fendo.2023.1177061
- Joseph D.N., Whirledge S. Stress and the HPA axis: balancing homeostasis and fertility. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10):2224. doi 10.3390/ijms18102224
- Kala M., Nivsarkar M. Role of cortisol and superoxide dismutase in psychological stress induced anovulation. *Gen Comp Endocrinol*. 2016;225:117-124. doi 10.1016/j.ygcen.2015.09.010
- Kalantaridou S.N., Makrigiannakis A., Zoumakis E., Chrousos G.P. Reproductive functions of corticotropin-releasing hormone. Research and potential clinical utility of antalarmins (CRH receptor type 1 antagonists). *Am J Reprod Immunol*. 2004;51(4):269-274. doi 10.1111/j.1600-0897.2004.00155.x
- Kalisch R., Russo S.J., Müller M.B. Neurobiology and systems biology of stress resilience. *Physiol Rev*. 2024;104(3):1205-1263. doi 10.1152/physrev.00042.2023
- Kim J., You S. High housing density-induced chronic stress diminishes ovarian reserve via granulosa cell apoptosis by angiotensin II overexpression in mice. *Int J Mol Sci*. 2022;23(15):8614. doi 10.3390/ijms23158614
- Kojima M.L., Hoppe C., Giraldez A.J. The maternal-to-zygotic transition: reprogramming of the cytoplasm and nucleus. *Nat Rev Genet*. 2025;26(4):245-267. doi 10.1038/s41576-024-00792-0
- Koumparou M., Bakas P., Pantos K., Economou M., Chrousos G. Stress management and In Vitro Fertilization (IVF): a pilot randomized controlled trial. *Psychiatriki*. 2021;32(4):290-299. doi 10.22365/jpsych.2021.029
- Lederbogen F., Kirsch P., Haddad L., Streit F., Tost H., Schuch P., Wüst S., Pruessner J.C., Rietschel M., Deuschle M., Meyer-Lindenberg A. City living and urban upbringing affect neural social stress processing in humans. *Nature*. 2011;474(7352):498-501. doi 10.1038/nature10190
- Li M., Leatherland J.F., Vijayan M.M., King W.A., Madan P. Glucocorticoid receptor activation following elevated oocyte cortisol content is associated with zygote activation, early embryo cell division, and IGF system gene responses in rainbow trout. *J Endocrinol*. 2012;215(1):137-149. doi 10.1530/JOE-12-0030
- Liu Y.X., Cheng Y.N., Miao Y.L., Wei D.L., Zhao L.H., Luo M.J., Tan J.H. Psychological stress on female mice diminishes the developmental potential of oocytes: a study using the predatory stress model. *PLoS One*. 2012;7(10):e48083. doi 10.1371/journal.pone.0048083
- Lu Q., Cheng Y., Zhou Z., Fan J., Chen J., Yan C., Zeng X., Yang J., Wang X. Effects of emotions on IVF/ICSI outcomes in infertile women: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet*. 2025;42(4):1083-1099. doi 10.1007/s10815-025-03388-7
- Ma J., Wang L., Yang D., Luo J., Gao J., Wang J., Guo H., Li J., Wang F., Wu J., Hu R. Chronic stress causes ovarian fibrosis to impair female fertility in mice. *Cell Signal*. 2024;122:111334. doi 10.1016/j.cellsig.2024.111334
- Nishizono H., Uno K., Abe H. Cleavage speed and blastomere number in DBA/2J compared with C57BL/6J mouse embryos. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2017;56(1):11-17
- Ochnik D., Buława B., Nagel P., Gachowski M., Budziński M. Urbanization, loneliness and mental health model – a cross-sectional network analysis with a representative sample. *Sci Rep*. 2024;14(1):24974. doi 10.1038/s41598-024-76813-z
- Orquiza J.C. Self-stress: a new perspective on stress and moral disorders of civilization. *J Org Psychol*. 2024;24(1). doi 10.33423/jop.v24i1.6885
- Prasad S., Tiwari M., Pandey A.N., Shrivastav T.G., Chaube S.K. Impact of stress on oocyte quality and reproductive outcome. *J Biomed Sci*. 2016;23:36. doi 10.1186/s12929-016-0253-4
- Quinn P., Kerin J.F., Warnes G.M. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril*. 1985;44(4):493-498. doi 10.1016/s0015-0282(16)48918-1
- Roth Z. Stress-induced alterations in oocyte transcripts are further expressed in the developing blastocyst. *Mol Reprod Dev*. 2018;85(11):821-835. doi 10.1002/mrd.23045
- Selye H. Stress and the general adaptation syndrome. *Br Med J*. 1950;1(4667):1383-1392. doi 10.1136/bmj.1.4667.1383
- Shindo M., Miyado K., Kang W., Fukami M., Miyado M. Efficient superovulation and egg collection from mice. *Bio Protoc*. 2022;12(11):e4439. doi 10.21769/BioProtoc.4439
- Sun J., Guo Y., Zhang Q., Bu S., Li B., Wang Q., Lai D. Chronic restraint stress disturbs meiotic resumption through APC/C-mediated cyclin B1 excessive degradation in mouse oocytes. *Cell Cycle*. 2018;17(13):1591-1601. doi 10.1080/15384101.2018.1471316
- Sun J., Guo Y., Fan Y., Wang Q., Zhang Q., Lai D. Decreased expression of IDH1 by chronic unpredictable stress suppresses proliferation and accelerates senescence of granulosa cells through ROS activated MAPK signaling pathways. *Free Radic Biol Med*. 2021;169:122-136. doi 10.1016/j.freeradbiomed.2021.04.016
- Suvorov A. Population numbers and reproductive health. *Endocrinology*. 2021;162(11):bqab154. doi 10.1210/endo/bqab154
- Tsuji A., Ikeda Y., Murakami M., Kitagishi Y., Matsuda S. d-Leucine protects oocytes from chronic psychological stress in mice. *Reprod Med Biol*. 2021;20(4):477-484. doi 10.1002/rmb2.12396
- Valsamakis G., Chrousos G., Mastorakos G. Stress, female reproduction and pregnancy. *Psychoneuroendocrinology*. 2019;100:48-57. doi 10.1016/j.psyneuen.2018.09.031
- Wang Y., Liu Q., Tang F., Yan L., Qiao J. Epigenetic regulation and risk factors during the development of human gametes and early embryos. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2019;20:21-40. doi 10.1146/annurev-genom-083118-015143
- Whirledge S., Cidlowski J.A. A role for glucocorticoids in stress-impaired reproduction: beyond the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*. 2013;154(12):4450-4468. doi 10.1210/en.2013-1652
- Wu L.M., Hu M.H., Tong X.H., Han H., Shen N., Jin R.T., Wang W., Zhou G.X., He G.P., Liu Y.S. Chronic unpredictable stress decreases expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in mouse ovaries: relationship to oocytes developmental potential. *PLoS One*. 2012a;7(12):e52331. doi 10.1371/journal.pone.0052331
- Wu L.M., Liu Y.S., Tong X.H., Shen N., Jin R.T., Han H., Hu M.H., Wang W., Zhou G.X. Inhibition of follicular development induced by chronic unpredictable stress is associated with growth and differentiation factor 9 and gonadotropin in mice. *Biol Reprod*. 2012b;86(4):121. doi 10.1095/biolreprod.111.093468

- Wu X.F., Yuan H.J., Li H., Gong S., Lin J., Miao Y.L., Wang T.Y., Tan J.H. Restraint stress on female mice diminishes the developmental potential of oocytes: roles of chromatin configuration and histone modification in germinal vesicle stage oocytes. *Biol Reprod.* 2015;92(1):13. doi 10.1095/biolreprod.114.124396
- Yeo C.X., Gilchrist R.B., Lane M. Disruption of bidirectional oocyte-cumulus paracrine signaling during in vitro maturation reduces subsequent mouse oocyte developmental competence. *Biol Reprod.* 2009;80(5):1072-1080. doi 10.1095/biolreprod.108.073908
- Zaidan H., Leshem M., Gaisler-Salomon I. Prereproductive stress to female rats alters corticotropin releasing factor type 1 expression in ova and behavior and brain corticotropin releasing factor type 1 expression in offspring. *Biol Psychiatry.* 2013;74(9):680-687. doi 10.1016/j.biopsych.2013.04.014
- Zanettoullis A.T., Mastorakos G., Vakas P., Vlahos N., Valsamakis G. Effect of stress on each of the stages of the IVF procedure: a systematic review. *Int J Mol Sci.* 2024;25(2):726. doi 10.3390/ijms25020726
- Zhai Q.Y., Wang J.J., Tian Y., Liu X., Song Z. Review of psychological stress on oocyte and early embryonic development in female mice. *Reprod Biol Endocrinol.* 2020;18(1):101. doi 10.1186/s12958-020-00657-1
- Zhang S.Y., Wang J.Z., Li J.J., Wei D.L., Sui H.S., Zhang Z.H., Zhou P., Tan J.H. Maternal restraint stress diminishes the developmental potential of oocytes. *Biol Reprod.* 2011;84(4):672-681. doi 10.1095/biolreprod.110.087890
- Zhang Z., Měchurová K., Resch B., Amegbor P., Sabel C.E. Assessing the association between overcrowding and human physiological stress response in different urban contexts: a case study in Salzburg, Austria. *Int J Health Geogr.* 2023;22(1):15. doi 10.1186/s12942-023-00334-7
- Zhao X.Y., Li Z.B., Yuan H.J., Han X., Wu J.S., Feng X.Y., Zhang M., Tan J.H. Restraint stress and elevation of corticotrophin-releasing hormone in female mice impair oocyte competence through activation of the tumour necrosis factor α (TNF- α) system. *Reprod Fertil Dev.* 2020;32(9):862-872. doi 10.1071/RD20002
- Zhou F.J., Cai Y.N., Dong Y.Z. Stress increases the risk of pregnancy failure in couples undergoing IVF. *Stress.* 2019;22(4):414-420. doi 10.1080/10253890.2019.1584181

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи. Поступила в редакцию 26.09.2025. После доработки 04.02.2026. Принята к публикации 05.02.2026

doi 10.18699/vjgb-26-59


Некоторые аспекты межвидовой гибридизации *Solanum lycopersicum* L. и *Solanum sisymbriifolium* Lam.

А.В. Вишнякова , А.П. Федотов ², Е.В. Осминина ³, А.З. Мартиросян ¹, А.Д. Кобяшова ¹,
А.А. Александрова , А.А. Миронов , С.Г. Монахос ¹

¹ Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

 a.vishnyakova@rgau-msha.ru










Аннотация. Межвидовая гибридизация играет большую роль в селекции томата (*Solanum lycopersicum* L.), позволяет обогащать генофонд новыми признаками и создавать сорта и гибриды с устойчивостью к биотическим и абиотическим факторам. Перспективным источником для интрогрессии ценных признаков может быть паслен гулявниколистный (*Solanum sisymbriifolium* Lam.). Сведения о результатах гибридизации между *S. lycopersicum* и *S. sisymbriifolium* противоречивы: одни исследователи описывают полученные растения как удвоенные гаплоиды, другие – как типичные межвидовые гибриды. В настоящей работе мы уточнили природу потомства от гибридизации *S. lycopersicum* и *S. sisymbriifolium* путем анализа начальных стадий развития семязачтков и описания морфологических и цитогенетических особенностей полученных растений. Получение межвидовых гибридов между *S. lycopersicum* и *S. sisymbriifolium* сопряжено с постзиготическими барьерами нескрещиваемости. Сравнительный анализ развивающихся семязачтков от самоопыления линий томата с функциональной мужской стерильностью и от их опыления *S. sisymbriifolium* выявил, что лишь часть семязачтков развивается по типичному пути, в то время как большинство либо останавливается в развитии, либо формирует партенокарпические структуры с псевдоэмбриональной тканью. С использованием эмбриокультуры нами было получено 12 растений от гибридизации *S. lycopersicum* и *S. sisymbriifolium*. По морфологическим признакам все растения были близки *S. lycopersicum*, однако отмечено появление признаков, не характерных для родительских линий томата, например желто-оранжевой окраски зрелых плодов у растений, полученных при скрещивании линии зеленоплодных томатов с красноплодным пасленом гулявниколистным. При анализе числа хромосом в меристемах корня наблюдали миксоплоидию ($2n = 16-26$), а при микроспорогенезе регистрировали множественные нарушения мейоза. Таким образом, комплексный эмбриологический, морфологический и цитогенетический анализ предоставляет доказательства гибридного происхождения полученных растений, что подтверждает возможность преодоления постзиготических барьеров между данными видами и открывает путь к использованию *S. sisymbriifolium* в селекции томата.

Ключевые слова: томат; паслен гулявниколистный; *Solanum lycopersicum*; *Solanum sisymbriifolium*; межвидовая гибридизация; эмбриокультура; микроспорогенез; эмбриология; миксоплоидия

Для цитирования: Вишнякова А.В., Федотов А.П., Осминина Е.В., Мартиросян А.З., Кобяшова А.Д., Александрова А.А., Миронов А.А., Монахос С.Г. Некоторые аспекты межвидовой гибридизации *Solanum lycopersicum* L. и *Solanum sisymbriifolium* Lam. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2026;30(4):569-580. doi 10.18699/vjgb-26-59

Финансирование. Работа выполнена за счет средств тематического плана-задания № 082-03-2025-246 от 23.01.2025 на выполнение научно-исследовательских работ по заказу Минсельхоза России за счет средств федерального бюджета в 2025 г.


Issues of interspecific hybridization between *Solanum lycopersicum* L. and *Solanum sisymbriifolium* Lam.

A.V. Vishnyakova , A.P. Fedotov ², E.V. Osminina ³, A.Z. Martirosyan ¹, A.D. Kobayashova ¹,
A.A. Alexandrova , A.A. Mironov , S.G. Monakhos ¹

¹ Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia

 a.vishnyakova@rgau-msha.ru

Abstract. Interspecific hybridization plays a crucial role in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) breeding for introducing beneficial traits from wild relatives, such as resistance to biotic and abiotic stress. Sticky nightshade (*Solanum sisymbriifolium* Lam.) is a promising source for the introgression of desirable traits. Reports on hybridization between *S. lycopersicum* and *S. sisymbriifolium* remain contradictory, differently describing the progeny as doubled haploids or

interspecific hybrids. In the present study, we clarify the nature of the progeny derived from hybridization between *S. lycopersicum* and *S. sisymbriifolium* by analyzing the early stages of ovule development and characterizing the morphological and cytogenetic features of the resulting plants. Interspecific hybridization between *S. lycopersicum* and *S. sisymbriifolium* encounters postzygotic reproductive barriers. Only a small proportion of developing ovules in male-sterile tomato lines, whether self-pollinated or pollinated with *S. sisymbriifolium* followed the normal developmental pathway. In most cases, either ovule development was arrested, or parthenocarpic seed-like bodies formed instead of normal seeds. Embryo rescue enabled the recovery of 12 plants resulting from interspecific hybridization of *S. lycopersicum* and *S. sisymbriifolium*. Morphologically, the plants closely resembled the *S. lycopersicum* parent, although they displayed several traits distinctive from those of the parental tomato lines. Notably, yellow-orange mature fruits developed in progeny from the cross of green-fruited *S. lycopersicum* and red-fruited *S. sisymbriifolium*. Analysis of chromosome numbers in root meristems revealed mixoploidy ($2n = 16-26$), and meiotic analysis during microsporogenesis showed multiple aberrations in meiosis. Thus, comprehensive embryological, morphological, and cytogenetic analyses provide evidence for the hybrid origin of the obtained plants. This confirms the possibility of overcoming postzygotic barriers between these species and opens avenues for the utilization of *S. sisymbriifolium* in tomato breeding programs.

Key words: tomato; sticky nightshade; *Solanum lycopersicum*; *Solanum sisymbriifolium*; interspecific hybridization; embryo rescue; microsporogenesis; embryology; mixoploidy

For citation: Vishnyakova A.V., Fedotov A.P., Osminina E.V., Martirosyan A.Z., Kobayashova A.D., Alexandrova A.A., Mironov A.A., Monakhos S.G. Issues of interspecific hybridization between *Solanum lycopersicum* L. and *Solanum sisymbriifolium* Lam. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(4):569-580. doi 10.18699/vjgb-26-59

Введение

Томат (*Solanum lycopersicum* L.) – экономически значимая в мировом масштабе овощная культура, однако ее продуктивность существенно лимитируется высокой уязвимостью к комплексу патогенов, а также к воздействию биотических и абиотических стрессов (Sadashiva et al., 2017). В связи с этим первостепенное значение приобретают стратегии селекции, направленные на создание генотипов с генетической устойчивостью (Abbas et al., 2024). Одним из ключевых подходов в решении данной проблемы является межвидовая гибридизация, позволяющая интрогрессировать ценные аллели от диких родственных видов в геном культурного томата (Ajaharuddin et al., 2024).

Интрогрессия генов устойчивости к заболеваниям из других видов в томат имеет многолетнюю историю и достаточно успешна (Rubio et al., 2016; Yerasu et al., 2023). В настоящее время источники устойчивости, вовлеченные в селекцию томата, представлены в основном дикими видами секции *Lycopersicon*, тогда как представители других секций рода *Solanum* привлекаются не так активно (Foolad, 2007), что связано с барьерами несовместимости, которые сильно лимитируют использование генофонда (Abbas et al., 2024).

Паслен гулявниколистный (*Solanum sisymbriifolium* Lam.) – отдаленный родственник томата, который ряд исследователей рассматривают как перспективный источник устойчивости к заболеваниям. С. Collonnier с коллегами (2003) отмечают устойчивость *S. sisymbriifolium* к бактериальному увяданию, Ł. Piosik с соавторами (2019) – к вертициллезу. По данным (Flier et al., 2003), *S. sisymbriifolium* проявлял реакцию сверхчувствительности при искусственной инокуляции несколькими европейскими изолятами *Phytophthora infestans*, патогенными для картофеля. По нашим наблюдениям, паслен гулявниколистный демонстрирует высокую устойчивость к фитофторозу томата в полевых испытаниях в средней полосе России. Кроме того, исследователи отмечают устойчивость к карминовым паутинным клещам (Piosik et al., 2019) и нематодам

(Hajihassani et al., 2020). *S. sisymbriifolium* имеет высокий потенциал адаптивности и распространен во многих странах (Biswas et al., 2023).

Гибридизация между такими отдаленными видами, как томат и паслен гулявниколистный, сталкивается с серьезными постзиготическими барьерами. При этом показано, что рост пыльцевой трубки паслена гулявниколистного в пестике томата и прорастание в семязачаток проходят успешно (Bal, Abak, 2003; Piosik et al., 2019). Несколько исследовательских коллективов предпринимали попытки межвидовой гибридизации между *S. lycopersicum* и *S. sisymbriifolium*. Их результаты различались: D. Chambonnet (1996) и U. Bal, K. Abak (2003) получили растения, близкие по фенотипу к томату, которые считали удвоенными гаплоидами, а Ł. Piosik с коллегами (2019) – межвидовые гибриды, имеющие фенотип, близкий к паслену. Таким образом, остается не до конца изученным вопрос о природе получаемых при межвидовой гибридизации растений, их морфологических и цитологических особенностях.

Цель настоящего исследования – получение растений от скрещивания *S. lycopersicum* и *S. sisymbriifolium* и комплексный анализ их природы с использованием сравнительной эмбриологии, цитогенетики и оценки морфологических признаков.

Материалы и методы

Растительный материал и гибридизация. Используемые в гибридизации образцы линий крупноплодных томатов Роз Сон, Роз st9 и томатов черри st8, st6, st6(лик), st4 были предоставлены ООО «Селекционная станция им. Н.Н. Тимофеева». Линии Роз Сон, st8, st6, st6(лик), st4 относятся к шестому-восьмому поколению инбридинга, Роз st9 представляет третье поколение инбридинга и отличается гомозиготностью по шести генам устойчивости к фузариозу, кладоспориозу, вирусу бронзовости, вертициллезу, нематодам и вирусу мозаики томата. Все линии обладают функциональной мужской стерильностью, са-

мосовместимостью и индетерминантным ростом. Линии Роз Сон, Роз st9 имели розовые плоды, st8 – зеленоплодный, st6(лик), st6, st4 – красноплодные. Образец паслена гулявниколистного Sn получен нами из коллекции ООО «Селекционная станция им. Н.Н. Тимофеева». Растения характеризуются самонесовместимостью, детерминантным ростом, насыщенно-красными плодами 2–3 см в диаметре.

Гибридизацию томата и паслена гулявниколистного проводили в утренние часы с 9 до 11. Скрещивания выполняли реципрокно. В качестве контрольного варианта самоопыляли родительские линии томата. Опыление осуществляли в бутонах с кастрацией: у томата – в стадии лимонно-желтого бутона, у паслена – в стадии белого бутона за 1–2 дня до раскрытия цветка. Сразу после кастрации проводили опыление свежесобранной пылью и изоляцию рыльца пестика ватой. Всего было опылено 1165 цветков томата пасленом гулявниколистным, не считая скрещиваний, которые были использованы для гистологического анализа. По комбинациям скрещивания количество сделанных опылений для Роз Сон – 156, Роз st9 – 298, st8 – 185, st6(лик) – 190, st6 – 132, st4 – 204. В гибридизации участвовало не менее пяти растений каждого образца томата и шести растений паслена гулявниколистного.

Гистологическое исследование. Цветки и развивающиеся плоды томатов фиксировали в растворе формалин–спирт–уксусная кислота (FAA) (Ruzin, 1999). Материал до 15-го дня после опыления (далее – ДПО) использовали целиком или после продольного рассечения, а из образцов после 15 ДПО извлекали семяпочки (отдельно или с плацентой) для дальнейшего анализа. Для исследования каждого этапа развития из каждой линии отбирали не менее двух цветков или развивающихся плодов, а для образцов после 15 ДПО – не менее 10 семяпочек. Дегидратацию выполняли в серии спиртов возрастающей концентрации, заменяли спирт ксилолом и заключали в парафин. Каждый образец изучали целиком на сериях срезов толщиной 10–15 мкм, полученных при помощи микротомы Microm HM355S (Thermo Fisher Scientific). Препараты окрашивали 0.1 % алциановым синим в 3 % уксусной кислоте и 1 % водным сафранином (Барыкина и др., 2004) или проводили ШИК-реакцию и окрашивали гематоксилином Эрлиха (Ruzin, 1999). Окраску выполняли вручную или на аппарате для окрашивания Varistain Gemini ES (Thermo Fisher Scientific). Препараты исследовали под световым микроскопом AxioPlan2 (Carl Zeiss) с модулем для дифференциально-интерференционного контраста или на слайд-сканере BX61VS (Olympus). Обработка полученных изображений производилась в AdobePhotoshop и ImageJ.

Эмбриокультура. Для культивирования на питательных средах отбирали плоды начиная с 16-го по 36-й день после опыления. Завязываемость плодов учитывали по мере их сбора. Стерилизацию плодов проводили в 2 % гипохлорите натрия с последующей трехкратной промывкой в стерильной дистиллированной воде. Из плодов выделяли увеличенные в размере семяпочки и помещали на питательную среду. Для культивирования семяпочек

использовали питательные среды по (Harberd, 1969; Piosik et al., 2019). При отсутствии разрыва оболочек семяпочка и прорастания зародышей на агаризованных питательных средах через три недели из семяпочек, увеличившихся в размерах, были извлечены эмбриониды; их культивировали на питательной среде того же состава. Для регенерации побегов из каллусной ткани использовали агаризованную питательную среду Мурасиге–Скуга (MS), содержащую 30 г/л сахарозы, 5 мг/л БАП, 0.01 мг/л ИУК. Если семяпочка проросла или образовывала органогенный каллус с побегами, их пересаживали на агаризованную среду MS с добавлением 20 г/л сахарозы, 0.01 мг/л БАП, 0.01 мг/л ИУК. При сложностях с укоренением побегов использовали питательную среду MS, содержащую 20 г/л сахарозы, 2 мг/л ИУК, 8 г/л агар-агара.

Фенотипирование растений. Изучение полученных комбинаций st8×Sn растений № 1, 2, 3 и st6×Sn растений № 1, 2, 3, 4, 5, 6, а также родительских линий st6, st8 и паслена гулявниколистного Sn проводили по морфологическим признакам побегов, цветков и плодов в соответствии с методикой испытания на отличимость, однородность, стабильность Госсорткомиссии для томата (<https://gossortrf.ru/publication/#publication-methodics>).

Цитологические исследования числа хромосом в митотических и мейотических клетках полученных растений. Цитологические препараты готовили из клеток пыльников и меристематических клеток корня методом SteamDrop (Kirov et al., 2014). Готовые препараты микроскопировали на микроскопе AXIOSKOP 40 (Carl Zeiss) при увеличении 1000× с иммерсией. Изучали не менее 10 клеток на один образец.

Статистический анализ. Сравнение завязываемости плодов от опыления линий томата пасленом гулявниколистным проводили методом анализа таблиц сопряженности. Достоверность различий между генотипами оценивали с помощью критерия хи-квадрат Пирсона на уровне значимости $p = 0.05$. Парные сравнения между генотипами выполняли с использованием поправки Бонферрони для корректировки критического уровня значимости. Математическая обработка данных и графическое представление результатов осуществлялись в программных пакетах Microsoft Excel и R-Studio (2025.09.2+418).

Результаты

Типичный ход эмбриогенеза при самоопылении линии Роз st9 *S. lycopersicum*

За 1 день до антезиса в цветках *S. lycopersicum* линии Роз st9, выбранной в качестве контроля для сравнения ранних этапов эмбриогенеза, присутствовали только зрелые унитегмальные тенуинуцеллярные семяпочки с характерными для томатов зрелыми зародышевыми мешками (рис. 1, а). На 5-й ДПО в семяпочках отмечали формирование линейного проэмбрио и многоклеточного эндосперма (см. рис. 1, б). Начиная с халазальной стороны, внутренняя эпидерма интегумента дифференцировалась в интегументальный тапетум (ИТ), или эндотелий. Примыкающие к ИТ клетки паренхимы интегумента приобретали утол-

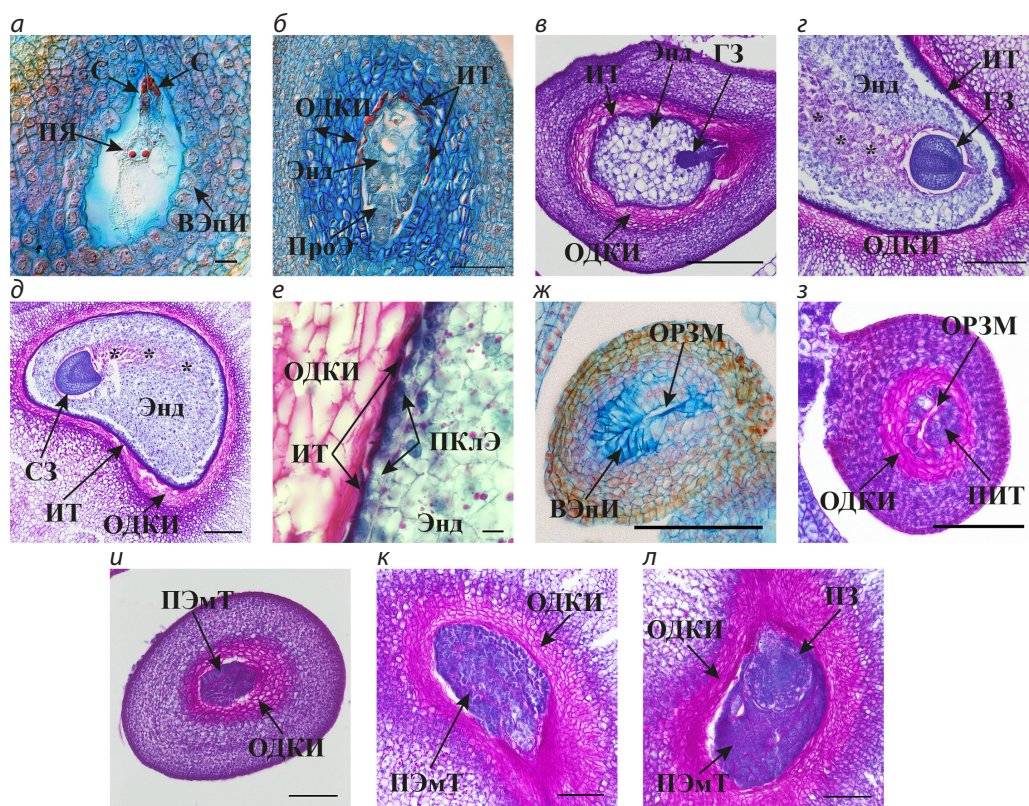


Рис. 1. Типичный ход развития семян *S. lycopersicum* линии Роз st9 при самоопылении (а-е) и выявленные нарушения, ведущие к образованию семяподобных структур (ж-л). а – строение зародышевого мешка и прилежащих тканей за день до антезиса (0 ДПО); б – эндосперм и проэмбрио в развивающемся семени, 5 ДПО; в – ранняя глобулярная стадия развития зародыша, 15 ДПО; г – поздняя глобулярная стадия развития зародыша, 24 ДПО; д – развивающийся зародыш на стадии сердца, 24 ДПО; е – зона контакта эндосперма с окружающими тканями развивающейся семенной кожуры, 24 ДПО; ж – вращение клеток внутренней эпидермы интегумента в разрушенный зародышевый мешок, 5 ДПО; з – развитие зоны лизиса и смерти вокруг эндотелия, 10 ДПО; и – образование псевдоэмбриональной ткани, 15 ДПО; к – семяподобная структура с псевдоэмбриональной тканью, 24 ДПО; л – псевдозародыш, окруженный псевдоэмбриональной тканью, 24 ДПО.

ВЭПИ – внутренняя эпидерма интегумента; ГЗ – глобулярный зародыш; ИТ – интегументальный тапетум; ОДКИ – область деградации клеток интегумента; ОРЗМ – остатки разрушенного зародышевого мешка; ПЗ – псевдозародыш; ПИТ – пролиферирующий интегументальный тапетум; ПКлЭ – периферические клетки эндосперма; ПроЭ – проэмбрио; ПЭМТ – псевдоэмбриональная ткань; ПЯ – полярные ядра; С – синергида; СЗ – сердцевидный зародыш; Энд – эндосперм. Звездочками отмечена область разрушаемых зародышем клеток эндосперма. Масштабная линейка: а, е – 10 мкм; б – 50 мкм; ж-л – 100 мкм; в-д – 200 мкм.

щенные клеточные стенки, а их содержимое начинало деградировать – формировалась область деградации клеток интегумента (ОДКИ).

Дальнейшее развитие семян сопровождалось увеличением размеров как из-за пролиферации клеток периферии развивающейся семенной кожуры, так и благодаря постоянному увеличению объема, занимаемого зародышем и эндоспермом (см. рис. 1, в-д). В период 10–15 ДПО зародыш переходил на раннюю глобулярную стадию развития (см. рис. 1, в). К зародышу плотно прилегали клетки эндосперма, в которых начинали выявляться запасные вещества. Снаружи эндосперм полностью был окружен однослойным ИТ. В развивающихся семенах на 24-й ДПО выявлялись шаровидные зародыши с развитым суспензором на поздней глобулярной стадии развития (см. рис. 1, г) и зародыши на стадии сердца (см. рис. 1, д). Прилегающие к ИТ клетки эндосперма отличались от соседних клеток этой ткани меньшими размерами, уплощением вдоль ИТ

и сильной вакуолизацией, что позволяет их рассматривать как особый периферический слой клеток эндосперма (см. рис. 1, е). Вокруг зародышей присутствовала хорошо выраженная эндоспермальная полость, а часть клеток эндосперма разрушалась в результате поглощения питательных веществ зародышем (см. рис. 1, г, д). На 28-й ДПО в развивающихся семенах выявлялись зародыши на стадии торпедо.

Нарушения типичного хода эмбриогенеза при самоопылении линии Роз st9 *S. lycopersicum*

Наиболее частым отклонением в развитии семяпочек после самоопыления линий томата была деградация зародышевого мешка. К 5-му ДПО в большинстве таких семяпочек происходило разрушение и сжатие зародышевого мешка (см. рис. 1, ж). Клетки внутренней эпидермы интегумента значительно вытягивались, занимая освободившееся место, после чего развитие прекращалось.

В отдельных случаях при деградации зародышевого мешка на 5–10-й ДПО клетки внутренней эпидермы интегумента не растягивались, а дифференцировались в ИТ, который начинал пролиферировать, а вокруг них формировалась ОДКИ (см. рис. 1, з). Такие семяпочки продолжали рост, формируя семяподобные структуры, отличавшиеся от типичных семян меньшими размерами. Проллиферирующий ИТ образовывал псевдоэмбриональную ткань с характерными кластерами клеток, более толстыми клеточными стенками на границах кластера, отсутствием запасяющих веществ на всех этапах развития, интенсивным окрашиванием, типичным для ИТ (см. рис. 1, и, к), и прямым контактом с ОДКИ. В одной семяподобной структуре на 24-й ДПО в псевдоэмбриональной ткани с микропилярной стороны была обнаружена структура, напоминавшая зародыш на поздней глобулярной стадии развития (см. рис. 1, л). Поскольку его природу установить не удалось, далее мы будем использовать применительно к аналогичным структурам термин «псевдозародыш». Он характеризовался очень крупным широким суспензором, который контактировал с ОДКИ, и отсутствием видимой дифференциации клеток, включая клетки протодермы. Клетки псевдоэмбриональной ткани плотно прилегали к псевдозародышу.

Ход эмбриогенеза при гибридизации *S. lycopersicum* с *S. sisymbriifolium*

После гибридизации *S. lycopersicum* и *S. sisymbriifolium* проросшие пыльцевые зерна отмечали во всех проанализированных линиях (рис. 2, а). На 1-й ДПО во всех исследованных завязях присутствовали семяпочки только со зрелыми зародышевыми мешками. Хотя нами не установлено вращание пыльцевых трубок в семяпочку, на 3-й ДПО были обнаружены семяпочки с одной или двумя разрушенными синергидами и выявлены первые деления клеток эндосперма (см. рис. 2, б, в). Отмечалось начало дифференциации ИТ. В отдельных семяпочках наблюдалась деградация зародышевого мешка и вытягивание клеток внутренней эпидермы интегумента (см. рис. 2, г). Такие семяпочки останавливались в развитии и выявлялись в образцах на всех последующих стадиях развития.

Образцы, взятые на 10–15-й ДПО, значительно варьировали по наблюдаемым стадиям эмбриогенеза в зависимости от исследованной линии. В линиях Роз st9 и Роз Сон отмечались семена, развивающиеся по характерному для томатов пути. В таких развивающихся семенах линии Роз st9 выявлялся линейный проэмбрио, эндосперм из небольшого числа клеток, окруженный ИТ и формирующейся ОДКИ (см. рис. 2, д). При этом в линии Роз Сон на 15-й ДПО были обнаружены зародыши на стадии торпедо, окруженные эндоспермальной полостью (см. рис. 2, е), развитый эндосперм с дифференцированным слоем периферических клеток, окруженный ИТ, и развитая ОДКИ (см. рис. 2, ж). У контрольных растений соответствующие стадии развития семян линий Роз st9 и Роз Сон наблюдались на 5-й и 28-й ДПО соответственно. В образцах завязей линии st6 на 15-й ДПО отмечали наличие только

семяпочек без различимых изменений или с разрушенной синергидой.

Во всех исследованных линиях большинство семяпочек на 15-й ДПО останавливалось в развитии: их зародышевый мешок деградировал и замещался вытянутыми клетками внутренней эпидермы интегумента. Хотя в некоторых семяпочках линии Роз st9 клетки внутренней эпидермы интегумента начинали вытягиваться, с микропилярной стороны присутствовали клетки, не относящиеся к клеткам интегумента, а ОДКИ начинала дифференцироваться (см. рис. 2, з). Некоторые семяподобные структуры в линиях Роз st9 (на более ранней стадии развития) и Роз Сон (на более поздней стадии развития) были выполнены, как и у контрольных растений, псевдоэмбриональной тканью (см. рис. 2, и, к).

Во всех линиях на 20–30-й ДПО в исследованных образцах выявлялось только два типа семяподобных структур: выполненные псевдоэмбриональной тканью или псевдоэмбриональной тканью с зародышем на микропилярной стороне (см. рис. 2, л, м). Семян, развивающихся по типичному для томатов пути развития, не обнаружено. В обоих типах семяподобных структур псевдоэмбриональная ткань имела общие особенности (см. рис. 2, н, о): образование кластеров клеток, ограниченных более толстыми клеточными стенками на границах кластера; отсутствие запасяющих веществ; прямой контакт с ОДКИ без каких-либо специализированных клеток. Некоторые клетки псевдоэмбриональной ткани, чаще всего на периферии, имели зернистую цитоплазму и интенсивно окрашивались сафранином (см. рис. 2, м, о).

Каплевидный псевдозародыш всегда выявлялся с микропилярной стороны и контактировал с ОДКИ своей узкой частью, напоминающей суспензор (см. рис. 2, л, м). Суспензор у некоторых псевдозародышей был линейным и состоял из одного ряда клеток, а у более крупных псевдозародышей – из нескольких рядов клеток, расширяясь акропетально, в силу чего точную границу между псевдозародышем и суспензором провести было невозможно (см. рис. 2, л, м). Только у самых крупных псевдозародышей наружные клетки были сравнительно уплощенными (см. рис. 2, м), тогда как в большинстве случаев видимая дифференциация клеток, в том числе клеток протодермы, отсутствовала (см. рис. 2, л). Часть псевдозародышей была покрыта кутикулой (см. рис. 2, л). Прилежащие клетки псевдоэмбриональной ткани всегда плотно прилегали к псевдозародышу и не демонстрировали следов разрушения. В некоторых семяподобных структурах отмечалась деградация псевдозародыша и псевдоэмбриональной ткани (см. рис. 2, н) или деградация только псевдозародыша (см. рис. 2, р).

Завязываемость плодов при гибридизации *S. lycopersicum* и *S. sisymbriifolium* и культивирование изолированных семязачатков и зародышей

При самоопылении родительских генотипов средняя завязываемость плодов у крупноплодных томатов Роз Сон, Роз st9 в 2024 г. составила 82.6 ± 2.1 %, у томатов черри

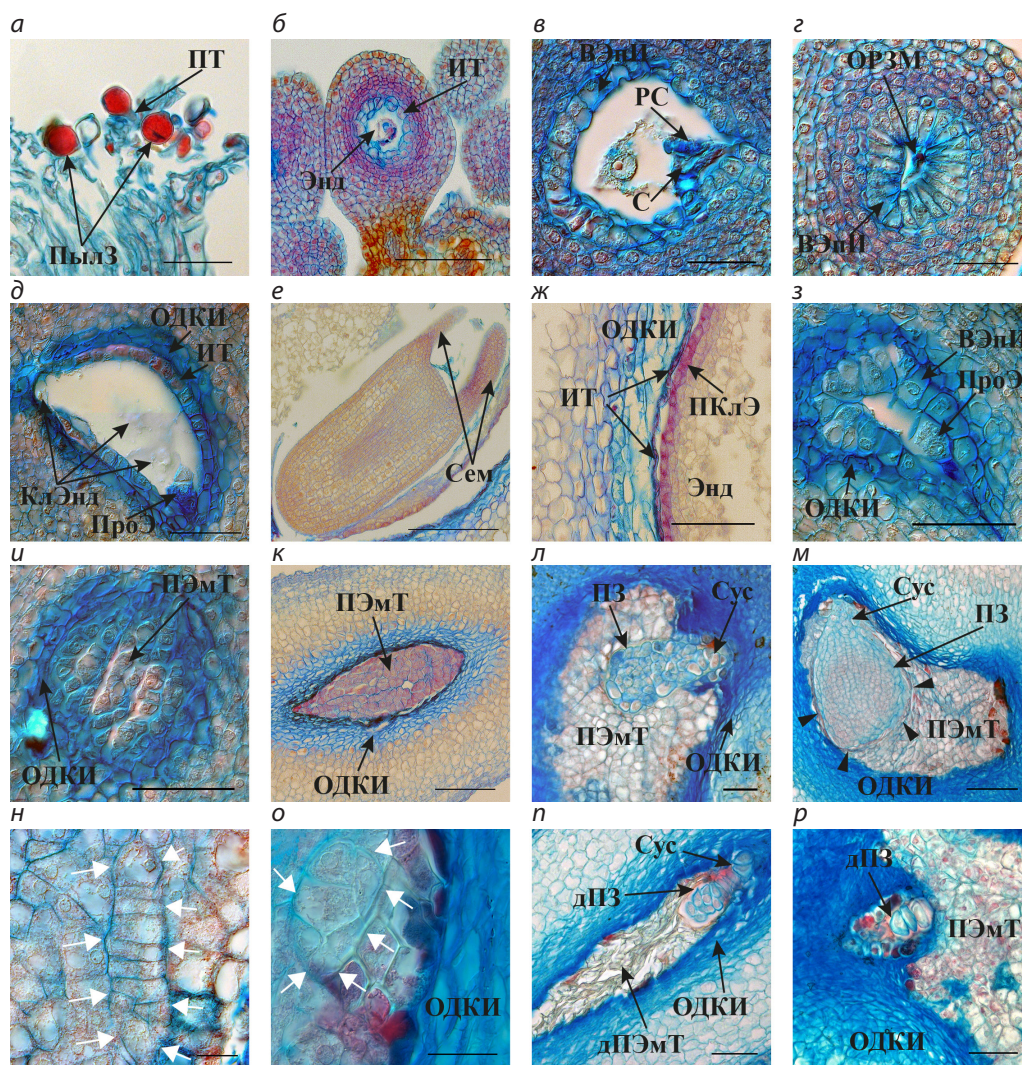


Рис. 2. Развитие семян и семяподобных структур при опылении *S. lycopersicum* пыльцой *S. sisymbriifolium*. а – проросшие пыльцевые зерна на воспринимающей поверхности рыльца, 3 ДПО; б – первые деления клеток эндосперма, 3 ДПО; в – семяпочка с разрушенной синергидой, 3 ДПО; г – вращение клеток внутренней эпидермы интегумента в разрушенный зародышевый мешок, 3 ДПО; д – проэмбрио, окруженный клеточным эндоспермом (ядра находятся вне фокуса), 15 ДПО; е – зародыш на стадии торпеды, 15 ДПО; ж – область контакта эндосперма с интегументальным тапетумом, 15 ДПО; з – вращение клеток внутренней эпидермы интегумента в область зародышевого мешка при сохранении проэмбрио, 15 ДПО; и – семяподобная структура с псевдоэмбриональной тканью, окруженной ОДКИ, 15 ДПО; к – семяподобная структура с разросшейся псевдоэмбриональной тканью и развитой ОДКИ, 15 ДПО; л – псевдозародыш на глобулярной стадии развития, 28 ДПО; м – крупный псевдозародыш на глобулярной стадии развития, 30 ДПО; н – кластер клеток в псевдоэмбриональной ткани, 28 ДПО; о – область контакта псевдоэмбриональной ткани и ОДКИ, 30 ДПО; п – деградирующая псевдоэмбриональная ткань и псевдозародыш, 29 ДПО; р – деградирующий псевдозародыш при неразрушенной псевдоэмбриональной ткани, 30 ДПО. ВЭнИ – внутренняя эпидерма интегумента; дПЗ – деградирующий псевдозародыш; дПЭМТ – деградирующая псевдоэмбриональная ткань; ИТ – интегументальный тапетум; КЛЭнд – клетки эндосперма; ОДКИ – область деградации клеток интегумента; ОРЗМ – остатки разрушенного зародышевого мешка; ПЗ – псевдозародыш; ПКЛЭ – периферические клетки эндосперма; ПроЭ – проэмбрио; ПТ – пыльцевая трубка; ПылЗ – пыльцевое зерно; ПЭМТ – псевдоэмбриональная ткань; РС – разрушенная синергида; С – синергида; Сем – семядоли; Сус – суспensor; Энд – эндосperm. Белые стрелки указывают на границы кластера клеток в псевдоэмбриональной ткани, черные треугольники – на вытянутые клетки псевдоэмбриональной ткани на границе с зародышем. Масштабная линейка: н, о – 25 мкм; в, г, з – 30 мкм; а, д, з, и, л, п, р – 50 мкм; б, ж, к, м – 100 мкм; е – 200 мкм.

st8, st6(лик), st6, st4 – 86.9 ± 6.7 %. При опылении паслена пыльцой томата развития завязей ни в одной комбинации скрещивания не наблюдали.

Завязываемость плодов и число развивающихся семязачатков при скрещивании *S. lycopersicum* с *S. sisymbriifolium*

в большей степени зависели от генотипа материнского растения, а не его принадлежности к определенной группе (рис. 3). Высокой завязываемостью плодов обладала линия крупноплодного томата Роз st9 и линия томатов-черри st6(лик). Низкой завязываемостью плодов отличалась ли-

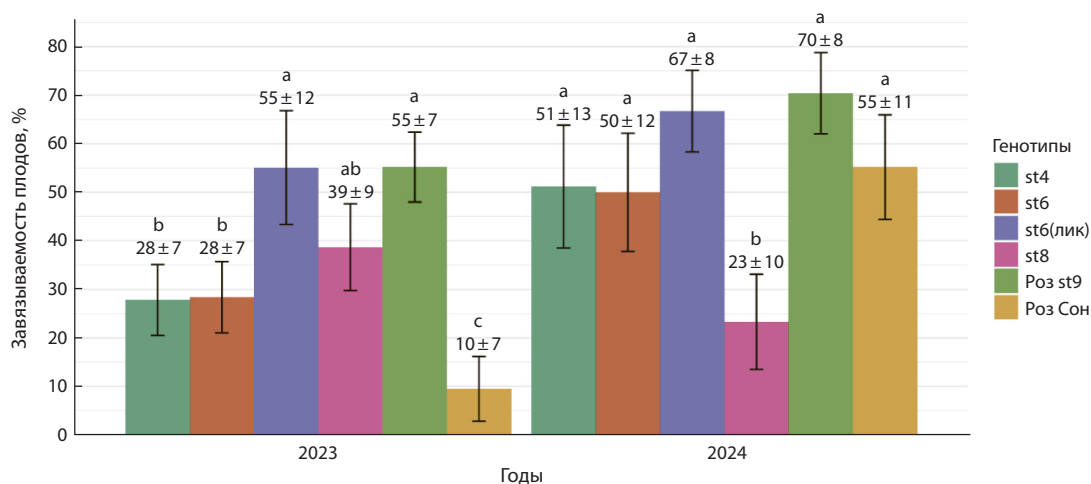


Рис. 3. Завязываемость плодов при гибридизации *S. lycopersicum* и *S. sisymbriifolium*.

Столбцы диаграммы, отмеченные одинаковыми буквами (a, b, c), не имеют существенного различия на 5 % уровне значимости ($p \leq 0.05$).

ния черри st8. На завязываемость плодов влияли также условия года; в среднем в 2023 г. завязываемость у всех генотипов, кроме st8, была ниже, однако общая тенденция по генотипам сохранялась.

В 2023 г. было изолировано 123 семязачатка комбинации Поз st9×Sn, 87 семязачатков Поз Сон×Sn, 42 семязачатка st6×Sn, 72 семязачатка st6(лик)×Sn, 45 семязачатков st8×Sn, 88 семязачатков st4×Sn. В результате культивирования изолированных семязачатков в 2023 г. не было получено растений-регенерантов.

В 2024 г. была проведена изоляция 275 увеличенных в размере семязачатков комбинации Поз st9×Sn, 97 семязачатков Поз Сон×Sn, 127 семязачатков st6×Sn, 304 семязачатков st6(лик)×Sn, 117 семязачатков st8×Sn, 178 семязачатков st4×Sn. При культивировании увеличенных в размере семязачатков на питательных средах преимущественно наблюдали потемнение или побеление семязачатков с последующей их гибелью. Увеличение размеров семязачатков, разрыв оболочки и прорастание зародыша отмечали только для комбинации st8×Sn у 2 % введенных семязачатков. У комбинаций st6×Sn и st6(лик)×Sn семязачатки увеличивались в размере без разрыва оболочки; их вскрывали вручную и извлекали зародыш. Из 58 % извлеченных зародышей комбинации st6×Sn формировался неорганогенный каллус, а из 30 % – органогенный каллус, из которого были регенерированы побеги; остальные зародыши погибли. У комбинации st6(лик)×Sn только из 1 % семязачатков формировался органогенный каллус, из которого были регенерированы растения. В результате нами получено три растения от комбинации st8×Sn, шесть растений от комбинации st6×Sn, два растения от комбинации st6(лик)×Sn и одно растение от комбинации st4×Sn.

У введенных в культуру *in vitro* комбинаций с крупноплодными томатами наблюдали либо гибель семязачатков, либо развитие каллуса, из которого не удалось регенерировать растения. У комбинации Поз Сон×Sn каллус формировался из 25 % введенных в культуру семязачатков, а у комбинации Поз st9×Sn – из 58 %.

Морфологические признаки полученных растений

Для выявления фенотипических отличий от родительских форм был проведен детальный анализ потомства от гибридизации *S. lycopersicum* × *S. sisymbriifolium* и родительских форм по 40 признакам. Далее мы сосредоточимся на описании растений, полученных от комбинаций st8×Sn и st6×Sn (Приложение)¹.

Растения от гибридизации *S. lycopersicum* × *S. sisymbriifolium* имели индетерминантный тип роста, но различались по интенсивности ростовых процессов. Так, потомство комбинации st8×Sn на момент измерения имело высоту от 152 до 186 см, в то время как высота линии st8 была 230 см, а паслена гулявниколистного – 160 см. Аналогичную тенденцию наблюдали при анализе потомства комбинации st6×Sn: высота линии st6 была 230 см, а высота потомства варьировала от 150 до 210 см.

Положение листа относительно стебля у потомства гибридных комбинаций st6×Sn и st8×Sn было полувертикальным, как у родительских линий томата, однако у растений № 3, 4 и 6 комбинации st6×Sn отмечали полупонижное положение листа, не характерное ни для одной из родительских форм. По признакам листовой пластинки было выявлено как промежуточное проявление признаков, так и появление новых признаков (см. табл. S1).

Анализ морфологических признаков плодов потомства от гибридной комбинации st8×Sn выявил промежуточную окраску плода между родительскими формами (см. табл. S2). У томата st8 была желто-зеленая окраска зрелых плодов, у паслена гулявниколистного – красная. Все потомство данной комбинации имело желто-оранжевую окраску, окраска мякоти также приобрела неравномерную желто-оранжевую окраску (рис. 4), причем у растений № 1 и 3 окраска была более интенсивная чем у растения № 2.

При анализе окраски плодов и мякоти у потомства комбинации st6×Sn не наблюдали расщепления: все плоды были оранжево-красными, как и родительская линия

¹ Табл. S1 и S2 Приложения см. по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx32.pdf>

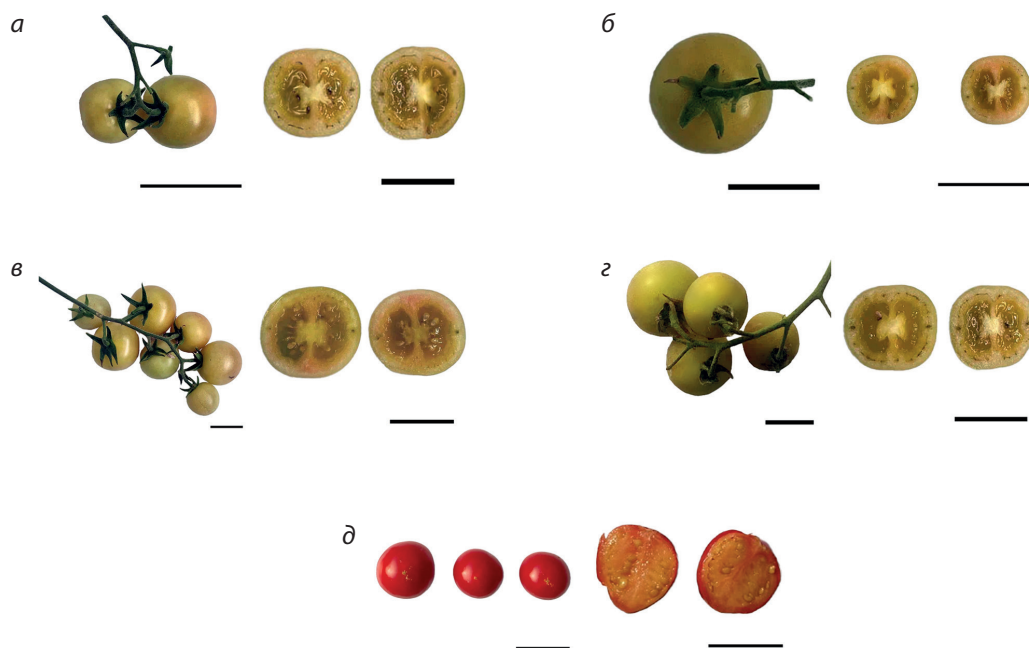


Рис. 4. Окраска плодов и мякоти у потомства комбинации st8xSn и родительских генотипов: а – st8xSn № 1; б – st8xSn № 2; в – st8xSn № 3; г – линия томата st8; д – *S. sisymbriifolium* Sn.
Масштабная линейка: а – 5 см; б–д – 2.5 см.

томата st6. Однако у растения st6xSn № 1 появились зеленые полосы на плоде перед созреванием, чего не было ни у одной из родительских форм. По форме продольного сечения плода наблюдали расщепление: у растений st6xSn № 3, 4, 5, 6 была сердцевидная форма продольного сечения, как и у линии st6, у растения st6xSn № 2 – округлая, как у паслена. Форма продольного сечения st6xSn № 1 отличалась от родительских и была плоско-округлой.

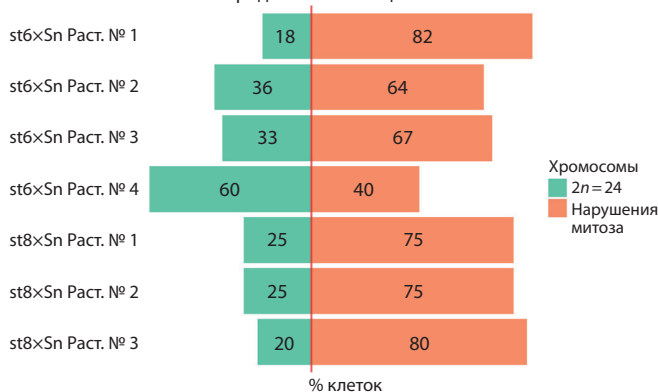
Анализ числа хромосом в меристемах и при микроспорогенезе

При анализе числа хромосом в меристемах корня наблюдали миксоплоидию у всех изученных растений, полученных от скрещивания томата с *S. sisymbriifolium*. Число

хромосом изменялось от 16 до 26. Доля клеток с ожидаемым числом хромосом $2n = 24$ сильно варьировала в зависимости от образца (рис. 5, а).

Наиболее стабильным по числу хромосом в меристемах корня было растение № 4 комбинации st6xSn: 60 % изученных клеток имели 24 хромосомы, а 40 % – 22 хромосомы. У остальных изученных растений комбинаций st6xSn и st8xSn доля клеток с ожидаемым числом хромосом была существенно меньше и не превышала 40 % (см. рис. 5, а). У растения st6xSn № 1 в 45 % исследованных клеток число хромосом составило 26, также встречались клетки с 19, 22 и 25 хромосомами. У растения st6xSn № 2 в 36 % исследованных клеток было 24 хромосомы, еще в 36 % – 26 хромосом, кроме того, были клетки с числом хромо-

а Частота нарушений митоза в апикальной меристеме корня гибридных комбинаций



б Нарушения мейоза при микроспорогенезе гибридных комбинаций

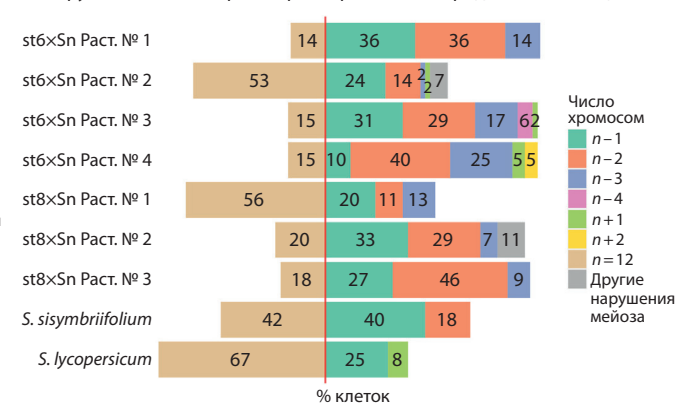


Рис. 5. Распределение клеток с ожидаемым числом хромосом и клеток с измененным числом хромосом при митозе в меристемах (а) и мейозе при микроспорогенезе (б).

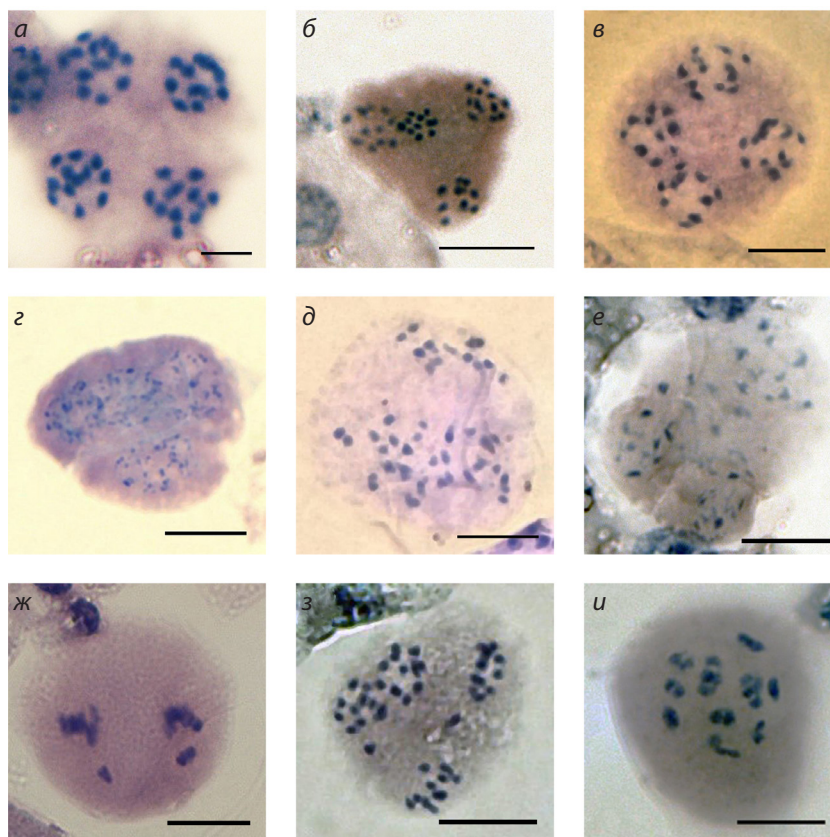


Рис. 6. Фрагменты цитологических препаратов с хромосомами мейотических клеток: а – паслена гулявниколистного Sn (телофаза II); б – st6xSn № 2 (телофаза II); в – томата (телофаза II); з – st6xSn № 2 (телофаза II); д, е – st8xSn № 2 (телофаза II); ж – st8xSn № 2 (анафаза I); з – st8xSn № 3 (телофаза II); u – st6xSn № 3 (профаза I).

Масштабная линейка: 10 мкм.

сом 16, 20, 22. У растения st6xSn № 3 33 % изученных клеток имели 24 хромосомы, еще 33 % – 26 хромосом, у 25 % наблюдали 22 хромосомы, единичные клетки имели 20 хромосом. У растений st8xSn не встречались клетки с увеличенным числом хромосом, изменения варьировали в пределах 20–23 хромосом на клетку.

При анализе микроспорогенеза родительских форм томата отмечено 33 % клеток с измененным числом хромосом, а у *S. sisymbriifolium* – 58 % клеток с измененным количеством хромосом. У потомства от их гибридизации доля клеток с измененным числом хромосом и другими нарушениями мейоза достигала 86 % (см. рис. 5, б). Число хромосом в мейотических клетках растений, полученных от скрещивания томата с *S. sisymbriifolium*, варьировало в широких пределах – от 8 до 14 хромосом на клетку.

Наиболее часто отмечали нарушения деления, приводящие к образованию анеуплоидных микроспор в тетраде с числом хромосом $n - 1$, $n - 2$, $n - 3$ (см. рис. 5, б). Кроме того, наблюдали спонтанное удвоение числа хромосом у растения № 2 комбинации st6xSn (рис. 6, з), клетки с нарушениями деления, связанными с неравномерным распределением хромосом в телофазе мейоза II у растений № 1 и 2 комбинации st8xSn, (см. рис. 6, д, е), № 4 st6xSn. У растений № 2 и 3 st6xSn, № 1–3 st8xSn отметили нарушения мейоза, представляющие собой нерасхождение

или отставание хромосом в метафазе и телофазе мейоза II (см. рис. 6, ж, з). Помимо этого, наблюдали формирование унивалентов, тривалентов и бивалентов с одной хиазмой у st8xSn № 2, st6xSn № 2 и 3 (см. рис. 6, u).

Обсуждение

Определение природы полученных в результате скрещивания растений всегда остается одной из главных задач любого исследования по межвидовой гибридизации. Результаты предшествующих работ по гибридизации *S. lycopersicum* и *S. sisymbriifolium* носят противоречивый характер: одни авторы считали полученные растения гаплоидами или удвоенными гаплоидами (Chambonnet, 1996; Bal, Abak, 2003), другие идентифицировали их как истинные межвидовые гибриды (Piosik et al., 2019). В данном исследовании мы получили растения, близкие по фенотипу к томату, как U. Bal и K. Abak (2003), однако придерживаемся мнения, что они имеют гибридную природу.

Как в контрольных образцах, так и у растений из всех изученных линий, которые опыляли пыльцой *S. sisymbriifolium*, за день до антезиса присутствовали только типичные зрелые зародышевые мешки (см. рис. 1, а), характерные для томатов (Cooper, 1931). Соответственно, все наблюдаемые нами особенности развития семяночек связаны с процессом оплодотворения или постзиготическим

этапом развития. В изученных нами линиях *S. lycopersicum* как при самоопылении, так и при гибридизации с *S. sisymbriifolium* было выявлено четыре пути развития семяпочек. При типичном ходе развития (см. рис. 1, б–е, рис. 2, а–в, д–ж) формировались характерные семена томатов, с развитым зародышем, окруженным клеточным эндоспермом, ИТ и ОДКИ. Кроме того, обнаружены три альтернативных пути развития: остановка в развитии (см. рис. 1, ж, рис. 2, з); образование псевдоэмбриональной ткани (см. рис. 1, з–к, рис. 2, ж, и); образование псевдоэмбриональной ткани с псевдозародышем (см. рис. 1, л, рис. 2, л–р). Из них два последних приводили к образованию семяподобных структур.

У всех исследованных растений чаще всего наблюдался вариант остановки в развитии семяпочек, вызванный деградацией зародышевого мешка и вытягиванием клеток внутренней эпидермы интегумента в освобождающееся пространство (см. рис. 1, ж, рис. 2, з) без дифференциации ИТ. Такой путь развития описывался ранее рядом авторов, а происхождение клеток, вытягивающихся в освобождающееся пространство, из внутренней эпидермы интегумента не вызывает сомнений (Паламарчук и др., 1975; Chaban et al., 2020). Однако в статье (Chaban et al., 2020) говорилось, что такие семяпочки могут продолжать развитие, чего не наблюдалось в нашем исследовании.

Более характерным результатом межвидовой гибридизации (см. рис. 2, л–р), нежели самоопыления (см. рис. 1, л), оказался третий альтернативный путь, приводящий к развитию внутри семяподобных структур псевдозародыша, окруженного псевдоэмбриональной тканью, что не отмечалось другими авторами (Chambonnet, 1996; Bal, Abak, 2003; Piosik et al., 2019). При этом все выявленные псевдозародыши находились на глобулярной или поздней глобулярной стадии развития (см. рис. 1, л, рис. 2, л, м). Остановка развивающихся семян гибридов на глобулярной стадии развития наблюдалась во многих исследованиях по гибридизации представителей Solanaceae и считается критической для преодоления постзиготического межвидового барьера для скрещивания (Baek et al., 2016; Roth et al., 2018; Piosik et al., 2019). Хотя авторы редко акцентируют внимание на природе окружающих зародыш тканей, игнорируя возможность образования у томатов псевдоэмбриональной ткани, для большинства гибридов описывается либо формирование нормального эндосперма, либо его гибель и образование увеличенного количества слоев ИТ (Baek et al., 2016; Roth et al., 2018), не похожего на псевдоэмбриональную ткань, наблюдаемую в нашей работе.

Отдельного внимания заслуживает природа обнаруженных псевдозародышей, окруженных псевдоэмбриональной тканью. Аналогичные аномалии описаны у некоторых покрытосеменных с унитегмальными семяпочками, для которых отмечено образование адвентивных зародышей из ИТ (Kapil, Tiwari, 1978). Однако во всех изученных образцах псевдозародыш формировался строго на микропиллярном полюсе, что не характерно для адвентивных зародышей, возникающих из ИТ в случайных местах. В пользу гибри-

догенного происхождения свидетельствуют семяпочки на ранних этапах после опыления, в которых, несмотря на начало пролиферации ИТ, в аналогичном положении выявлялись клетки, предположительно относящиеся к зародышу (см. рис. 2, з). Вероятно, в таких случаях происходит образование псевдоэмбриональной ткани из ИТ, тогда как на микропиллярном полюсе развивается зародыш. Поскольку нами не выявлено случаев деградации эндосперма при наличии псевдозародыша, кажется маловероятным, что такие семяподобные структуры могли сформироваться в результате замещения деградировавшего эндосперма псевдоэмбриональной тканью. Исходя из полученных результатов, мы предполагаем, что образованные псевдозародыши могут иметь гибридную природу.

В нашей работе на первом этапе мы вводили в культуру изолированные семязачатки, поэтому в культуру *in vitro* попадали как нормально развивающиеся семена, так и семяподобные структуры, которые в свою очередь могли быть как партенокарпическими, так и содержать зародыши. При культивировании изолированных семязачатков только у комбинации st8×Sn наблюдали относительно быстрый рост зародышей на питательной среде, который продолжился интенсивным развитием при пересадке в грунт, что сходно с наблюдениями (Bal, Abak, 2003). У комбинаций st6×Sn, st6(лик)×Sn, st4×Sn регенерация растений проходила через формирование органогенного каллуса из выделенных нами эмбриоидов, растения развивались медленно, большинство из них так и не удалось укоренить. Похожая тенденция роста отмечена в работе (Piosik et al., 2019).

По морфологическим признакам все полученные растения были близки к *S. lycopersicum*, как и в работах (Chambonnet, 1996; Bal, Abak, 2003), хотя чаще межвидовые гибриды с томатом имеют фенотип с выраженным проявлением признаков отцовского компонента (Gavrilenko et al., 2001; Piosik et al., 2019). При детальном анализе по фенотипу у всех изученных растений были обнаружены некоторые признаки *S. sisymbriifolium*, а также отмечено появление признаков, не характерных для родительских форм. Мы исключаем вероятность расщепления по фенотипу в потомстве родительской формы томата, поскольку для гибридизации использовали линии поздних поколений инбридинга, являющихся генетически стабильными.

При анализе числа хромосом в меристемах корня наблюдали миксоплоидию: количество хромосом варьировало от 16 до 26. U. Bal и K. Abak (2003) тоже сообщают о проявлении миксоплоидии в меристемах ($2n = 24–26$) у растений, полученных при гибридизации *S. lycopersicum* и *S. sisymbriifolium*, однако считают это признаком удвоения хромосом у гаплоидных растений. В отличие от результатов (Bal, Abak, 2003), в нашем исследовании значительная часть клеток имела количество хромосом меньше 24, а у растений от комбинации st8×Sn не было клеток с увеличенным числом хромосом. Уменьшение числа хромосом, по-видимому, связано с элиминацией хромосом *S. sisymbriifolium*. Миксоплоидия в меристемах может быть как маркером гибридного происхождения

растений, так и реакцией на регенерацию растений через каллус. Однако растения $st8 \times Sn$ были получены без образования каллуса, что говорит в пользу их гибридного происхождения. Кроме того, Е.В. Lindstrom и К. Koos (1931) из каллуса гаплоидного растения томата получили удвоенный гаплоид, микроспорогенез которого характеризовали как типичный, с формированием микроспор, содержащих 12 хромосом.

Ученые, занимавшиеся гибридизацией *S. lycopersicum* и *S. sisymbriifolium* (Chambonnet, 1996; Bal, Abak, 2003; Piosik et al., 2019), не изучали микроспорогенез у созданных ими растений. Т. Gavrilenko с коллегами (2001), получившие соматический гибрид *S. lycopersicum* и *S. etuberosum*, отмечают наличие унивалентов в мейотических клетках гибридов, а также отстающие хромосомы в анафазе, телофазе мейоза I, профазе мейоза II. В нашем исследовании тоже выявлены многочисленные нарушения мейоза I и II у полученных растений, проявившиеся в отставании хромосом, неравномерном распределении хромосом между дочерними клетками, формировании унивалентов, тривалентов и бивалентов с одной хиазмой. При этом у томата и *S. sisymbriifolium* отметили анеуплоидные клетки $n = n - 1$, что может объясняться воздействием высоких температур (33–37 °C) на растения при их выращивании (Schindfessel et al., 2023).

Принимая во внимание изученный нами комплекс процессов, происходящих после опыления *S. lycopersicum* пыльцой *S. sisymbriifolium*, скорость роста и характер морфогенеза в эмбриокультуре, различия фенотипов используемых линий томата и полученных растений, а также особенности их цитогенетики, мы считаем исследованные нами растения межвидовыми гибридами. Предположение о гибридной природе полученных растений требует дополнительных исследований, включающих разработку специфических молекулярных маркеров или оптимизацию протокола GISH (геномная гибридизация *in situ*), что выходит за рамки настоящей работы. Однако это не снижает значимость наших результатов и вносит вклад в понимание процессов, происходящих при гибридизации данных видов, а также открывает перспективы интрогрессии ценных признаков из *S. sisymbriifolium*, поскольку нами была показана возможность завязывания плодов у гибридных растений.

Заключение

При скрещивании *S. lycopersicum* и *S. sisymbriifolium* в развивающихся плодах наряду с семенами, характеризующимися типичным ходом эмбриогенеза и остановившимися в развитии семязачатками, были выявлены два альтернативных пути развития, приводящих к образованию семяподобных структур. Часть семяподобных структур представляет собой партенокарпические семена, выполненные псевдоэмбриональной тканью, образованной в результате пролиферации интегументального тапетума. Однако другие семяподобные структуры, помимо псевдоэмбриональной ткани, содержали остановившийся на глобулярной стадии зародыш. Расположение на микро-

пилярном полюсе и отсутствие свидетельств адвентивного происхождения позволяют предположить гибридогенную природу зародыша. Остановка в развитии зародышей, образование псевдоэмбриональной ткани на месте эндосперма подтверждают существование постзиготических барьеров, осложняющих проведение гибридизации между *S. lycopersicum* и *S. sisymbriifolium*.

Использование метода культивирования изолированных семязачатков и извлеченных из них эмбриоидов позволило получить 12 жизнеспособных растений при гибридизации линий томатов черри и *S. sisymbriifolium*. Все растения имели фенотип, близкий к фенотипу томата, но демонстрировали высокую хромосомную нестабильность в мейотических клетках. Кроме того, для комбинации скрещиваний *S. lycopersicum* и *S. sisymbriifolium* нами впервые были исследованы процессы микроспорогенеза и зафиксировано большое количество аномалий в мейозе I и II, связанных с неравномерным распределением хромосом между дочерними клетками, отставанием хромосом, формированием унивалентов, тривалентов, что свидетельствует в пользу предположения о гибридной природе изученных образцов.

Представленные данные вносят вклад в понимание процессов, происходящих при отдаленной гибридизации, и открывают перспективы использования *S. sisymbriifolium* как источника ценных признаков в селекции томата.

Список литературы / References

- Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г., Джалилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М.: Издательство МГУ, 2004.
- [Barykina R.P., Veselova T.D., Devyatov A.G., Dzhaliilova Kh.Kh., Iljina G.M., Chubatova N.V. Handbook of Botanical Microtechnique. Principles and methods. Moscow: MSU Publ., 2004 (in Russian)]
- Паламарчук И.А., Веселова Т.Д., Антонова Т.С. Особенности развития репродуктивных органов у томатов тепличной культуры. *Вестник Московского университета*. 1975;8(6):113-116
- [Palamarchuk I.A., Veselova T.D., Antonova T.S. Peculiarities of the reproductive organ development in glasshouse tomatoes. *Vestnik Moskovskogo Universiteta*. 1975;8(6):113-116 (in Russian)]
- Abbas M.M., Ghani M.A., Ziaf K., Khan T.N., Jahangir M.M., Awan F.S., Hussain M.M. Development and characterization of F₁ hybrid tomato by inter and intraspecific hybridization. *Pak J Agric Sci*. 2024;61(1):199-207. doi 10.21162/PAKJAS/24.218
- Ajazaruddin S.M., Lal M., Yadav A., Kumar N., Dhakad A., Sinha G., Singh B.P., Upadhyay A. Breeding for resistance against pest and diseases in tomatoes: a review. *J Sci Res Rep*. 2024;30(6):469-479. doi 10.9734/jsrr/2024/v30i62063
- Baek Y.S., Royer S.M., Broz A.K., Covey P.A., López-Casado G., Nuñez R., Kear P.J., Bonierbale M., Orillo M., van der Knaap E., Stack S.M., McClure B., Chetelat R.T., Bedinger P.A. Interspecific reproductive barriers between sympatric populations of wild tomato species (*Solanum* section *Lycopersicon*). *Am J Bot*. 2016;103(11):1964-1978. doi 10.3732/ajb.1600356
- Bal U., Abak K. Attempts of haploidy induction in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) via gynogenesis I: pollination with *Solanum sisymbriifolium* Lam. pollen. *Pak J Biol Sci*. 2003;6(8):745-749. doi 10.3923/pjbs.2003.745.749
- Biswas D., Haque S.M., Ghosh B. *Solanum sisymbriifolium* Lam.: an underutilised plant with future prospects in nutrition and medicine. *Proc Indian Natl Sci Acad*. 2023;89(3):445-469. doi 10.1007/s43538-023-00191-9



- Chaban I., Baranova E., Kononenko N., Khaliluev M., Smirnova E. Distinct differentiation characteristics of endothelium determine its ability to form pseudo-embryos in tomato ovules. *Int J Mol Sci.* 2020;21(1):12. doi 10.3390/ijms21010012
- Chambonnet D. Essais d'haploïdisation de la tomate. In: Report D'Activite 1995–1996 Station D'Amelioration Des Plantes Maraicheres D'Avignon-Montfavet, 1996;84-85
- Collonnier C., Fock I., Daunay M.C., Servaes A., Vedel F., Siljak-Yakovlev S., Souvannavong V., Sihachakr D. Somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. sisymbriifolium*, as a useful source of resistance against bacterial and fungal wilts. *Plant Sci.* 2003;164(5):849-861. doi 10.1016/S0168-9452(03)00075-X
- Cooper D.C. Macrosporogenesis and the development of the macrogametophyte of *Lycopersicon esculentum*. *Am J Bot.* 1931;18(9):739-748. doi 10.1002/j.1537-2197.1931.tb04945.x
- Flier W.G., Van Den Bosch G.B.M., Turkensteen L.J. Epidemiological importance of *Solanum sisymbriifolium*, *S. nigrum* and *S. dulcamara* as alternative hosts for *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol.* 2003;52(5):595-603. doi 10.1046/j.1365-3059.2003.00922.x
- Foolad M.R. Genome mapping and molecular breeding of tomato. *Int J Plant Genomics.* 2007;2007(1):64358. doi 10.1155/2007/64358
- Gavrilenko T., Thieme R., Rokka V.M. Cytogenetic analysis of *Lycopersicon esculentum* (+) *Solanum etuberosum* somatic hybrids and their androgenetic regenerants. *Theor Appl Genet.* 2001;103(2):231-239. doi 10.1007/s001220100626
- Hajihassani A., Rutter W.B., Schwarz T., Woldemeskel M., Ali M.E., Hamidi N. Characterization of resistance to major tropical root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in *Solanum sisymbriifolium*. *Phytopathology.* 2020;110(3):666-673. doi 10.1094/PHYTO-10-19-0393-R
- Harberd D.J. A simple effective embryo culture technique for brassica. *Euphytica.* 1969;18:425-429. doi 10.1007/BF00397792
- Kapil R.N., Tiwari S.C. The integumentary tapetum. *Bot Rev.* 1978;44(4):457-490. doi 10.1007/BF02860847
- Kirov I., Divashuk M., Van Laere K., Soloviev A., Khurstaleva L. An easy "SteamDrop" method for high quality plant chromosome preparation. *Mol Cytogenet.* 2014;7(1):21. doi 10.1186/1755-8166-7-21
- Lindstrom E.W., Koos K. Cyto-genetic investigations of a haploid tomato and its diploid and tetraploid progeny. *Am J Bot.* 1931;18(6):398-410. doi 10.1002/j.1537-2197.1931.tb09599.x
- Piosik L., Ruta-Piosik M., Zenkteler M., Zenkteler E. Development of interspecific hybrids between *Solanum lycopersicum* L. and *S. sisymbriifolium* Lam. via embryo calli. *Euphytica.* 2019;215(2):31. doi 10.1007/s10681-019-2358-9
- Roth M., Florez-Rueda A.M., Griesser S., Paris M., Städler T. Incidence and developmental timing of endosperm failure in post-zygotic isolation between wild tomato lineages. *Ann Bot.* 2018;121(1):107-118. doi 10.1093/aob/mcx133
- Rubio F., Alonso A., Garcia-Martínez S., Ruiz J.J. Introgression of virus-resistance genes into traditional Spanish tomato cultivars (*Solanum lycopersicum* L.): effects on yield and quality. *Sci Hortic.* 2016;198:183-190. doi 10.1016/j.scienta.2015.11.025
- Ruzin S.E. Plant Microtechnique and Microscopy. Oxford University Press, 1999
- Sadashiva A.T., Hanson P., Reddy M.K., Ravishankar K.V., Prasad M., Prasanna H.C., Madhavi Reddy K., ... Kumar M., Kaushal A., Rai A.K., Jatav V., Bhat L. Breeding tomato (*Solanum lycopersicum* L.) for resistance to biotic and abiotic stresses. *J Hortl Sci.* 2017;12(2):91-105. doi 10.24154/jhs.v12i2.2
- Schindfessel C., De Storme N., Trinh H.K., Geelen D. Asynapsis and meiotic restitution in tomato male meiosis induced by heat stress. *Front Plant Sci.* 2023;14:1210092. doi 10.3389/fpls.2023.1210092
- Yerasu S.R., Gowda M.T., Krishna R., Kaur C., Singh S., Saha S., Kumar R. Development of interspecific hybrids through embryo rescue for heat-stable nematode resistance (*Mi-9* gene) from *Solanum arcanum* in tomato. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2023;154(3):703-711. doi 10.1007/s11240-023-02544-0

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 29.11.2025. После доработки 18.02.2026. Принята к публикации 23.03.2026.

doi 10.18699/vjgb-26-60

Дифференциация субгеномов среди StY-геномных видов рода *Elymus* (Triticeae, Poaceae) с территории России по данным секвенирования ядерного гена *GBSS1* (*waxy*)

А.В. Агафонов , Е.В. Шабанова (Кобозева) ¹, А.А. Бондарь ², О.В. Дорогина ¹¹ Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия² Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия agalex@mail.ru

Аннотация. По последним данным, на территории России распространены 55 видов рода *Elymus*, которые являются носителями трех субгеномных комбинаций: StH, StY и StHY. Среди них StY-геномная группа насчитывает всего 10 видов с разной степенью изученности эволюционных связей. Предковые таксоны рода *Pseudoroegneria* были донорами субгенома St для всех современных видов рода *Elymus*. StY-геномная группа видов обладает дополнительным субгеномом Y с неизвестным происхождением, который по некоторым сведениям близок к субгеному St. Нами изучены филогенетические взаимоотношения между StY-геномными видами с территории России, пятью видами рода *Pseudoroegneria* и пятью видами рода *Hordeum* из Генбанка NCBI путем сравнения нуклеотидных последовательностей ядерного гена *GBSS1* с 9-го по 14-й экзон. Проведен анализ участков более консервативных экзонов в сравнении с интронами, которые не кодируют аминокислотные последовательности фермента. Все варианты гена из субгеномов St у изученных видов подразделяются на три кластера сообразно трем маркерным группам нуклеотидных последовательностей клонов рода *Pseudoroegneria*: центральноазиатской (St₁) с реперным видом *P. strigosa*, североамериканской (St₂) с маркирующим видом *P. spicata* и ближневосточной (St₃) с двумя видами – *P. tauri* и *P. libanotica*, к которым тяготеет восточноевропейский вид *P. stipifolia*. Ни у одного из изученных видов субгеном H, имеющий происхождение от предковых таксонов рода *Hordeum* (*Critesion*), не обнаружен. Что касается Y-субгенома в варианте «интроны», то в целом этот кластер менее дифференцирован, чем в варианте «экзоны». Данный факт противоречит сложившимся представлениям о большей консервативности геномных участков, ответственных за синтез ферментных молекул. Среди наиболее примечательных характеристик в сравнении нуклеотидных последовательностей следует отметить наличие особой дальневосточной расы *E. gmelinii* с последовательностями St₃ вместо St₁ и расположение последовательностей всех клонов северо-казахстанского образца *E. fedtschenkoi* KSA-0935 в кластере St₂ вместо St₃.

Ключевые слова: молекулярные маркеры; филогения; субгеном; таксономия; *Elymus*; *Pseudoroegneria*

Для цитирования: Агафонов А.В., Шабанова (Кобозева) Е.В., Бондарь А.А., Дорогина О.В. Дифференциация субгеномов среди StY-геномных видов рода *Elymus* (Triticeae, Poaceae) с территории России по данным секвенирования ядерного гена *GBSS1* (*waxy*). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(4):581-592. doi 10.18699/vjgb-26-60

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ЦСБС СО РАН № 126021617423-1 «Разработка научных основ и технологий оценки, сохранения и восстановления природного и культурного биоразнообразия, в том числе редких видов растений, и их рационального использования». Использованы материалы биоресурсных научных коллекций ЦСБС СО РАН УНУ № 440534 и УНУ № 440537 (Гербарии NS, NSK). Секвенирование ДНК выполнено в ЦКП «Геномика» (FWGN-2025-0017, ИХБФМ СО РАН, Новосибирск).

Differentiation of subgenomes in StY-genomic species of the genus *Elymus* (Triticeae, Poaceae) from the territory of Russia according to sequencing data of the nuclear gene *GBSS1* (*waxy*)

А.В. Агафонов , Е.В. Шабанова (Кобозева) ¹, А.А. Бондарь ², О.В. Дорогина ¹¹ Central Siberian Botanical Garden of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia agalex@mail.ru

Abstract. According to the latest data, 55 species of the genus *Elymus* are distributed in Russia, carrying three subgenomic combinations (StH, StY, and StHY). Among them, the StY-genomic group comprises only 10 species, with varying degrees of understanding of their evolutionary relationships. Ancestral taxa of the genus *Pseudoroegneria* donated the St subgenome to all modern species of the genus *Elymus*. The StY-genomic group of species possesses an additional Y subgenome of unknown origin, which, according to some data, is close to the St subgenome. We studied the phylogenetic relationships between StY-genomic species from Russia, five species of the genus *Pseudoroegneria*, and five species of the genus *Hordeum* from the NCBI GenBank by comparing the nucleotide sequences of the nuclear gene *GBSS1*

from exons 9 to 14. One of the main objectives was a comparative analysis of phylogenetic patterns based on (i) more conservative exons and (ii) introns that do not encode the amino acid sequences of the enzyme. All gene variants from the **St** subgenomes of the studied species are divided into three clusters according to three marker groups of nucleotide sequence of clones in the genus *Pseudoroegneria*: Central Asian (**St**₁) with the reference species *P. strigosa*, North American (**St**₂) with the marker species *P. spicata*, and Middle Eastern (**St**₃) with two species, *P. tauri* and *P. libanotica*, to which the Eastern European species *P. stipifolia* gravitates. The **H** subgenome, originating from ancestral taxa of the genus *Hordeum* (*Critesion*), was not detected in any of the studied species. The cluster of **Y** subgenome in the “introns” variant is generally visually less differentiated than in the “exons” variant. This fact contradicts the established notion that gene regions responsible for the synthesis of enzymatic molecules are more conserved. Among the most notable characteristics in the comparison of nucleotide sequences is the presence of a special Far Eastern race of *E. gmelinii* with **St**₃ sequences instead of **St**₁ and the location of the sequences of all clones of the North Kazakhstan accession *E. fedtschenkoi* KSA-0935 in the **St**₂ cluster instead of **St**₃.

Key words: molecular markers; phylogeny; subgenome; taxonomy; *Elymus*; *Pseudoroegneria*

For citation: Agafonov A.V., Shabanova (Kobozeva) E.V., Bondar A.A., Dorogina O.V. Differentiation of subgenomes in **StY**-genomic species of the genus *Elymus* (Triticeae, Poaceae) from the territory of Russia according to sequencing data of the nuclear gene *GBSS1* (*waxy*). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(4):581-592. doi 10.18699/vjgb-26-60

Введение

Род многолетних аллополиплоидных трав *Elymus* L. является крупнейшим в трибе Triticeae Dumort. (Poaceae Barnh.). В мире насчитывается от 150 до 200 видов с различной геномной конституцией, для которых объединяющим считают субгеном **St**. По обобщенным данным, этот субгеном присутствует у разных таксонов как минимум в восьми комбинациях с шестью другими субгеномами предковых таксонов трибы: **H**, **Y**, **P**, **W**, **Ns** и **Xm** (Tan et al., 2024). К настоящему времени обозначилась тенденция к разделению рода *Elymus* s. l. на восемь самостоятельных родов, в том числе *Elymus* s. str. (**StH**), *Roegneria* C. Koch (**StY**), *Douglasdeweya* C. Yen, J.L. Yang & B.R. Baum (**StP**), *Campeiostrachys* Drobow (**StYH**), *Kengyilia* C. Yen & J.L. Yang (**StYP**), *Anthosachne* Steudel (**StYW**), *Pascopyrum* Á. Löve (**StHNSxm**) и *Connorochloa* Barkworth, S.W.L. Jacobs & H.Q. Zhang (**StYWH**).

Поскольку род относится к третичному генпулу (**GP-3**) основных хлебных культур, его представители часто включались в детальные цитогенетические исследования (Dewey, 1984). В последние десятилетия цитогенетический метод определения геномной конституции видов стал дополняться и даже вытесняться более технологичными методами секвенирования последовательностей ДНК (Mason-Gamer, 2001; Vaum et al., 2003). Внимание исследователей смещается в сторону анализа происхождения и филогенетических отношений между базисными субгеномами с использованием молекулярно-генетических методов.

Основное разнообразие видов **StY**-геномной группы приходится на территории Китая, Кореи и Японии. Опубликован ряд данных о филогенетических связях между **St**- и **Y**-субгеномами, имеющих достаточно противоречивый характер. В частности, в поисках донора субгенома **Y** была проведена гибридизация между диплоидными видами *Hordeum* L. (носитель субгенома **H**) и **StY**-геномными азиатскими видами *Elymus*. Триплоидные гибриды характеризовались сравнительно невысоким уровнем спаривания хромосом в метафазе I, что является доказательством крайне низкой гомологии между гапломами **H**, **St** и **Y** и, соответственно, отсутствия гаплома **H** у этих видов *Elymus*

(Lu, von Bothmer, 1990). Кроме того, на основании анализа хромосомного спаривания у гибридов было показано низкое родство субгеномов **St** и **Y** (Sakamoto, 1964; Lu, von Bothmer, 1989).

Были проанализированы ядерный рибосомный внутренин транскрибируемый спейсер (ITS) и последовательности межгенного спейсера *trnL-F* хлоропластов у 457 образцов *Elymus*, содержащих различные геномы. Результаты подтвердили, что субгеномы **St**, **H**, **P** и **W** полиплоидных *Elymus* были привнесены из родов *Pseudoroegneria* (Nevski) Á. Löve, *Hordeum*, *Agropyron* Gaertn. и *Australopyrum* (Tzvelev) Á. Löve соответственно, но при этом субгеномы **St** и **Y** филогенетически восходят к общему предку (Liu et al., 2006).

В другом исследовании один из маркеров RAPD, специфичный для **Y**-субгенома, был преобразован в маркер сайта с маркированной последовательностью (sequence tagged site, STS). Этот модифицированный маркер STS подтвердил наличие **Y**-субгенома у 42 образцов **StY**-геномных видов *Elymus* (Okito et al., 2009). Для выявления возможных доноров субгенома **Y** с помощью STS-маркера были проанализированы 43 образца диплоидного вида *Pseudoroegneria*, имеющие субгеном **St**. По выводу авторов, у некоторых **StY**-геномных видов *Elymus* обнаружен именно такой вариант субгенома **Y**, общий с геномом **St** *Pseudoroegneria*, т. е. субгеном-предшественник, обозначенный как **StY**.

Позднее был проанализирован однокопийный ядерный ген, кодирующий фактор элонгации G (*EF-G*) среди 28 образцов полиплоидных видов *Elymus* и 45 образцов диплоидных видов трибы Triticeae (Sun, Komatsuda, 2009). Данные подтвердили гипотезу о том, что субгеном **Y** возник у диплоидного вида, но имеет другое происхождение в сравнении с субгеномом **St**. Этот вывод был поддержан на примере однокопийного ядерного гена РНК-полимеразы II (*RPB2*) из 58 образцов видов *Pseudoroegneria* и *Elymus* (Yan et al., 2011).

Далее, основываясь на топологии филогенетического дерева при использовании некодирующих последовательностей ДНК хлоропластов из 56 образцов девяти полиплоидных видов *Elymus*, авторы показали, что **St**- и **Y**-суб-

геномы не были получены от одного и того же донора, а **Y**-субгеном, вероятно, произошел от **H**-генома видов *Hordeum* (Song et al., 2015).

В последнем по времени сообщении были сделаны следующие важные выводы на основе анализа данных о последовательностях трех участков ядерной ДНК (*Acc1*, *DMC1* и *Pgk1*) и трех участков хлоропластной ДНК (*nrITS*) (*matK*, *rbcL* и *trnL-trnF*) (Pan et al., 2025).

1. Полиплоидные виды Triticeae, состоящие из геномов разных типов, следует рассматривать как отдельные рода.
2. Некоторые полиплоидные виды с геномом **St** претерпели независимые события аллополиплоидизации в разных регионах распространения.
3. Геном **Y** произошел от неизвестного или вымершего диплоидного вида, близкородственного *Peridictyon sanctum* (Janka) Seberg, Fred. & Baden, который распространен на Балканском полуострове (геном **Xp**).

В этом ключе мы склоняемся к точке зрения, высказанной тремя годами ранее, в которой предложен вариант автотетраплоидного происхождения субгенома **Y** в процессе рекуррентной гибридизации (Liu et al., 2022). Согласно этим данным, сложные геномы **St** у предков рода *Pseudoroegneria* в полиплоидном состоянии могли получить больше возможностей для внутривидовой дифференциации в процессе повторной и возвратной гибридизации. В результате модифицированные варианты геномов **St** у некоторых линий эволюционировали в промежуточные геномы **St^Y**.

Таким образом, одним из вероятных представляется происхождение современного **Y**-субгенома от таксонов рода *Pseudoroegneria*, несущих предковые варианты **St**-субгенома, а происхождение **Y**-субгенома от достаточно отдаленных геномов **H** и **Xp** видится маловероятным.

Как неоднократно показано в работах исследовательской группы R.J. Mason-Gamer с 1998 по 2024 г., одним из эффективных генетических маркеров макро- и микроэволюционных взаимоотношений между таксонами разных уровней может служить ядерный ген гранул-связанной синтазы крахмала 1 (*GBSS1*, *waxy*). Впервые схема гена была приведена на примере *Zea mays* (Mason-Gamer et al., 1998), но сведения о его специфичности среди североамериканских видов рода *Elymus* были опубликованы тремя годами позже (Mason-Gamer, 2001).

Нами была подтверждена целесообразность использования этого гена в качестве индикатора микроэволюционных процессов среди видов рода *Elymus* (Агафонов и др., 2019, 2024; Agafonov et al., 2024). Принято считать, что последовательности интронов не испытывают на себе жесткого эволюционного отбора, следовательно, в них может закрепляться множество промежуточных микроэволюционных событий (замен, вставок и др.), которые происходили в процессе эволюции субгеномов. При этом биологическая функция интронов, как одной из составных частей нуклеотидных последовательностей ряда функциональных генов, представляется достаточно важной в отношении регуляции экспрессии генов (Koonin, 2006).

По последним данным (Цвелёв, Пробатова, 2019), на территории России распространены 55 видов рода *Elymus*, которые являются аллотетра- и аллогексаплоидами с геномами **StStHH**, **StStYY** и **StStHHYY** (Агафонов и др., 2020). Среди них **StY**-геномная группа насчитывает всего 10 видов с разной степенью изученности эволюционных связей.

Ранее нами были предложены новые комбинации таксонов в этой группе в более широком понимании, в частности для *E. pendulinus* (Nevski) Tzvelev s. l. (Кобозева, Агафонов, 2015) и *E. ciliaris* (Trin.) Tzvelev s. l. (Agafonov et al., 2021; Shabanova (Kobozeva), Agafonov, 2023). Видовые границы при этом очерчены исходя из «принципа микроэволюционных комплексов», т. е. совокупности близкородственных таксонов, которая определяет филогенетическое единство вида и отвечает другим критериям. Базовый вид включает в себя внутривидовые таксоны согласно выявленному родству на основе репродуктивных и молекулярно-генетических критериев. Данный принцип может обеспечить методологическое взаимодействие фундаментальных основ традиционной систематики, с одной стороны, и экспериментальной биологии, включающей современные подходы и методы, – с другой. В результате общее число **StY**-геномных видов на территории России сократилось до семи.

В рамках настоящей работы поставлена цель проследить эволюционные связи между **St**-субгеномами, а также оценить местоположение **Y**-субгенома на эволюционном древе среди **StY**-геномных видов *Elymus* с территории России при сравнении нуклеотидных последовательностей фрагментов гена *GBSS1* с 9-го по 14-й экзон. В частности, ставилась задача выяснить различия в филогенетической картине на основе последовательностей более консервативных экзонов в сравнении с интронами, не участвующими в конечном синтезе молекул фермента.

Материалы и методы

Растительный материал. В исследование включено 32 природных образца всех **StY**-геномных видов из списочного состава согласно Н.Н. Цвелёву и Н.С. Пробатовой (2019). Все эти образцы из нашей коллекции прошли морфологическое подтверждение таксономического ранга на экспериментальных делянках открытого грунта и в климатической камере на предмет соответствия современным описаниям таксонов (табл. S1 Приложения)¹.

Два европейских вида *E. caucasicus* (C. Koch) Tzvelev и *E. panormitanus* (Parl.) Tzvelev отсутствуют в нашей живой коллекции. Центральноазиатский вид *E. abolinii* (Drobow) Tzvelev дополнительно включен в сравнительный анализ, поскольку у нас есть предположение о его произрастании в пределах России, но доказательства в настоящее время отсутствуют.

В качестве реперных были взяты последовательности гена *GBSS1* пяти видов рода *Pseudoroegneria* и пяти видов рода *Hordeum* из Генбанка NCBI (URL: <http://www.ncbi>).

¹ Табл. S1 Приложения см. по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx33.pdf>

Образцы реперных видов и номера нуклеотидных последовательностей, взятых из GenBank NCBI

Вид	Образец, происхождение	Номер в NCBI
<i>Pseudoroegneria strigosa</i> (Schult.) Á. Löve	PI 499637 China	EU282323 St
	PI 531755 China	AY360823 St
<i>P. spicata</i> (Pursh) Á. Löve	PI 232117 USA	AF079281 St
	PI 610986 USA	AY010999 St
<i>P. libanotica</i> (Hack.) D.R. Dewey	PI 228391 Iran	EU282324 St
<i>P. tauri</i> (Boiss. & Balansa) Á. Löve	PI 380652 Iran	EU282326 St
<i>P. stipifolia</i> (Czern. ex Nevski) Á. Löve	PI 313960 Russia	JX259496 St
<i>Hordeum jubatum</i> L.	RJMG 106 USA	AY010963 H
<i>H. bogdanii</i> Wilensky	PI 531760 China	EU282317 H
<i>H. brevisubulatum</i> (Trin.) Link	PI 401387 Iran	AY010961 H
<i>H. pusillum</i> Natt.	Clho 15654 USA	EU282321 H
<i>H. californicum</i> Covas & Stebbins	MA-138-1-4 USA	AF079273 H
<i>Bromus tectorum</i> L.	–	AY362757

nlm.nih.gov/nuccore) (см. таблицу). В отличие от коллекционных образцов, инвентарные номера клонов из NCBI приведены на дендрограммах впереди видовых названий.

Древние представители этих таксонов являлись донорами субгеномов **St** и **H** соответственно у современных видов рода *Elymus*. При этом виды рода *Pseudoroegneria*, приуроченные к разным ареалам в Северной Евразии, могли быть донорами субгенома **St** у разных видов относительно молодой **StY**-геномной группы рода *Elymus*.

Например, *Pseudoroegneria strigosa* изначально распространена в Центральной Азии, а также как аборигенная отмечена в Крыму и Греции (<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:418876-1>. First published in Taxon, 1980. 29: 168).

Pseudoroegneria spicata имеет ареал в западной части североамериканского континента (<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:1159330-2>. First published in Taxon, 1980. 29: 168).

Pseudoroegneria libanotica и следующий вид приурочены к территориям на Ближнем Востоке (<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:942121-1>. First published in P. Gustafson (ed.), Gene Manipulat. in Pl. Improv.: 1984: 272).

Pseudoroegneria tauri (<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:914501-1>. First published in Feddes Rept. 1984. 95: 445).

Пятый вид, *P. stipifolia*, имеет более продвинутый ареал на север по сравнению с двумя предыдущими (<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:914500-1>. First published in Feddes Rept. 1984. 95: 445).

В отношении использования молекулярных маркеров в изучении рода *Elymus* существенные результаты получены R. Mason-Gamer с сотрудниками (Helfgott, Mason-Gamer, 2004; Mason-Gamer, 2013; Mason-Gamer et al., 1998, 2010a, b). В частности, проведенные ими исследования показали, что сведения о нуклеотидных последовательностях низкокопийного гена *waxy* (гранул-связанная синта-

за крахмала 1, *GBSSI*) согласуются с цитогенетическими данными в отношении геномной конституции и эволюционного происхождения североамериканских (Mason-Gamer, 2001) и азиатских (Mason-Gamer, 2010a) видов рода *Elymus*.

Сравнительно небольшое число **StY**-геномных видов на территории России дает возможность проследить филогенетическое происхождение субгенома **St** в этой этой группе от предковых таксонов рода *Pseudoroegneria* с привлечением данных о последовательностях гена *GBSSI* в числе 6–8 клонов на видовой образец.

Выделение суммарной ДНК, ПЦР амплификация, клонирование в плазмидном векторе, установление нуклеотидных последовательностей и построение филогенетических деревьев. Тотальную ДНК выделяли из 20 мг сухой зеленой массы с использованием набора “NucleoSpin Plant II Kit” (Macherey-Nagel, Германия) по стандартному протоколу производителя. Исследуемый фрагмент гена *GBSSI*, перекрывающий область от 9 до 14 экзонов, получали в ПЦР, используя прямой праймер F-for (TGCGAGCTCGACAACATCATGCG, Mason-Gamer et al., 1998) и модифицированный нами обратный праймер M-bac-Alter1 (GGCGAGCGGYGCRATCTCSTSGCC).

Амплификацию фрагмента *GBSSI* проводили при условиях: 1X Q5 Reaction Buffer, 0.2 mM каждого dNTP, 2.0 mM свободного Mg²⁺, по 0.3 мкМ прямого и обратного праймеров, около 0.4 нг/мкл геномной ДНК, 8 ед/мл Q5 Hot Start II DNA Polymerase, с добавлением бетаина до 1M и Q5-High GC Enhancer до однократного. Температурный профиль составил 1 стадию плавления при 98 °C в течение 30 с, далее 38 циклов из трех ступеней (денатурация 98 °C – 5 с; отжиг 69 °C – 10 с; элонгация 72 °C – 1 мин), затем достройка 72 °C – 2 мин и хранение на 4 °C. Полученные фрагменты клонировали лигированием по тупым концам в суицидальный вектор pJET2.1 с помощью набора CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, США). Далее с помощью ПЦР амплификации полученных колоний

E. coli (NEB stable), используя в реакции праймеры из области вектора (Jet_F и Jet_R), получали фиксированные варианты клонированного гена *GBSS1*. Очищали ДНК фрагменты от компонентов ПЦР сорбцией на магнитных частицах AMPure XP (Beckton Coulter, США) и секвенировали по Сэнгеру с двух сторон для формирования контига и последующего анализа. В секвенирование брали амплификаты расчетного размера, содержащие вставку гена *GBSS1*, не менее чем от 6–8 клонов для каждого образца геномной ДНК. В качестве образца outgroup при построении дендрограмм взята НПК AY362757 *Bromus tectorum* L.

Множественное выравнивание последовательностей исследуемых фрагментов *GBSS1* проводили с помощью алгоритма MUSCLE в программе Unipro UGENE ver. 31.0 (Okonechnikov et al., 2012). Выравненные последовательности использовали для построения филогенетических деревьев методом максимального правдоподобия (ML) (Felsenstein, 1981). Серия дендрограмм была построена в программе MEGA ver. 11.0.13 (Tamura et al., 2021) с использованием двухпараметрической (2-параметрическое расстояние, K2P) эволюционной модели М. Кимуры (Kimura, 1980) для фрагментов *GBSS1* на основе: отдельно экзонов; отдельно интронов, как предположительно более мобильных последовательностей в микроэволюционном плане. В узлах указаны значения бутстреп-поддержки. Нуклеотидные последовательности секвенированных нами клонов исследуемых участков гена *GBSS1* депонированы в базу данных GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI). Для их обозначения нами используется аббревиатура НПК (нуклеотидная последовательность клона).

Результаты

Дендрограмма, построенная по данным экзонов без интронов, представлена на рис. 1. На основе ее анализа сделаны следующие выводы.

1. Все варианты гена субгенома **St** у изученных видов подразделяются на три кластера сообразно трем маркерным группам нуклеотидных последовательностей клонов рода *Pseudoroegneria*: центральноазиатской (**St**₁) с реперным видом *P. strigosa*, североамериканской (**St**₂) с маркирующим видом *P. spicata* и ближневосточной (**St**₃) с двумя видами – *P. tauri* и *P. libanotica*. К третьему кластеру тяготеет восточноевропейский вид *P. stipifolia*.
2. Условно первый кластер **St**₁, помимо маркирующих последовательностей *P. strigosa*, содержит шесть НПК трех разновидностей *E. pendulinus* и четыре идентичные НПК *E. gmelinii*, из которых три сибирские и одна дальневосточная, а также НПК широко распространенного за пределами России центральноазиатского вида *E. abolinii*.
3. Североамериканский кластер (**St**₂) включает компактную группу разновидностей *E. ciliaris* и отдельно ветвь с двумя последовательностями *P. spicata* вместе с НПК северо-казахстанского образца *E. fedtschenkoi* KSA-0935_3 (выделена темно-сиреневым цветом). Следует отметить,

что у этого типичного для вида образца были выявлены только шесть НПК **St**₂. Геномная специфичность образца будет описана ниже. Последовательность крымского вида *E. panormitanus* заняла позицию между двумя ветвями этого кластера со значением бутстрепа 22.

4. Несколько неожиданно оказался дифференцирован третий кластер **St**₃, образовавший две основные ветви. Одна ветвь представлена тремя маркерными видами – *P. tauri*, *P. libanotica* и *P. stipifolia*, другая ветвь объединила семь НПК *E. nevskii*–*E. fedtschenkoi* и три дальневосточных НПК *E. gmelinii*, из которых две принадлежат камчатским образцам. Расценивать такое разделение последовательностей *E. gmelinii* между кластерами **St**₁ и **St**₃ как случайное вряд ли целесообразно. Внутри данного кластера более всех отделилась НПК AUR-1744_2_Rec. Тем не менее мы присвоили всем образцам кластера геномную формулу **St**₃.
5. Отдельным кластером компактно расположились последовательности субгенома **Y**, преимущественно сохраняя при этом видовую специфичность крупных базовых таксонов *E. ciliaris*, *E. pendulinus*, *E. gmelinii* и комплекса *E. nevskii*–*E. fedtschenkoi*. При этом единую крупную кладу сформировали НПК комплекса *E. nevskii*–*E. fedtschenkoi* вместе с группой шести НПК *E. gmelinii*, в которую попала также последовательность *E. nevskii* СНА-8764_3. Наиболее обособленными, как и в предыдущем варианте, оказались **Y**-последовательности европейских видов *E. caucasicus* и *E. panormitanus*, а также НПК камчатского образца *E. gmelinii* KES-9654_5.
6. В качестве дополнительного пункта следует отметить расположение НПК кавказского образца *E. caucasicus* H 2086, который по предварительным опытам мы отнесли к **St**₂. Последовательность занимает позицию между кластерами **Y** и комплексом **St**. К сожалению, этот образец прошел несколько этапов обмена между генбанками и коллекциями генотипов, поэтому считать его происхождение достоверным нет оснований.

Относительно близкое расположение кластера субгенома **Y** с кластером североамериканского субгенома **St**₂ требует отдельного исторического анализа, поскольку по данным ряда авторов субгеномы **St** и **Y** ведут происхождение от разных предков (Sun, Komatsuda, 2009; Yan et al., 2011; Song et al., 2015). Но в целом виды **StY**-геномной группы с территории России имеют три вектора эволюции, что согласуется с нашими представлениями о микроэволюционных комплексах внутри рода *Elymus*.

При сравнении результатов, полученных отдельно по последовательностям экзонов (см. рис. 1) и интронов (рис. 2), сделаны следующие выводы.

1. На дендрограмме «интроны» все НПК *E. pendulinus* и четыре НПК *E. gmelinii* из центральноазиатской группы **St**₁ расположились в единой ветви рядом с ветвью двух маркерных последовательностей *P. strigosa* и узбекского образца *E. abolinii*. Отличия от варианта «экзоны» проявились не только в величинах бутстрепа. Все НПК *E. pendulinus* и *E. gmelinii* на дендрограмме **St**₁ не различались между собой.

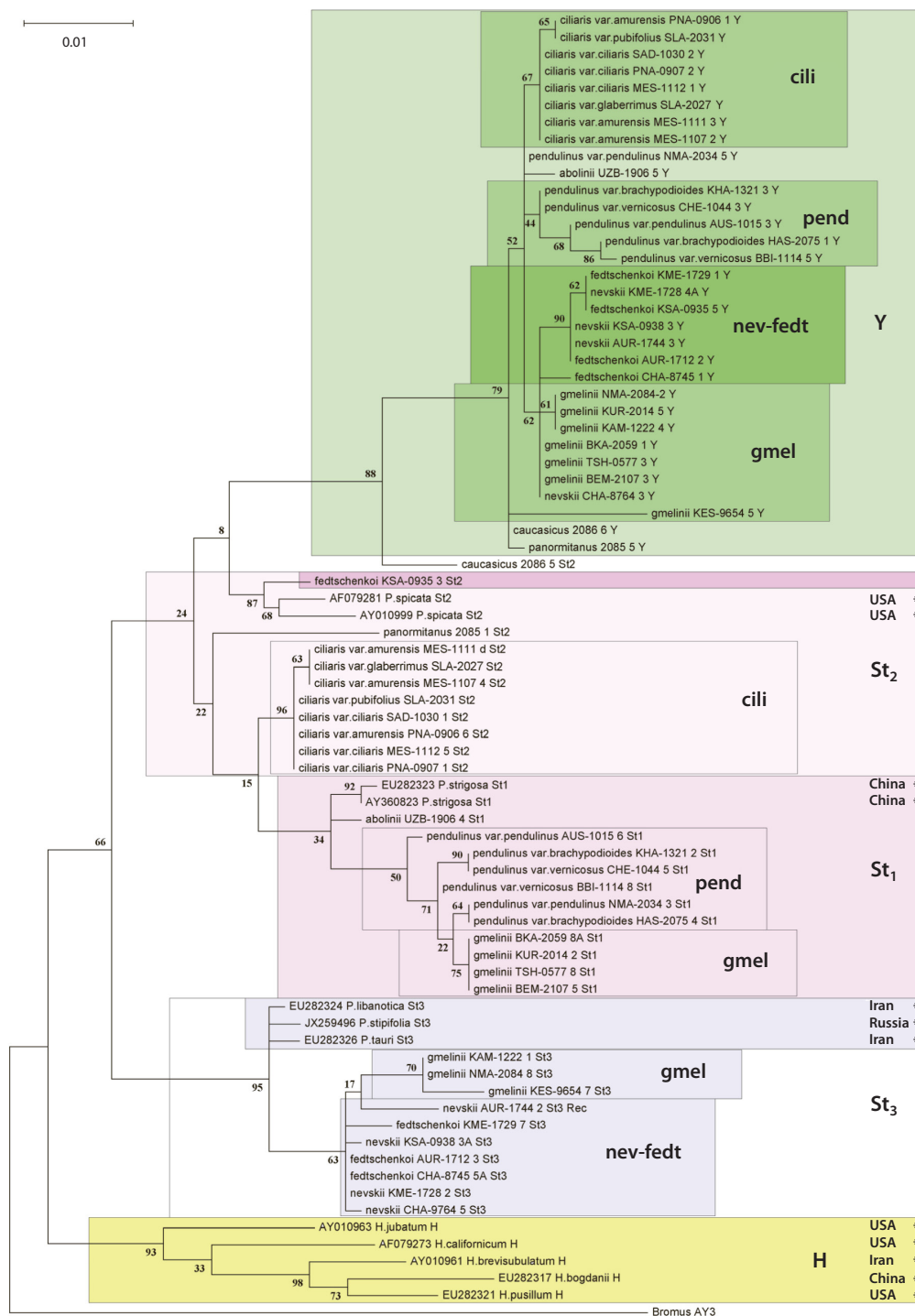


Рис. 1. Дендрограмма ML, построенная по результатам анализа последовательностей гена *GBSS1* (только экзоны 9–14) у *StY*-геномной группы видов с территории России в сравнении с реперными видами.

Звездочками отмечены моногеномные носители субгеномов *St* и *H*, а также их происхождение. В узлах показаны значения бутстреп-поддержки.

2. Схожий характер различий проявился и в кластере *St*₂, где НПК европейских *E. caucasicus* и *E. panormitanus* образовали отдельную ветвь. Внутри ветви *E. ciliaris* незначительно отделились от пяти идентичных разновидностей две южно-приморские НПК *E. ciliaris* var. *amurensis* и единственная НПК *E. ciliaris* var. *glaberrimus*. Последовательность северо-казахстан-

ского образца *E. fedtschenkoi* KSA-0935_3 сохранила близкую связь с маркерными последовательностями *P. spicata*.

3. Группа НПК *St*₃, так же как в варианте «экзоны», разделилась на три ветви. Одна из них включила ближневосточные маркерные виды *Pseudoroegneria*, другая объединила образцы комплекса *E. nevskii*–*E. fedtschen-*

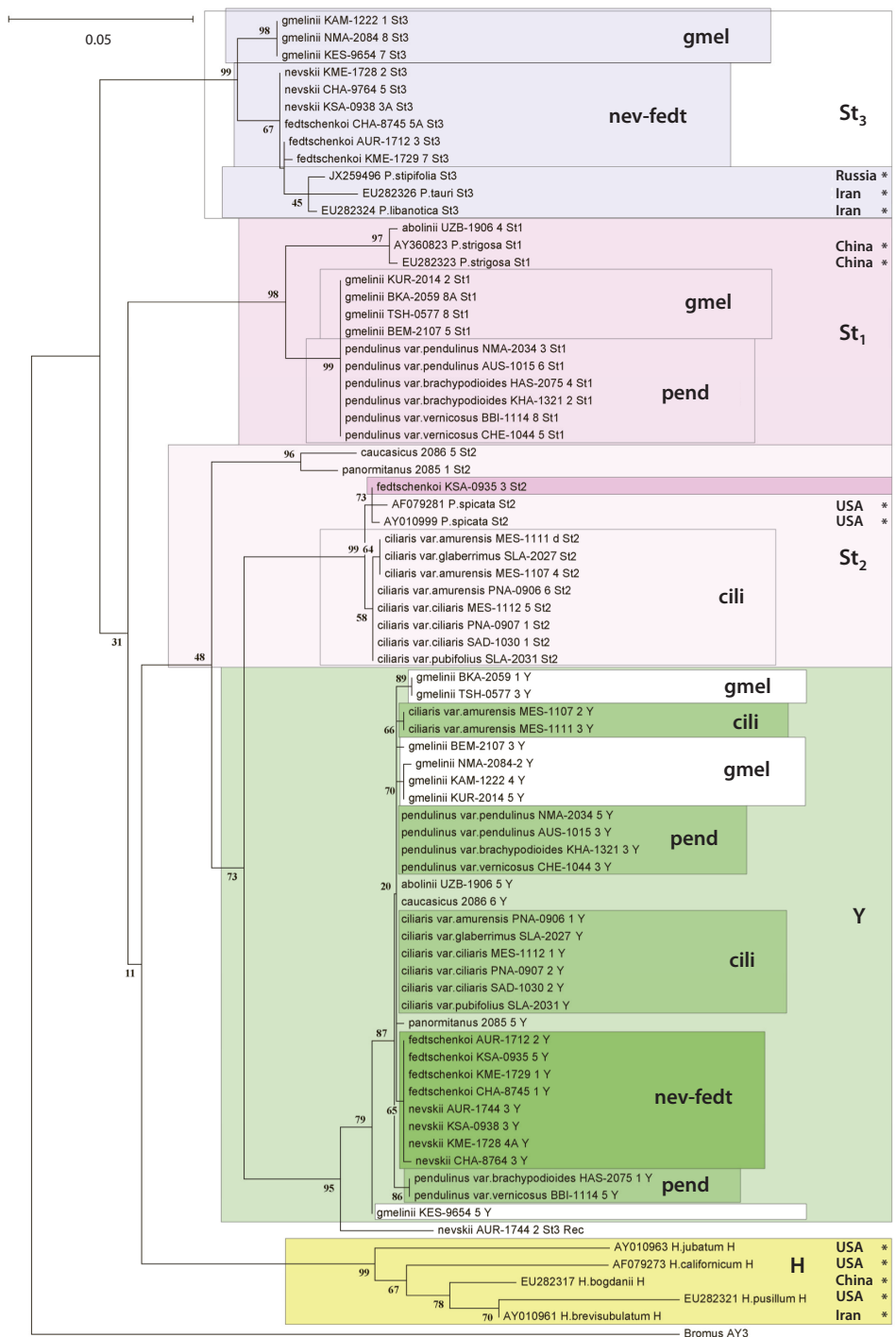


Рис. 2. Дендрограмма ML, построенная по результатам анализа последовательностей гена *GBSS1* (только интроны 9–13) у StY -геномной группы видов с территории России в сравнении с реперными видами.

Звездочками отмечены моногеномные носители субгеномов St и H , а также их происхождение. В узлах показаны значения бутстреп-поддержки.

koi (за исключением KSA-0935), а третья состояла из двух камчатских и одной приморской НПК *E. gmelinii*. В целом в кластерах St -последовательностей наиболее неожиданным можно считать принадлежность трех образцов *E. gmelinii* к особой дальневосточной расе этого вида с вариантом субгенома St_3 вместо характерных для Сибири вариантов St_1 . Тем не менее одна из приморских

НПК *E. gmelinii* ВКА-2059 попала в кластер St_1 вместе с тремя сибирскими образцами. Кроме того, выявилась принадлежность всех шести изученных НПК образца *E. fedtschenkoi* KSA-0935 (не показаны на дендрограммах) к группе St_2 вместо St_3 в обоих вариантах сравнения.

Изучение нуклеотидного состава интронов изучаемых видов показало, что на фоне низкой вариабельности по-

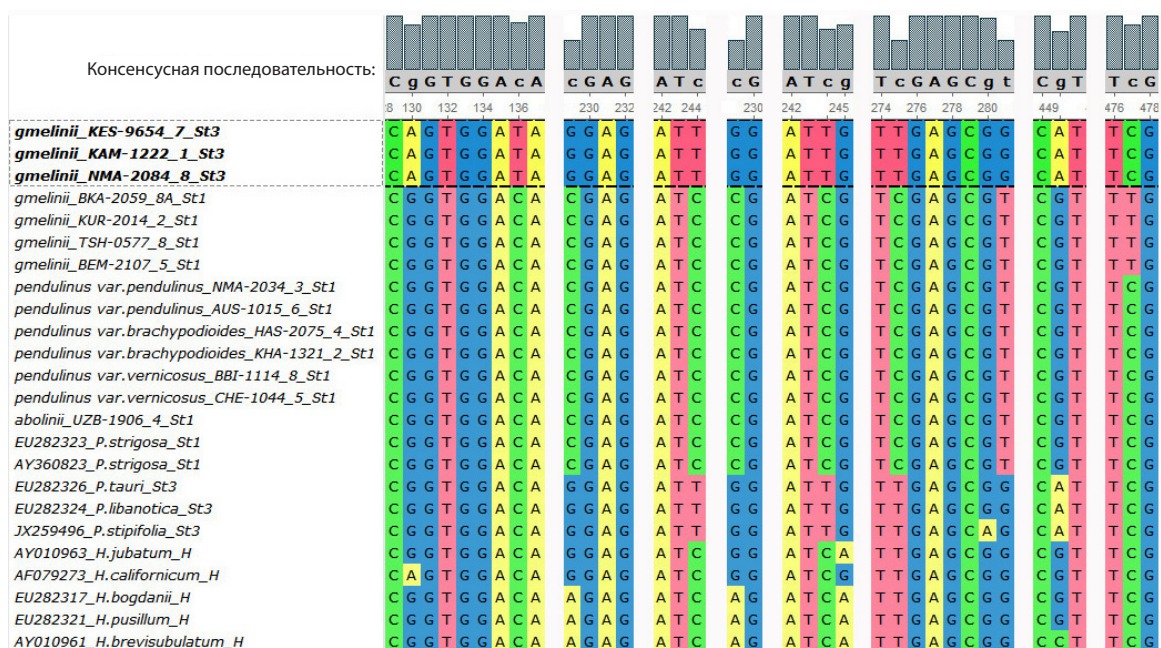


Рис. 3. Различия в последовательностях экзонов 9–14 у трех клонов дальневосточных образцов *E. gmelinii*, несущих субгеномы *St*₃, и клонов *E. gmelinii*, *E. pendulinus*, *E. abolinii*, несущих субгеномы *St*₁.

Здесь и на рис. 4 для сравнения приведены фрагменты последовательностей маркерных клонов *Pseudoroegneria*. Числами вверху указаны положения нуклеотидов в выравненных последовательностях.

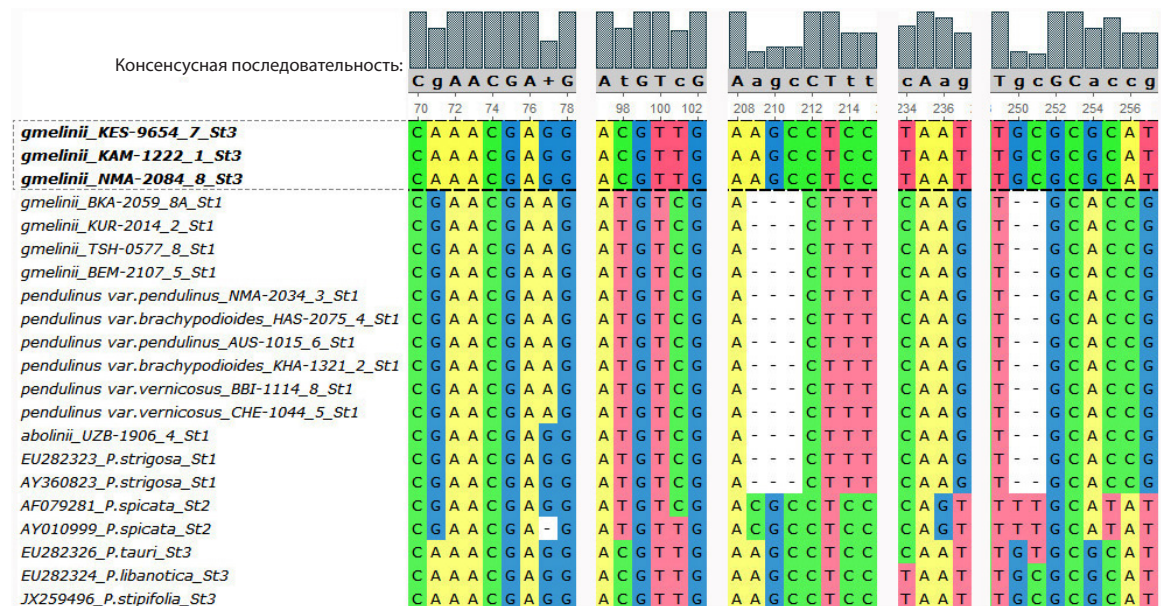


Рис. 4. Различия в последовательностях интронов 9–13 у трех клонов дальневосточных образцов *E. gmelinii*, несущих субгеномы *St*₃, и клонов *E. gmelinii*, *E. pendulinus*, *E. abolinii*, несущих субгеномы *St*₁.

последовательностей Y-субгенома одной нуклеотидной замены и одной микроделеции у НПК *E. gmelinii* KES-9654_5 оказалось достаточно, чтобы она отчетливо отделилась на дендрограмме от всех остальных.

Среди рассматриваемых образцов во всех вариантах построения дендрограмм H-субгеномные последовательности не выявлены, что подтверждает *StY*-геномную конституцию видов.

Как отмечалось выше, среди наиболее заметных характеристик в топологии деревьев надо отметить наличие особой дальневосточной расы *E. gmelinii* с НПК *St*₃ вместо *St*₁. Для прояснения возможных причин мы проанализировали совокупности выравненных последовательностей в критических участках экзонов и интронов. На рис. 3 и 4 горизонтальной рамкой выделены фрагменты трех НПК *E. gmelinii*, расположенных в *St*₃-кластерах

на дендрограммах экзонов и интронов соответственно, в сравнении с последовательностями **St₁** других видов и **St₃** у реперных образцов *Pseudoroegneria*. Так, в результате анализа в общей сложности отмечено не менее семи позиций с нуклеотидами, идентичными маркерным клоном **St₃** в последовательностях экзонов, и не менее двенадцати позиций – в последовательностях интронов, при полных отличиях от НПК **St₁**-субгенома. В микроэволюционном плане это означает, что, сформировавшись у предковых генотипов, данный аллель закрепился в некоторых дальневосточных популяциях *E. gmelinii* и передавался из поколения в поколение практически в неизменном виде. Вместе с тем для констатации существования единой дальневосточной расы необходимо установить наличие других отличительных характеристик, в том числе признаков репродуктивной изоляции.

Обсуждение

Таким образом, расположение внутривидовых таксонов (разновидностей) в двух вариантах кластеризации имело смешанный характер, без выраженной специфичности. Этот факт подтверждает целесообразность укрупнения видовых единиц в **StY**-геномной группе в соответствии с их филогенетическими отношениями на основе ранее сформулированных принципов (Кобозева и др., 2011, 2017; Кобозева, Агафонов, 2015; Agafonov et al., 2021). При этом субгеном **Y** показал низкий уровень вариативности, как исторически молодой и не накопивший эволюционно значимых преобразований по сравнению с более древними субгеномами **St₁–St₃**. Тем не менее можно заметить внутри кластера **Y** признаки обособления ряда микроэволюционных комплексов, как, например, группа

таксонов кластера **St₂** *E. ciliaris* и группа кластера **St₃** *E. nevskii–E. fedtschenkoi* (см. рис. 1, выделена затемненным зеленым).

Примечательно, что кластер субгенома **Y** в варианте «интроны» менее изменчив, чем в варианте «экзоны». Этот факт противоречит сложившимся представлениям о большей консервативности генных участков, ответственных за синтез ферментных молекул. Вне главной ветви, от которой берет начало большинство образцов, находится НПК *E. gmelinii* KES-9654_5_Y. Следующие по степени отдаленности от этой ветви – две НПК *E. pendulinus*: HAS-2075 и VBI-1114. Все остальные видовые совокупности расположены компактно и близко друг от друга, включая *E. abolinii*, *E. caucasicus* и *E. panormitanus*. Дальше всех на дендрограмме расположилась НПК *E. nevskii* AUR-1744_2_St3_Rec – в качестве промежуточной между кластерами **Y** и **St₂**, возможно, будучи рекомбинантной. Последовательность этого клона имела не менее 11 одиночных замен, идентичных нуклеотидам в НПК с субгеномами **St₁**, **St₂** и **H**, а свое обозначение Rec получил из-за местоположения на дендрограмме «интроны» (см. рис. 2).

Одним из примечательных результатов исследования стало расположение всех НПК северо-казахстанского образца *E. fedtschenkoi* KSA-0935 в кластере **St₂** вместо **St₃**. Для уточнения субгеномной принадлежности НПК *E. fedtschenkoi* KSA-0935_3_St2 были изучены выравненные последовательности интронов у данной НПК в сравнении с остальными **St₃**-последовательностями комплекса *E. nevskii–E. fedtschenkoi* и реперными видами *Pseudoroegneria* (рис. 5). Анализ последовательностей показал, что НПК *E. fedtschenkoi* KSA-0935_3_St2 на всем протяжении периодически несет замены, идентичные та-

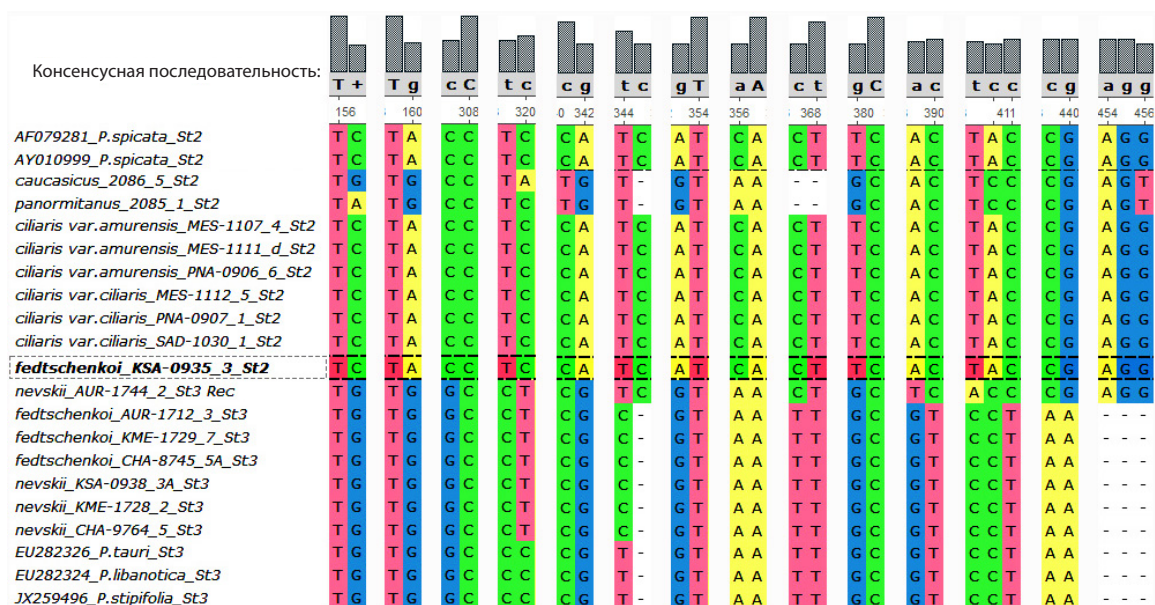


Рис. 5. Отличия в последовательностях интронов 9–14 у НПК *E. fedtschenkoi* KSA-0935_3_St2 в сравнении с таксономными образцами комплекса *E. nevskii–E. fedtschenkoi* и маркерными последовательностями *Pseudoroegneria* (показаны в горизонтальной рамке).

Числами вверху указаны положения нуклеотидов в выравненных последовательностях.

ковым у НПК *St₂* *P. spicata* в позициях, отличительных от НПК *St₃*. Остается только предполагать возможное происхождение субгенома *St₂* у *E. fedtschenkoi*, учитывая североамериканский ареал *St₂*-геномного вида *P. spicata* и восточноазиатский ареал *St₂*-геномных видов *E. ciliaris* s. l.

Таким образом, группа *StY*-геномных видов остается одной из наименее исследованных среди многочисленных видов рода *Elymus* s. l. Виды с формулой *StH* изучены лучше других по двум главным причинам: 1) исторически в поле зрения исследователей в первую очередь попали виды Северной Америки и Европы; 2) накопление знаний о видовом и структурном многообразии Центральной и Восточной Азии проходило медленнее в связи с обширными территориями и многочисленными горными хребтами, создающими большое число изолированных экологических ниш и, как следствие, множество локальных рас и обособленных видов.

При этом считается, что на территории Северной Америки *StY*-геномные виды встречаются только в качестве заносных. Достоверные находки редки, документально подтверждены гербарные образцы трех видов, содержащих субгеном *Y*. Это *E. ciliaris* и *E. semicostatus* (Nees ex Steud.) Melderis, а также *E. tsukushiensis* Honda с геномной формулой *StYH* (Barkworth et al., 2007).

В настоящее время число экспериментальных и систематических работ по исследованию филогении азиатских видов рода резко увеличилось в связи с ростом технологических возможностей Китайской Народной Республики (Hu et al., 2013; Dong et al., 2015; Song et al., 2015; Lei et al., 2018; Liu et al., 2022; Pan et al., 2025), а также благодаря достижениям классических европейских и американских научных школ (Mason-Gamer, 2001; Leo et al., 2022, 2025; Mason-Gamer, White, 2024). В частности, анализ ядерной и хлоропластной ДНК показал, что многие виды *Elymus* имеют множественное происхождение. Данные свидетельствуют о том, что гибридизация и полиплоидизация были основными движущими силами эволюции по увеличению биоразнообразия рода *Elymus* (Liu et al., 2006). Это создает трудности в разрешении эволюционных взаимоотношений даже при использовании высокопроизводительных методов с большим количеством генетических маркеров.

Кроме того, фенотипическая пластичность, малое число надежных морфологических диагностических признаков и большое количество таксонов, имеющих в генотипах субгеном *St*, затрудняют таксономическую обработку на практике (Leo et al., 2025). Тем не менее все больше новых видов описывается с привлечением данных молекулярной генетики (Sha et al., 2024; Zhang et al., 2024; Alieva et al., 2025). Вот и в наших результатах обнаружены признаки внутренней генетической дивергенции в *E. gmelinii* – самом распространенном из всех *StY*-геномных видов на территории России.

По полученным данным проявилась взаимосвязь между условной номенклатурой *St*-субгенома (*St₁*, *St₂* и *St₃*) и определенной группой видов – носителей конкретного субгенома. Кроме того, отмечено сходство во фрагментах последовательностей субгеномов *St₂* и *Y*, что поддерживает мнение ряда исследователей о едином происхождении

этих субгеномов, в частности по механизму рекуррентной гибридизации (Liu et al., 2022).

Достаточно неожиданной можно считать меньшую вариабельность и одновременно высокую видовую специфичность среди последовательностей интронов изучаемого гена по сравнению с экзонами. Это означает, что детальная филогения родов, несущих общих и относительно древний, но при этом географически и генетически дифференцированный субгеном *St*, еще принесет множество сюрпризов.

Заключение

Собранная нами живая коллекция всех представителей *StY*-геномной группы с территории России позволила выявить в первом приближении особенности филогенетических отношений между таксонами. Сведения об отношениях скрещиваемости, наследуемости диагностических признаков, а также микроэволюционных связей стали основой для поэтапной ревизии принятой в настоящее время таксономической модели рода *Elymus* (Цвелёв, Пробатова, 2019). Для построения обновленной модели, основанной на биосистематическом подходе, мы предлагаем более широкое понимание вида. При этом учитываются фундаментальные свойства таксонов всех рангов: 1) геномная конституция видов как основа для выделения и идентификации самостоятельных родов; 2) репродуктивные свойства гибридов как показатель генетически детерминированных отношений скрещиваемости; 3) филогенетические связи, выявляемые при использовании современных молекулярных и цитогенетических технологий. Целостность вида рассматривается нами в объеме единого микроэволюционного комплекса с учетом взаимоотношений с близкородственными таксонами, способными к обмену генетического материала с последующей стабилизацией полового размножения.

Список литературы / References

- Агафонов А.В., Асбаганов С.В., Шабанова (Кобозева) Е.В., Морозов И.В., Бондарь А.А. Геномная конституция и дифференциация субгеномов эндемичных сибирских и дальневосточных видов рода *Elymus* (Poaceae) по данным секвенирования ядерного гена *waxy*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019; 23(7):817-826. doi 10.18699/VJ19.555
[Agafonov A.V., Asbaganov S.V., Shabanova (Kobozeva) E.V., Morozov I.V., Bondar A.A. Genome constitution and differentiation of subgenomes in Siberian and Far Eastern endemic species of the genus *Elymus* (Poaceae) according to the sequencing of the nuclear gene *waxy*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2019;23(7):817-826. doi 10.18699/VJ19.555]
- Агафонов А.В., Шабанова (Кобозева) Е.В., Асбаганов С.В., Мглинец А.В., Богданова В.С. Выявление геномного состава аллополиплоидных видов рода *Elymus* (Poaceae: Triticeae) Азиатской России с помощью CAPS-анализа. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(2):115-122. doi 10.18699/VJ20.606
[Agafonov A.V., Shabanova (Kobozeva) E.V., Asbaganov S.V., Mglinets A.V., Bogdanova V.S. Identification of genome compositions in allopolyploid species of the genus *Elymus* (Poaceae: Triticeae) in the Asian part of Russia by CAPS analysis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2020;24(2):115-122. doi 10.18699/VJ20.606]
- Агафонов А.В., Шабанова (Кобозева) Е.В., Асбаганов С.В. Микроэволюционные отношения между сибирскими видами *Elymus*

- margaritae*, *E. komarovii* и *E. transbaicalensis* (Poaceae) по данным секвенирования ядерного гена *GBSSI* (*waxy*) и гибридизации. *Журнал Сибирского федерального университета. Биология*. 2024;17(3):248-263
- [Agafonov A.V., Shabanova (Kobozeva) E.V., Asbaganov S.V. Microevolutionary relationships between the Siberian species *Elymus margaritae*, *E. komarovii*, and *E. transbaicalensis* (Poaceae) based on sequencing of the nuclear gene *GBSSI* (*waxy*) and hybridization. *Journal of Siberian Federal University. Biology*. 2024; 17(3):248-263 (in Russian)]
- Кобозева Е.В., Агафонов А.В. Ревизия подсекции *Pendulini* (Nevski) Tzvelev рода *Elymus* L. (Poaceae). *Систематические заметки по материалам Гербария им. П.Н. Крылова Томского государственного университета*. 2015;112:22-31. doi 10.17223/20764103.112.3
- [Kobozeva E.V., Agafonov A.V. Revision of the subsection *Pendulini* (Nevski) Tzvelev of the genus *Elymus* L. (Poaceae). *Systematic Notes on the Materials of P.N. Krylov Herbarium of Tomsk State University*. 2015;112:22-31. doi 10.17223/20764103.112.3 (in Russian)]
- Кобозева Е.В., Герус Д.Е., Овчинникова С.В., Агафонов А.В. Таксономические взаимоотношения между **StY** геномными видами *Elymus ciliaris* и *E. amurensis* (Poaceae). *Turczaninowia*. 2011; 14(3):35-44
- [Kobozeva E.V., Gerus D.E., Ovchinnikova S.V., Agafonov A.V. Taxonomic relationships between **StY** genome species *Elymus ciliaris* and *E. amurensis* (Poaceae). *Turczaninowia*. 2011;14(3):35-44 (in Russian)]
- Кобозева Е.В., Асбаганов С.В., Дорогина О.В., Агафонов А.В. Изменчивость ISSR-маркеров и оценка наследования диагностических признаков среди **StY**-геномных видов *Elymus pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* (Poaceae: Triticeae). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(1):135-145. doi 10.18699/VJ17.232
- [Kobozeva E.V., Asbaganov S.V., Dorogina O.V., Agafonov A.V. Variability of ISSR markers and estimation of inheritance of diagnostic characters among **StY**-genome species of *Elymus pendulinus*, *E. brachypodioides* and *E. vernicosus* (Poaceae: Triticeae). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov J Genet Breed*. 2017;21(1):135-145. doi 10.18699/VJ17.232 (in Russian)]
- Цвелёв Н.Н., Пробатова Н.С. Злаки России. М., 2019
- [Tzvelev N.N., Probatova N.S. Grasses of Russia. Moscow, 2019 (in Russian)]
- Agafonov A.V., Shabanova (Kobozeva) E.V., Emtseva M.V., Asbaganov S.V., Dorogina O.V. Phylogenetic relationships among different morphotypes of **StY**-genomic species *Elymus ciliaris* and *E. amurensis* (Poaceae) as a unified microevolutional complex. *Botan Pacifica*. 2021;10(1):19-28. doi 10.17581/bp.2021.10101
- Agafonov A.V., Shabanova E.V., Emtseva M.V., Asbaganov S.V., Morozov I.V., Bondar A.A., Dorogina O.V. Phylogenetic and taxonomic relationships between morphotypes related to *Elymus caninus* (Poaceae) based on sequence of a nuclear gene *GBSSI* (*waxy*) and sexual hybridization. *J Syst Evol*. 2024;62(3):520-533. doi 10.1111/jse.13006
- Alieva K.B., Peng Y., Usupbaev A., Tojibaev K.Sh., Yusupov Z., Ergashov I., Azimova D., Jiang Z. Synopsis of the genus *Elymus* (Poaceae) in Uzbekistan (Middle Asia) with a description of *Elymus uzbekistanicus* a new species from Turkestan Mts. *PhytoKeys*. 2025; 257:9-50. doi 10.3897/phytokeys.257.142950
- Barkworth M.E., Cambell J.J.N., Salomon B. *Elymus* L. In: Flora of North America. Vol. 24. New York & Oxford: Oxford University Press, 2007;288-343
- Baum B.R., Bailey L.G., Johnson D.A., Agafonov A.V. Molecular diversity of the 5S rDNA units in the *Elymus dahuricus* complex (Poaceae, Triticeae) supports the genomic constitution of **St**, **Y**, and **H** haplotypes. *Can J Bot*. 2003;81(11):1091-1103. doi 10.1139/b03-102
- Dewey D.R. The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial Triticeae. In: Gustafson J.P. (Ed.) Gene Manipulation in Plant Improvement. Stadler Genetics Symposia Series. Springer, 1984;209-279. doi 10.1007/978-1-4613-2429-4_9
- Dong Z.Z., Fan X., Sha L.N., Wang Y., Zeng J., Kang H.Y., Zhang H.Q., Wang X.L., Zhang L., Ding C.B., Yang R.W., Zhou Y.H. Phylogeny and differentiation of the **St** genome in *Elymus* L. sensu lato (Triticeae; Poaceae) based on one nuclear DNA and two chloroplast genes. *BMC Plant Biol*. 2015;15:179. doi 10.1186/s12870-015-0517-2
- Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol*. 1981;17(6):368-376. doi 10.1007/bf01734359
- Helfgott D.M., Mason-Gamer R.J. The evolution of North American *Elymus* (Triticeae, Poaceae) allotetraploids: evidence from phosphoenolpyruvate carboxylase gene sequences. *Syst Botany*. 2004;29(4): 850-861
- Hu Q., Yan C., Sun G. Phylogenetic analysis revealed reticulate evolution of allotetraploid *Elymus ciliaris*. *Mol Phylogenet Evol*. 2013; 69(3):805-813. doi 10.1016/j.ympev.2013.06.023
- 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
- Koonin E.V. The origin of introns and their role in eukaryogenesis: a compromise solution to the introns-early versus introns-late debate? *Biol Direct*. 2006;1:1-22. doi 10.1186/1745-6150-1-22
- Lei Y.-X., Liu J., Fan X., Sha L.-N., Wang Y., Kang H.-Y., Zhou Y.-H., Zhang H.-Q. Phylogeny and molecular evolution of the *DMCI* gene in the polyploid genus *Roegneria* and its affinitive genera (Poaceae: Triticeae). *Bot J Linnean Society*. 2018;186:129-142. doi 10.1093/botlinnean/box081
- Leo J., Bengtsson T., Carlsson A.S., Brassac J., von Bothmer R. Population structure and phylogeography of *Elymus mutabilis* and its genetic relationships with *E. transbaicalensis* (Poaceae). *Nord J Bot*. 2022;4:e03520. doi 10.1111/njb.03520
- Leo J., Bengtsson T., Morales A., Carlsson A.S., von Bothmer R. Genetic structure analyses reveal multiple origins of *Elymus* sensu stricto (Poaceae). *Genet Resour Crop Evol*. 2025;72:167-185. doi 10.1007/s10722-024-01944-1
- Liu Q., Ge S., Tang H., Zhang X., Zhu G., Lu B.-R. Phylogenetic relationships in *Elymus* (Poaceae: Triticeae) based on the nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast *trnL-F* sequences. *New Phytol*. 2006;170(2):411-420. doi 10.1111/j.1469-8137.2006.01665.x
- Liu Q.L., Liu L., Ge S., Fu L.P., Bai S.Q., Lu X., Wang Q.K., Chen W., Wang F.Y., Wang L.H., Yan X.B., Lu B.R. Endo-allopolyploidy of autopolyploids and recurrent hybridization – a possible mechanism to explain the unresolved **Y**-genome donor in polyploid *Elymus* species (Triticeae: Poaceae). *J Syst Evol*. 2022;60(2):344-360. doi 10.1111/jse.12659
- Lu B.-R., von Bothmer R. Cytological studied of dihaploid and hybrid from intergeneric cross *Elymus shandongensis* × *Triticum aestivum*. *Hereditas*. 1989;111(3):231-238. doi 10.1111/j.1601-5223.1990.tb00401.x
- Lu B.-R., von Bothmer R. Intergeneric hybridization between *Hordeum* and Asiatic *Elymus*. *Hereditas*. 1990;112(2):109-116. doi 10.1111/j.1601-5223.1990.tb00048.x
- Mason-Gamer R.J. Origin of North American *Elymus* (Poaceae: Triticeae) allotetraploids based on granule-bound starch synthase gene sequences. *Syst Bot*. 2001;26(4):757-768. doi 10.1043/0363-6445-26.4.757
- Mason-Gamer R.J. Phylogeny of a genomically diverse group of *Elymus* (Poaceae) allopolyploids reveals multiple levels of reticulation. *PLoS One*. 2013;8(11):e78449. doi 10.1371/journal.pone.0078449
- Mason-Gamer R.J., White D.M. The phylogeny of the Triticeae: resolution and phylogenetic conflict based on genome-wide nuclear loci. *Am J Bot*. 2024;111(10):e16404. doi 10.1002/ajb2.16404








- Mason-Gamer R.J., Weil C., Kellogg E.A. Granule-bound starch synthase: structure, function, and phylogenetic utility. *Mol Biol Evol.* 1998;15(12):1658-1673. doi 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025893
- Mason-Gamer R.J., Burns M.M., Naum M. Phylogenetic relationships and reticulation among Asian *Elymus* (Poaceae) allotetraploids: analyses of three nuclear gene trees. *Mol Phylogenet Evol.* 2010a; 54(1):10-22. doi 10.1016/j.ympev.2009.10.002
- Mason-Gamer R.J., Burns M.M., Naum M. Reticulate evolutionary history of a complex group of grasses: phylogeny of *Elymus StStHH* allotetraploids based on three nuclear genes. *PLoS One.* 2010b;5(6): e10989. doi 10.1371/journal.pone.0010989
- Okito P., Mott I.W., Wu Y., Wang R.R. A Y genome specific STS marker in *Pseudoroegneria* and *Elymus* species (Triticeae: Gramineae). *Genome.* 2009;52(4):391-400. doi 10.1139/g09-015
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M.; the UGENE team. Uni-pro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics.* 2012; 28(8):1166-1167. doi 10.1093/bioinformatics/bts091
- Pan X., Zheng T., Zhao Y., Bao J., Fan X., Sha L., Li Y., ... Cheng Y., Zhang H., Kang H., Zhou Y., Wu D. Phylogeny and taxonomy of the polyploid species that contain St genome (Triticeae; Poaceae) based on four nuclear DNA and three chloroplast genes. *BMC Plant Biol.* 2025;25:183. doi 10.1186/s12870-025-06179-5
- Sakamoto S. Cytogenetic studies in the tribe Triticeae. A polyhaploid plant of *Agropyron tsukushiense* var. *transiens* Ohwi found in a state of nature. *Jpn J Genet.* 1964;39(6):393-400. doi 10.1266/jjg.39.393
- Sha L.-N., Liang X., Zhang X.-Y., Gao S., Zhang Y., Zhou Y.-H., Fan X. *Roegneria yenchiana*: a new species in the Triticeae (Poaceae) from the Hengduan Mountain region. *Ecol Evol.* 2024;14:e11171. doi 10.1002/ece3.11171
- Shabanova (Kobozeva) E.V., Agafonov A.V. New varieties of *Elymus ciliaris* (Poaceae: Triticeae) from the Russian Far East. *Botan Pacifica.* 2023;12(1):147-149. doi 10.17581/bp.2023.12102
- Song H., Nan Z.B., Tian P. Phylogenetic analysis of *Elymus* (Poaceae) in western China. *Genet Mol Res.* 2015;14(4):12228-12239. doi 10.4238/2015.October.9.11
- Sun G., Komatsuda T. Origin of the Y genome in *Elymus* and its relationship to other genomes in Triticeae based on evidence from elongation factor G (*EF-G*) gene sequences. *Mol Phylogenet Evol.* 2009;56(2):727-733. doi 10.1016/j.ympev.2010.03.037
- Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol.* 2021;38(7):3022-3027. doi 10.1093/molbev/msab120
- Tan L., Wu D.D., Zhang C.B., Cheng Y.R., Sha L.N., Fan X., Kang H.Y., Wang Y., Zhang H.Q., Escudero M., Zhou Y.H. Genome constitution and evolution of *Elymus atratus* (Poaceae: Triticeae) inferred from cytogenetic and phylogenetic analysis. *Genes Genomics.* 2024;46: 589-599. doi 10.1007/s13258-024-01496-9
- Yan C., Sun G., Sun D. Distinct origin of the Y and St genome in *Elymus* species: evidence from the analysis of a large sample of St genome species using two nuclear genes. *PLoS One.* 2011;6(10):e26853. doi 10.1371/journal.pone.0026853
- Zhang Y.-C., Wei X.-X., Qin Y., Liu Y., Zhang S.-Z., Jia Z.-F., Liu W.-H. *Elymus multiramosus* (Poaceae), a new species from the north-western Qinghai-Tibetan Plateau, China. *PhytoKeys.* 2024;249:51-73. doi 10.3897/phytokeys.249.127632


Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 28.09.2025. После доработки 27.01.2026. Принята к публикации 30.01.2026.

doi 10.18699/vjgb-26-20

Исследования генетического разнообразия и геномов мискантуса для оптимизации их биотехнологического потенциала

И.В. Чадаева , Д.И. Каретников , А.Ю. Пронозин , Э.С. Стародубцева , Н.А. Омелянчук ,
А.В. Кочетов , Д.А. Афонников 

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



Аннотация. Представленный обзор посвящен интеграции геномных подходов в изучение растений рода *Miscanthus*. Мискантусы представляют собой многолетние травы, перспективные для создания энергетических культур, характеризующихся высокой продуктивностью биомассы, устойчивостью к абиотическим стрессам и низкими требованиями к агротехнологиям. Рассматриваются методы анализа генетического разнообразия, полногеномные сборки, а также современные достижения в расшифровке молекулярно-генетических механизмов, определяющих продуктивность и стрессоустойчивость, с целью применения их в селекции. Приведены данные по полногеномным сборкам ключевых видов – *M. sinensis* (*Msi*), *M. sacchariflorus* (*Msa*), *M. floridulus* (*Mfl*) и *M. lutarioriparius* (*Mlu*) – с использованием различных технологий (Illumina, PacBio, Oxford Nanopore, Hi-C). Геномные исследования выявили сложную эволюцию рода, включающую палеоаллополиплоидию, хромосомные слияния и дубликации, что обуславливает высокое генетическое разнообразие у этих видов. Полные хромосомные сборки геномов их стали основой для сравнительной геномики, установления таксономических отношений (включая признание *Mlu* подвидом *Msa*, а *Mfl* – подтипом *Msi*) и изучения синтении с родственными культурами, такими как сорго. Полученная информация о геноме мискантусов позволяет с высокой полнотой и точностью идентифицировать набор генов, целевых для селекции по наиболее важным биотехнологическим признакам. В то же время коммерческий гибрид *M. × giganteus* (*M×g*) характеризуется крайне низким уровнем генетического полиморфизма, что делает его уязвимым к патогенам и климатическим колебаниям. Совокупность данных о генетическом полиморфизме, филогеографии и функциональной аннотации геномов открывает возможности для создания новых, продуктивных и экологически безопасных сортов мискантуса через межвидовые скрещивания, модификацию плоидности и геновую инженерию. Эти достижения способствуют оптимизации биотехнологического потенциала мискантусов в производстве биотоплива и других биоматериалов, а также восстановлению деградированных земель.


Ключевые слова: мискантус (*Miscanthus*); селекция новой сельскохозяйственной культуры; секвенирование RNAseq; транскриптомы; генетическое разнообразие; устойчивость к факторам стресса; маркеры; базы данных; биотопливо; биотехнологии и промышленность

Для цитирования: Чадаева И.В., Каретников Д.И., Пронозин А.Ю., Стародубцева Э.С., Омелянчук Н.А., Кочетов А.В., Афонников Д.А. Исследования генетического разнообразия и геномов мискантуса для оптимизации их биотехнологического потенциала. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(4):593-600. doi 10.18699/vjgb-26-20

Финансирование. Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта FWRN-2025-0032.

Research on genetic diversity and genomes of *Miscanthus* for optimizing their biotechnological potential

I.V. Chadaeva , D.I. Karetnikov , A.Yu. Pronozin , E.S. Starodubtseva , N.A. Omeljanchuk ,
A.V. Kochetov , D.A. Afonnikov 

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

Abstract. Plants of the genus *Miscanthus* are a promising perennial energy crop, combining high biomass productivity, resistance to abiotic stress, and low agricultural technology requirements. This review summarizes recent advances in genomic and transcriptomic studies of the molecular genetic mechanisms underlying the economically valuable traits of *Miscanthus*. Data on whole-genome assemblies of key species – *M. sinensis* (*Msi*), *M. sacchariflorus* (*Msa*), *M. floridulus* (*Mfl*), and *M. lutarioriparius* (*Mlu*) – are presented using various technologies (Illumina, PacBio, Oxford Nanopore, Hi-C). Genomic studies have revealed the complex evolution of the genus, including paleoallopolyploidy, chromosomal fusions, and duplications, which accounts for the high genetic diversity of these species. Their genome assemblies at the complete

chromosome level have become the basis for comparative genomics, establishing taxonomic relationships (including the recognition of *Mlu* as a subspecies of *Msa* and *Mfl* as a subtype of *Msi*), and studying synteny with related crops such as sorghum. The information on the *Miscanthus* genome allows for the complete and accurate identification of a set of genes targeting breeding for the most important biotechnological traits. At the same time, the commercial hybrid *M. × giganteus* (*M×g*) is characterized by extremely low levels of genetic polymorphism, making it vulnerable to pathogens and climate fluctuations. The integration of genetic polymorphism data, phylogeography, and functional annotation of genomes opens up opportunities for the development of new, productive, and environmentally friendly *Miscanthus* varieties through interspecific crossings, ploidy modification, and genetic engineering. These advances contribute to the optimization of the biotechnological potential of *Miscanthus* for the production of biofuels and other biomaterials and the restoration of degraded lands.

Key words: *Miscanthus*; new agricultural crop breeding; RNAseq sequencing; transcriptome; genetic diversity; stress tolerance; markers; databases; biofuels; biotechnology and industry

For citation: Chadaeva I.V., Karetnikov D.I., Pronozin A.Yu., Starodubtseva E.S., Omeljanchuk N.A., Kochetov A.V., Afonnikov D.A. Research on genetic diversity and genomes of *Miscanthus* for optimizing their biotechnological potential. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(4):593-600. doi 10.18699/vjgb-26-20

Введение

Miscanthus (Веерник) – это высокие многолетние короткокорневищные и длиннокорневищные травы с жесткой осью кисти, входящие в семейство Мятликовые (Poaceae), так называемая триба Сорго (Andropogoneae). Мискантусы произрастают в умеренном муссонном климате Восточной Азии (российский Дальний Восток) (Dorogina et al., 2025), субтропических и тропических районах Восточной Азии, Юго-Восточной Азии и на островах Тихого океана, а несколько видов распространено вплоть до тропической Африки (Brosse et al., 2012; Wang et al., 2021). Наибольшее видовое разнообразие характерно для Восточной Азии, особенно в Китае и Японии (Hodkinson et al., 2015).

Представители рода *Miscanthus* демонстрируют высокое генетическое разнообразие (Clark et al., 2019) и разнородность структурной организации генома по пloidности, варьирующей от 2 до 6, и числу хромосом (например, у видов *M. sinensis* (*Msi*), *M. sacchariflorus* (*Msa*), *M. floridulus* (*Mfl*) и *M. lutarioriparius* (*Mlu*), рассмотренных в данном обзоре, число хромосом 19, в то время как у азиатских видов *M. fuscus*, *M. nepalensis* и *M. nudipes* и африканских видов *M. ecklonii*, *M. junceus*, *M. sorghum* и *M. violaceus* их может быть 10 или 15) (Hodkinson et al., 2015). *Msi* является генетическим диплоидом ($2n = 2x = 38$) с размером генома $1C = 2.4–2.6$ млрд п. н. (Rayburn et al., 2009); родственный *Msa* встречается как в диплоидной ($2n = 2x = 38$), так и в тетраплоидной ($2n = 4x = 76$) формах (Mitros et al., 2020). Высокое генетическое разнообразие рода *Miscanthus* обусловлено еще и тем, что они могут легко образовывать гибриды, даже между растениями разной пloidности (Clark et al., 2015, 2019).

Мискантусы – одна из наиболее подходящих культур для производства биотоплива, поскольку характеризуются рядом ключевых для промышленных технологий свойств: высокая эффективность фотосинтеза и использования питательных веществ и воды, большой выход биомассы (Wang et al., 2021), а также широкая приспособленность к различным климатическим условиям и типам почв (Clifton-Brown et al., 2017). Все это позволяет использовать мискантусы в качестве важной технической культуры в самых разных областях строительства, промышленности и сельского хозяйства (Mironova et al., 2023) (см. рисунок).

В качестве сырья для получения биоэнергии и биомассы наиболее важными являются виды *Msa* и *Msi*, а также гибрид этих родительских видов *M×g*, классифицируемый как нотовид (Trieu et al., 2022).

В строительстве мискантусы служат источником биоволокна, которое при добавлении в бетон обеспечивает улучшение его механических, звуко- и теплоизолирующих свойств (Chen Y.X., Yu, 2024). Урожайность биомассы мискантусов сравнима с таковой у кукурузы (Sanford et al., 2016), больше, чем у ряда других культур (проса прутьевидного (*Panicum virgatum*), тополя (*Populus* sp.) и ивы (*Salix* sp.)), и меньше только по сравнению с эвкалиптом (*Eucalyptus* sp.) (Li W. et al., 2018).

Биомасса мискантусов включает целлюлозу, гемицеллюлозу, лигнин и связанные с ними различные соединения (Schäfer et al., 2019). Это определяет активное использование мискантусов как сырья для целлюлозно-бумажной промышленности и производства экологичной упаковки (Cappelletto et al., 2000). Кроме того, биомасса мискантусов используется для производства широкого спектра реагентов и полимеров, включая модификации целлюлозы, этанол, 5-гидрометилфурфурол, фурфурол и различные фенольные соединения (Shavyrkina et al., 2023) (см. рисунок).

В сельском хозяйстве мискантусы применяются как источник биоугля для улучшения состояния почвы и повышения ее плодородия (Nagel et al., 2019); солома мискантусов после обработки триходермой может служить заменой торфа при выращивании клубники (Debode et al., 2018), а также используется в качестве субстрата при утилизации коровьего и свиного навоза в ферментере для производства биогаза (Jury et al., 2022) и в качестве подстилки для коров, что снижает затраты на нее (Van Weyenberg et al., 2016).

Одно из важнейших свойств мискантусов – их неприхотливость к условиям выращивания. Это позволяет задействовать культуру для восстановления почв (Grzegórska et al., 2023), загрязненных, например, такими поллютантами, как хлорорганические пестициды (Mamirova et al., 2021), соли тяжелых металлов (Andrić et al., 2025), полициклические ароматические соединения (Técher et al., 2012). Способность мискантусов накапливать в корнях токсины на сегодняшний день находится под пристальным внима-



Мискантусы в хозяйственной деятельности человека и основные темы исследований для реализации его генетического потенциала как новой биотехнологической культуры.

нием исследователей и активно применяется на практике (Nsanganwimana et al., 2021).

Основными задачами в селекции мискантусов можно обозначить следующие: 1) преодоление низкого генетического разнообразия коммерческих гибридов (как, например, у *M×g*); 2) предупреждение инвазивности за счет репродуктивной изоляции (стерильности) и специальных мер для вегетативно размножающихся длиннокорневищных мискантусов, например *Msa*; 3) создание новых гибридов с новыми полезными признаками через межвидовые скрещивания (*Msi* × *Msa*, *Msi* × *Mfl*); 4) использование современных биотехнологий, включая генетическую модификацию и регенерацию *in vitro*.

Эффективность классических методов селекции может быть существенно увеличена за счет применения современных методов генетики и омиксных технологий (Yang et al., 2021). В настоящем обзоре рассмотрено использование геномных технологий для изучения генетического разнообразия мискантуса, реконструкции геномов и поиска целевых генов, в отношении которых может производиться селекция растений.

Изучение генетического разнообразия мискантусов

Изучение разнообразия прежде всего помогает связать генетическую близость между различными таксонами этого рода с их географическим распространением. Основная цель таких исследований – выявление закономерностей

распространения различных видов мискантусов, центров происхождения и генетического разнообразия; определение влияния климатических факторов на эволюционные механизмы видообразования. К основным вопросам также относится установление родства между видами рода *Miscanthus*, поскольку, несмотря на интенсивные исследования, их таксономическое положение и эволюция видов *Msi*, *Mfl*, *Msa* и *Mlu* до конца не ясны (Sun et al., 2010; Sang, Zhu, 2011; Hodkinson et al., 2015).

S. Cichorz с коллегами (2014) провели анализ генетического разнообразия образцов четырех видов *Miscanthus* из Польши: *M×g*, *Msi*, *Msa* и *Mfl*. Для анализа применяли маркеры ISSR (inter simple sequence repeats – инвертированные повторы) и RAPD (random amplified polymorphic DNA – произвольно амплифицируемая полиморфная ДНК). Для *M×g* было показано низкое генетическое разнообразие в согласии с его происхождением от одного клона. Для *Msi*, напротив, характерно высокое генетическое разнообразие, что подтверждается при исследовании популяций *Msi* с юго-запада Китая с использованием маркеров SRAP (sequence related amplified polymorphism – амплификация открытых рамок считывания) (Nie et al., 2014).

Масштабное исследование популяций *Msi* в Китае на основе анализа 459 образцов из различных географических регионов страны с помощью SSR-маркеров выявило высокое генетическое разнообразие, свидетельствующее о большом потенциале *Msi* как генетического ресурса для селекции и разведения (Zhao et al., 2013). Интересно, что

ДНК хлоропластов *Msi* демонстрирует сравнительно низкую генетическую вариабельность, что объясняется большей подверженностью случайному дрейфу и меньшим эффективным размером популяций для хлоропластной ДНК по сравнению с ядерной ДНК (Yan et al., 2015).

В работе (Li S.-S. et al., 2019) осуществлено исследование 100 популяций четырех видов мискантусов, *Msi*, *Mlu*, *Mfl* и *Msa*, произрастающих в Китае от северных до южных регионов. Было выделено две генетически однородные группы. К первой принадлежали растения видов *Msa* и *Mlu*, ко второй – *Mfl* и *Msi*. На основе данных о генетическом разнообразии смоделированы предполагаемые процессы эволюции популяций мискантуса. Результаты показали, что виды из первой группы перенесли сокращение ареала в период максимума последнего оледенения (26–19 тыс. лет назад) и затем его постепенное расширение, тогда как у представителей второй группы происходило постепенное расширение ареала с периода межледниковья (129–116 тыс. лет назад) до настоящего времени, с остановкой в районах южного Китая. Исследователи выдвинули гипотезу о происхождении *Mfl*, согласно которой виды *Mfl* произошли от предков *Msi* в юго-восточном Китае (Li S.-S. et al., 2019). Это подтверждается общим географическим расположением данных видов, а также положением на филогенетическом дереве, где кластер популяции *Mfl* находится внутри кластера *Msi*.

Широкомасштабное исследование L.V. Clark с коллегами (2019) посвящено изучению популяции *Msa* и *Mlu*, которая включала 764 образца из России, Китая, Южной Кореи и Японии. Целью работы было изучение разнообразия, происхождения и эволюции представителей мискантусов этих видов. Анализ ДНК был основан на технологии RAD-seq (restriction site-associated DNA sequencing – секвенирование с использованием рестриктаз), а также дополнительно проведен анализ пloidности методом проточной цитометрии. В результате было выделено шесть генетических групп: три группы представлены диплоидными сортами, произрастающими преимущественно на северо-востоке Китая, Кореи и России, и три группы оказались тетраплоидами, произрастающими на севере Китая, в Корее и Японии.

По мнению исследователей, современная популяция *Msa* образовалась в период последнего оледенения от предковой популяции, ареал распространения которой находился в восточном Китае, в области, сейчас покрытой Желтым и Восточно-Китайским морями. Также в данной работе показано, что события полиплоидизации происходили независимо для японской и материковой групп *Msa*. Анализ пластидных гаплотипов обнаружил 56 уникальных вариантов между *Msa* и *Msi*. Девять из них являются промежуточными между наиболее распространенными гаплотипами сравниваемых видов (Clark et al., 2019).

Результаты этого исследования подтвердили предположение, что *Mlu* – подвид *Msa* с происхождением в области бассейна реки Янцзы, а не отдельный вид мискантуса. L.V. Clark с коллегами (2019) продемонстрировали более высокое генетическое разнообразие вида *Msa* по сравне-

нию с *Msi*, что свидетельствует о разнице в популяционной истории двух этих видов.

Z. Chen с коллегами (2022) с использованием технологии SLAF-seq (specific-locus amplified fragment sequencing – секвенирование генома с сокращенным представлением) исследовали генетические различия между растениями, принадлежащими видам *Msi*, *Mlu* и *Msa*. Проанализировав по 50 образцов этих трех видов, они показали, что генетическое расстояние между *Mlu* и *Msi* оказалось меньше, чем генетические различия внутри самой популяции *Mlu*. Результаты этих исследователей согласуются с данными работы L.V. Clark с коллегами (2019).

Масштабный популяционный анализ различных образцов *Miscanthus*, включающий около 2800 образцов из Китая, Кореи, России и Японии, проведен T. Mitros с коллегами (2020) методом GBS (genotyping by sequencing – генотипирование методом секвенирования) вместе со сборкой генома *Msi*. Результаты показали высокое генетическое разнообразие среди представителей этого рода. Анализ позволил также уточнить таксономические отношения внутри него. Согласно этой работе, популяция вида *Msi* распадается на два больших кластера, один из которых включает представителей, произрастающих в Японии, а другой – в Китае и Корее.

Отдельная группа – растения вида *Msa*, демонстрирующие меньшее разнообразие. Растения $M \times g$ заняли промежуточное положение между *Msi* и *Msa*, сочетая в себе генетические компоненты обоих видов. Генетическое разнообразие *Msi* существенно превышает таковое у ряда других видов, *M. transmorrisonensis* и *Mfl*. Это дало возможность сделать заключение, что последние два таксона можно рассматривать как подтипы *Msi*, относящиеся к субпопуляции из Японии (Mitros et al., 2020).

В работе (Zhang et al., 2021), посвященной секвенированию генома *Mfl*, проведен анализ генетического разнообразия у 75 представителей *Mfl*, $M \times g$, *Msa*, *Mlu*, *Msi* и ряда гибридных растений, полученных при скрещивании этих видов. Анализ структуры этих популяций показал, что *Mfl* и *Msi* – это группы, генетически удаленные от других растений рода, а растения *Msa* и *Mlu* формируют отдельный кластер, подтвердив статус *Mlu* как подвида *Msa*.

Таким образом, анализ генетического разнообразия на основе использования полногеномного секвенирования фрагментов ДНК позволил установить популяционную историю видов мискантусов и уточнить таксономические отношения внутри представителей этого рода: классифицировать таксон *Mlu* как подвид *Msa*, а таксоны *M. transmorrisonensis* и *Mfl* – как подтипы *Msi*. Обнаруженная в результате исследований широкая генетическая изменчивость дает возможность ведения направленной селекции для сельскохозяйственных и промышленных целей (Hodkinson et al., 2015; Trieu et al., 2022).

Генетические и географические данные служат основой для создания селекционных программ, направленных на выведение сортов, адаптированных к различным климатическим зонам. В недавней работе (Dorogina et al., 2025) осуществлено исследование возможности культивирова-

ния образцов *Msi* из районов муссонного климата в лесостепи Западной Сибири. В ходе испытаний были отобраны две формы, S1 и S2, образующие жизнеспособные семена в условиях короткого вегетационного периода континентального климата Сибири, из которых получено два поколения, G1 и G2. Эти образцы также характеризовались ускоренными темпами сезонного развития и более компактным габитусом. Они образовывали меньше вегетативной массы и раньше начинали формировать генеративные органы, чем типичные представители *Msi*.

Исследование генетической изменчивости в поколении G1 показало полное единообразие генотипов. В поколении G2, напротив, наблюдается разнообразие с выявлением пяти различных вариантов генотипов. Как утверждают О.В. Dorogina с коллегами (2025), обнаруженная ими фенотипическая и генетическая изменчивость у *Msi* позволит проводить отбор форм с различными хозяйственно ценными признаками для дальнейшего генетического улучшения и развития сорта с желаемыми признаками.

Геномные исследования растений рода *Miscanthus*

На сегодняшний день существует несколько полногеномных сборок четырех видов мискантусов: *Msa* (De Vega et al., 2021), *Mlu* (Miao et al., 2021), *Mfl* (Zhang et al., 2021) и *Msi* (Mitros et al., 2020), отличающихся по качеству и полноте (см. таблицу).

В таблице показаны основные параметры сборок: использованные технологии секвенирования, размер сборки, метрика N50, доля гуанина и цитозина (GC-состав) и оценка качества сборки геномов и транскриптомов методом BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs) (Simão et al., 2015), а также доля мобильных элементов. Каждая сборка выполнена с применением различных технологий секвенирования и методов сборки, что отражается на их точности и пригодности для последующего анализа. Далее будут представлены результаты исследований геномов этих четырех видов мискантусов.

Геном *Msa*

Для секвенирования генома *Msa* (De Vega et al., 2021) были взяты образцы диплоидного сорта Robustus 297. Используются библиотеки коротких прочтений, полученные на платформе Illumina HiSeq 2500 с короткой вставкой (~5.86 млрд прочтений, покрытие генома ~50×). Для сборки скаффолдов применяли библиотеку парных прочтений длиной 150 п. н. с длинной вставкой (7 тыс. п. н.), всего 141 млн пар прочтений.

Первичная сборка контигов (“*Msac_v2*”) выполнена с помощью программы ABySS (Simpson et al., 2009), что позволило получить 17 млн контигов общей длиной 3.27 млрд п. н. В результате объединения контигов в скаффолды выявлено ~589 тыс. последовательностей общей длиной 2.54 млрд п. н. с метрикой N50 около 10.2 тыс. п. н. (см. таблицу). С целью повышения качества сборки последовательности короче 2 тыс. п. н. были отфильтрованы, а для оставшихся более длинных скаффолдов была осуществлена дальнейшая сборка с использованием парных библиотек данных *Msi* из работы (Mitros et al., 2020). В итоге сформирована сборка “*Msac_v3*” длиной 2.074 млрд п. н. (см. таблицу), состоящая из 137 916 скаффолдов, при этом N50 увеличилась до 25.6 тыс. п. н.

Окончательная сборка (“*Msac_v3*”) получена расстановкой скаффолдов по хромосомам на основе выравнивания с хромосомами *Msi*. Геномную аннотацию выполнили с помощью программы AUGUSTUS (Stanke et al., 2004). Итоговая аннотация охватывает около 81 тыс. генов для сборки “*Msac_v2*” и около 68 тыс. для сборки “*Msac_v3*”. Доля мобильных элементов для полученной сборки составила 38.81 % (см. таблицу). Для генома *Msa* сборки “*Msac_v3*” полнота на основе анализа BUSCO составила 55.5–59.8 % (De Vega et al., 2021).

Геном *Mlu*

Геном *Mlu* был собран с применением нескольких технологий секвенирования и сборки, что обеспечило высокое качество представленности генома на хромосомном уровне (Miao et al., 2021). Для секвенирования была использована платформа Oxford Nanopore PromethION, позволявшая получить длинные прочтения ДНК общим размером 307.71 млрд п. н. с медианной длиной N50 32.21 тыс. п. н. Дополнительно использовали три библиотеки Illumina с разными размерами вставок, что обеспечило прочтения общей длиной 205.74 млрд п. н., из которых после фильтрации по качеству остались прочтения общим размером 172.52 млрд п. н. Для упорядочивания собранных фрагментов геномных последовательностей в хромосомы была применена технология высокопроизводительной фиксации хроматина (Hi-C).

Первичная сборка генома выполнена с помощью программы SMARTdenovo (Liu et al., 2021) и с использованием только длинных прочтений Nanopore. Размер первичной сборки составил 2.25 млрд п. н. с параметром N50 1.71 млн п. н. На финальном этапе сборки в анализ включили прочтения всех библиотек и данные Hi-C, что позволило получить 919 скаффолдов общим размером

Сравнительные характеристики сборок геномов у четырех видов *Miscanthus*

Вид	Технология секвенирования	Размер сборки, млрд п. н.	N50, млн п. н.	GC-состав	Количество генов, кодирующих белки	BUSCO, %	Доля мобильных элементов, %
<i>Msa</i> (“ <i>Msac_v3</i> ”)	Illumina, Nextera	2.074	0.0256	46.0	68 578	59.8	38.81
<i>Mlu</i>	PromethION, Illumina, Hi-C	2.074	113.5	45.5	68 328	97.4	64.39
<i>Mfl</i>	PacBio, Illumina, 10x Genomics, Hi-C	2.700	143	45.5	76 913	96.0	63.6
<i>Msi</i>	Illumina, Nextera	2.079	88.5	45.8	67 967	97.6	72.4

около 2.074 млрд п. н. (см. таблицу), из которых 94.3 % (примерно 1.96 млрд п. н.) размещено и ориентировано на 19 псевдохромосомах размером от 61.78 до 150.81 млн п. н.

Сравнение последовательностей контигов с последовательностями ВАС (bacterial artificial chromosome – искусственная хромосома на основе F-плазмиды), полученными методом секвенирования по Сэнгеру, показало очень высокое сходство на уровне 99 %. Выравнивание Illumina прочтений на собранный геном свидетельствовало о его высокой полноте и точности (99.8 %). Доля GC нуклеотидов в геноме составила около 45.5; 64.4 % генома были мобильные элементы (Miao et al., 2021). Общее количество предсказанных генов – 68328. Анализ набора белок-кодирующих генов с помощью BUSCO продемонстрировал полноту 97.4 % (см. таблицу). Эти исследователи провели анализ синтении полученной сборки *Mlu* с геномом сорго, что дало возможность выявить консервативные участки генома.

Геном *Mfl*

Для сборки генома *Mfl* использовали секвенирование с помощью платформ Illumina, PacBio, 10x Genomics; для упорядочения скаффолдов – библиотеку Hi-C (Zhang et al., 2021). В составе итоговой сборки обнаружено 19 псевдохромосом, покрывающих примерно 2.44 млрд п. н. (91 % генома), а общий размер полученного генома был 2.700 млрд п. н. при N50, равном 143 млн п. н. (см. таблицу). Качество финальной сборки подтверждено высокой степенью покрытия короткими чтениями и высокими показателями полноты состава белок-кодирующих генов BUSCO (96 %).

Геном *Mfl* отличается большой долей мобильных элементов (63.6 %, преимущественно LTR-ретротранспозоны). При анализе генома идентифицировано 76913 гена, из которых функционально аннотировано было 71 637 (91.1 %). Сравнение *Mfl* с другими злаковыми культурами, *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor*, *S. spontaneum*, показало, что набор из более чем 13 тыс. семейств генов был общим для данных геномов злаковых. В свою очередь, 2219 семейств генов были уникальными для *Mfl*.

Геном *Msi*

Сборка генома *Msi* была проведена до уровня хромосом (Mitros et al., 2020). Общий размер генома диплоидного *Msi* составляет примерно 2.4–2.6 млрд п. н. Геномная сборка *Msi* выполнена с использованием комплексного подхода, включающего несколько методов секвенирования. Исходным материалом послужила дигаплоидная (DH1) линия *Msi*, которая является гомозиготной по генетическим маркерам. Для секвенирования применяли технологию Illumina HiSeq 2000, а также парные прочтения с длинной вставкой Nextera и фосмидные библиотеки на основе платформы Illumina MiSeq. Для улучшения сборки генома использовали библиотеки прочтений, полученные по технологии Hi-C и позволяющие установить трехмерные контакты между фрагментами хромосом в ядре. В итоге для ядерного генома получили последовательность размером 2.079 млрд п. н., параметр N50 для сборки составил 88.5 млн п. н. (см. таблицу). Помимо ядерного генома, в

рамках данного исследования производили сборку хлоропластного и митохондриального геномов.

Для предсказания белок-кодирующих генов применяли биоинформатические методы *ab initio* и данные транскриптомных библиотек RNA-seq. В этой работе транскриптомные данные включали 57 временных точек роста трех тканей *Msi* DH1, дополнительно использовали транскриптомные данные для гибрида *M×g*. В общей сложности это позволило предсказать 67967 (94.3 % локализовано на хромосомах) белок-кодирующих генов, из которых более 50000 подтверждено данными РНК-секвенирования. Доля повторенной ДНК для полученной сборки составила 72.4 % (см. таблицу). Оценка полноты аннотации с помощью метода BUSCO (Simão et al., 2015) показала, что 97.6 % генов *Embryophyta* представлено в сборке полностью (см. таблицу), еще 1 % – фрагментированно, 64.3 % из генов продублировано, что согласуется с палеотетраплоидной природой представителей рода *Miscanthus* (Mitros et al., 2020).

Полученные сборки геномов видов растений рода *Miscanthus* открыли возможности для глубокого изучения эволюции структуры геномов этих видов, определения консервативных и уникальных их фрагментов на основе сравнения геномных последовательностей с другими видами и между собой.

Сравнительный анализ секвенированных геномов *Msi* и сорго (Mitros et al., 2020) показал, что каждая хромосома сорго совпадает с парой хромосом *Msi*, за исключением лишь одной хромосомы мискантуса. Как выяснилось, эта хромосома соответствует слиянию двух хромосом сорго. При анализе генома *Msi* выявлена синтения между геномными последовательностями *Miscanthus* и *S. bicolor*. ДНК *Msi*, по-видимому, включает в себя ДНК, сходную с ДНК предка современного сорго, количество которой было удвоено при слиянии хромосом, поэтому род *Miscanthus* состоит из палеоаллополиплоидов (Ma et al., 2012; Mitros et al., 2020; Trieu et al., 2022).

Таким образом, в процессе эволюции до своей диверсификации, но после отделения от близкородственной кланды сахарного тростника, виды рода *Miscanthus* прошли этап тетраплоидизации предкового генома и обратное слияние хромосом (Swaminathan et al., 2012). Из-за диплоидизации у *Miscanthus* spp. есть две гомеологические хромосомы, которые являются высокосинтенными, что может обеспечивать функциональную избыточность между гомеологическими парами генов (Trieu et al., 2022).

Изучение структуры целевых генов на основе полногеномных сборок геномов

Полногеномная сборка позволяет с высокой полнотой и точностью идентифицировать набор генов, кодирующих белки у мискантуса, в том числе и генов, целевых для селекции, по наиболее важным биотехнологическим признакам.

В работе (Mitros et al., 2020), посвященной полногеномной сборке *Msi*, проведен анализ сезонной динамики экспрессии генов в листьях, стеблях и ризоме растений. Показано, что вариации между уровнями экспрессии генов в разных органах превышают сезонные. Тем не менее для

генов одной ткани сезонные изменения значимо влияли на изменение уровня экспрессии. Экспрессионные данные дали возможность выделить несколько функциональных кластеров генов: метаболизм азота; метаболизм аминокислот; гормональную регуляцию и передачу сигналов; гены, связанные с ответом на патогены; гены, вовлеченные в биосинтез крахмала и сахарозы; среди этих групп генов выделены ключевые на основании экспрессионных данных. Была реконструирована сеть сезонного потребления и утилизации нутриентов.

В работе по сборке генома *Msa* (De Vega et al., 2021) реконструированные последовательности белок-кодирующих генов позволили провести поиск ортологов у вида *Msi*, а также других видов растений (щетинник итальянский *Setaria italica*, сорго *S. bicolor*, кукуруза *Z. mays*, просо *P. virgatum*).

В работе по реконструкции генома *Mfl* (Zhang et al., 2021) большое внимание уделено изучению структуры генов биосинтеза целлюлозы – целлюлозо-синтаз. Внутри группы этих ферментов на основе поиска ортологов с учетом синтении геномов как мискантусов, так и риса, сорго и сахарного тростника было выделено несколько функциональных кластеров, происхождение которых связано с событиями дупликации и экспансии этого семейства у мискантусов.

В работе по сборке генома *Mlu* (Miao et al., 2021) в фокусе исследования белок-кодирующих генов проведен анализ функциональной аннотации, закономерности экспансии и сокращения генных семейств. Доля генных семейств, подверженных экспансии, превысила почти в 3 раза число семейств с потерями генов (9509 против 3228). 211 генных семейств демонстрировали быструю экспансию у *Mlu*. К их числу относились гены устойчивости к патогенам (содержащие NB-ARC домен), связанные с функцией ингибирования ксиланазы, гены ответа на солевой стресс, цитохромы P450, терпен-синтазы и ряд других.

Отдельный анализ посвящен генам пути C4 фотосинтеза, идентифицированным на основе ортологии с генами сорго, число их составило 55. Большинство этих генов у *Mlu* подверглось экспансии за счет проксимальных, тандемных и сегментных геномных дупликаций. В результате число их оказалось почти вдвое больше, чем у сорго.

Заключение

Высокий биотехнологический потенциал для хозяйственной деятельности человека многолетних трав рода *Miscanthus*, их широкие способности к адаптациям и сохранению высокой продуктивности биомассы в условиях неблагоприятного действия абиотических и биотических факторов – все это делает их ценным объектом для селекции и промышленного использования. В основе адаптивного потенциала растений рода *Miscanthus* (*Msi*, *Msa*, *Mlu* и *Mfl*) лежат консервативные и видоспецифические особенности организации геномов. В то же время гибрид $M \times g$, основанный на скрещивании *Msa* и *Msi*, характеризуется стерильностью семян и крайне низким генетическим разнообразием, что делает его уязвимым к болезням. Для преодоления этого ограничения в селекции мискантусов можно рекомендовать работу с различными гибридами.

Современные технологии полногеномного генотипирования, секвенирования, сборки генома, биоинформатики предоставляют возможности для глубокого изучения генетического разнообразия представителей рода *Miscanthus*, структуры геномов и набора генов. Это позволяет обнаружить механизмы генетического контроля признаков, которые являются ключевыми для промышленного потенциала данного растения. Полный набор генов мискантусов дает возможность реконструировать генные сети и метаболические пути, изучать влияние генетической изменчивости на функционирование ключевых молекулярных и физиологических процессов растения. Подобные исследования с использованием более широкого набора секвенированных геномов сформируют основу для целенаправленной селекции мискантусов.

Список литературы / References

- Andrić S., Knežević G., Maletić S., Rončević S., Isakovski M.K., Zernemski T., Beljin J. An experimental assessment of *Miscanthus* × *giganteus* for landfill leachate treatment: a case study of the grebača landfill in obrenovac. *Processes*. 2025;13(3):768. doi 10.3390/pr13030768
- Brosse N., Dufour A., Meng X.Z., Sun Q.N., Ragauskas A. *Miscanthus*: a fast-growing crop for biofuels and chemicals production. *Biofuels Bioprod Biorefin*. 2012;6(5):580-598. doi 10.1002/bbb.1353
- Cappelletto P., Mongardini F., Barberi B., Sannibale M., Brizzi M., Pignatelli V. Papermaking pulps from the fibrous fraction of *Miscanthus* × *giganteus*. *Ind Crop Prod*. 2000;11(2-3):205-210. doi 10.1016/S0926-6690(99)00051-5
- Chen Y.X., Yu Q. Surface modification of miscanthus fiber with hydrophobic silica aerogel for high performance bio-lightweight concrete. *Constr Build Mater*. 2024;411:134478. doi 10.1016/j.conbuildmat.2023.134478
- Chen Z., He Y., Iqbal Y., Shi Y., Huang H., Yi Z. Investigation of genetic relationships within three *Miscanthus* species using SNP markers identified with SLAF-seq. *BMC Genomics*. 2022;23(1):43. doi 10.1186/s12864-021-08277-8
- Cichorz S., Goška M., Litwiniec A. *Miscanthus*: genetic diversity and genotype identification using ISSR and RAPD markers. *Mol Biotechnol*. 2014;56(10):911-924. doi 10.1007/s12033-014-9770-0
- Clark L.V., Stewart J.R., Nishiwaki A., Toma Y., Kjeldsen J.B., Jørgensen U., Zhao H., Peng J., Yoo J.H., Heo K., Yu C.Y., Yamada T., Sacks E.J. Genetic structure of *Miscanthus sinensis* and *Miscanthus sacchariflorus* in Japan indicates a gradient of bidirectional but asymmetric introgression. *J Exp Bot*. 2015;66(14):4213-4225. doi 10.1093/jxb/eru511
- Clark L.V., Jin X., Petersen K.K., Anzoua K.G., Bagmet L., Chebukin P., Deuter M., ... Yamada T., Yoo J.H., Yu C.Y., Long S.P., Sacks E.J. Population structure of *Miscanthus sacchariflorus* reveals two major polyploidization events, tetraploid-mediated unidirectional introgression from diploid *M. sinensis*, and diversity centred around the Yellow Sea. *Ann Bot*. 2019;124(4):731-748. doi 10.1093/aob/mcy161
- Clifton-Brown J., Hastings A., Mos M., McCalmont J.P., Ashman C., Awtycarroll D., Flavell R. Progress in upscaling *Miscanthus* biomass production for the European bio-economy with seed-based hybrids. *Glob Change Biol Bioenergy*. 2017;9(1):6-17. doi 10.1111/gcbb.12357
- Debode J., De Tender C., Cremelie P., Lee A.S., Kyndt T., Muylle H., De Swaef T., Vandecasteele B. Trichoderma-inoculated miscanthus straw can replace peat in strawberry cultivation, with beneficial effects on disease control. *Front Plant Sci*. 2018;9:213. doi 10.3389/fpls.2018.00213
- De Vega J., Donnison I., Dyer S., Farrar K. Draft genome assembly of the biofuel grass crop *Miscanthus sacchariflorus* [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Res*. 2021;10:29. doi 10.12688/f1000research.44714.1








- Dorogina O.V., Kuban I.N., Zueva G.A., Zhmud E.V., Vasilyeva O.Yu. Morphological variability and genetic structure of *Miscanthus sinensis* (Poaceae) cultivated in the forest-steppe of Western Siberia. *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(2):210-218. doi 10.18699/vjgb-25-24
- Grzegórska A., Czaplicka N., Antonkiewicz J., Rybarczyk P., Baran A., Dobrzyński K., Zabrocki D., Rogala A. Remediation of soils on municipal rendering plant territories using *Miscanthus × giganteus*. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2023;30(9):22305-22318. doi 10.1007/s11356-022-23724-z
- Hodkinson T.R., Klaas M., Jones M.B., Prickett R., Barth S. *Miscanthus*: a case study for the utilization of natural genetic variation. *Plant Genet Resour.* 2015;13(3):219-237. doi 10.1017/S147926211400094X
- Jury C., Thomas H.L., Carrère H. Life cycle assessment of two alkaline pretreatments of sorghum and miscanthus and of their batch co-digestion with cow manure. *BioEnergy Res.* 2022;15:810-833. doi 10.1007/s12155-021-10369-y
- Li S.-S., Zhou H.-F., Chen W.-L., Yan J., Cai Z., Wei R.-X., Chen C.-H., Han B., Li J.-Q., Sang T., Ge S. Population genetics and evolutionary history of *Miscanthus* species in China. *J Syst Evol.* 2019;57(5):530-542. doi 10.1111/jse.12497
- Li W., Ciais P., Makowski D., Peng S. A global yield dataset for major lignocellulosic bioenergy crops based on field measurements. *Sci Data.* 2018;5:180169. doi 10.1038/sdata.2018.169
- Liu H., Wu S., Li A., Ruan J. SMARTdenovo: a de novo assembler using long noisy reads. *GigaByte.* 2021;2021:gigabyte15. doi 10.46471/gigabyte.15
- Ma X.-F., Jensen E., Alexandrov N., Troukhan M., Zhang L., Thomas-Jones S., Farrar K., Clifton-Brown J., Donnison I., Swaller T., Flavell R. High resolution genetic mapping by genome sequencing reveals genome duplication and tetraploid genetic structure of the diploid *Miscanthus sinensis*. *PLoS One.* 2012;7(3):e33821. doi 10.1371/journal.pone.0033821
- Mamirova A., Pidlisnyuk V., Amirbekov A., Ševců A., Nurzhanova A. Phytoremediation potential of *Miscanthus sinensis* And. in organochlorine pesticides contaminated soil amended by Tween 20 and Activated carbon. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2021;28(13):16092-16106. doi 10.1007/s11356-020-11609-y
- Miao J., Feng Q., Li Y., Zhao Q., Zhou C., Lu H., Fan D., ... Huang T., Li L., Huang X., Sang T., Han B. Chromosome-scale assembly and analysis of biomass crop *Miscanthus lutarioriparius* genome. *Nat Commun.* 2021;12(1):2458. doi 10.1038/s41467-021-22738-4
- Mironova G.F., Budaeva V.V., Skiba E.A., Gismatulina Y.A., Kashcheyeva E.I., Sakovich G.V. Recent advances in *Miscanthus* macromolecule conversion: a brief overview. *Int J Mol Sci.* 2023;24(16):13001. doi 10.3390/ijms241613001
- Mitros T., Session A.M., James B.T., Wu G.A., Belaffif M.B., Clark L.V., Shu S., ... Hudson M.E., Sacks E.J., Moose S.P., Swaminathan K., Rokhsar D.S. Genome biology of the paleotetraploid perennial biomass crop *Miscanthus*. *Nat Commun.* 2020;11(1):5442. doi 10.1038/s41467-020-18923-6
- Nagel K., Hoilett N.O., Mottaleb M.A., Meziani M.J., Wistrom J., Belamy M. Physicochemical characteristics of biochars derived from corn, hardwood, miscanthus, and horse manure biomasses. *Commun Soil Sci Plant Anal.* 2019;50(8):987-1002. doi 10.1080/00103624.2019.1594881
- Nie G., Zhang X.Q., Huang L.K., Xu W.Z., Wang J.P., Zhang Y.W., Ma X., Yan Y.H., Yan H.D. Genetic variability and population structure of the potential bioenergy crop *Miscanthus sinensis* (Poaceae) in southwest china based on SRAP markers. *Molecules.* 2014;19(8):12881-12897. doi 10.3390/molecules190812881
- Nsanganwimana F., Al Souki K.S., Waterlot C., Douay F., Pelfrêne A., Ridošková A., Louvel B., Pourrut B. Potentials of *Miscanthus × giganteus* for phytostabilization of trace element-contaminated soils: ex situ experiment. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021;214:112125. doi 10.1016/j.ecoenv.2021.112125
- Rayburn A.L., Crawford J., Rayburn C.M., Juvik J.A. Genome size of three *Miscanthus* species. *Plant Mol Biol Rep.* 2009;27:184-188. doi 10.1007/s11105-008-0070-3
- Sanford G.R., Oates L.G., Jasrotia P., Thelen K.D., Robertson G.P., Jackson R.D. Comparative productivity of alternative cellulosic energy cropping systems in the North Central USA. *Agric Ecosyst Environ.* 2016;216:344-355. doi 10.1016/j.agee.2015.10.018
- Sang T., Zhu W. China's bioenergy potential. *Glob Change Biol Bioenergy.* 2011;3(2):79-90. doi 10.1111/j.1757-1707.2010.01064.x
- Schäfer J., Sattler M., Iqbal Y., Lewandowski I., Bunzel M. Characterization of *Miscanthus* cell wall polymers. *Glob Change Biol Bioenergy.* 2019;11(1):191-205. doi 10.1111/gcbb.12538
- Shavyrkina N.A., Budaeva V.V., Skiba E.A., Gismatulina Y.A., Sakovich G.V. Review of current prospects for using miscanthus-based polymers. *Polymers.* 2023;15(14):3097. doi 10.3390/polym15143097
- Simão F.A., Waterhouse R.M., Ioannidis P., Kriventseva E.V., Zdobnov E.M. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics.* 2015;31(19):3210-3212. doi 10.1093/bioinformatics/btv351
- Simpson J.T., Wong K., Jackman S.D., Schein J.E., Jones S.J.M., Birol I. ABySS: a parallel assembler for short read sequence data. *Genome Res.* 2009;19(6):1117-1123. doi 10.1101/gr.089532.108
- Stanke M., Steinkamp R., Waack S., Morgenstern B. AUGUSTUS: a web server for gene finding in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:W309-W312. doi 10.1093/nar/gkh379
- Sun Q., Lin Q., Yi Z.L., Yang Z.R., Zhou F.S. A taxonomic revision of *Miscanthus* s.l. (Poaceae) from China. *Bot J Linn Soc.* 2010;164(2):178-220. doi 10.1111/j.1095-8339.2010.01082.x
- Swaminathan K., Chae W.B., Mitros T., Varala K., Xie L., Barling A., Glowacka K., Hall M., Jezowski S., Ming R., Hudson M., Juvik J.A., Rokhsar D.S., Moose S.P. A framework genetic map for *Miscanthus sinensis* from RNAseq-based markers shows recent tetraploidy. *BMC Genomics.* 2012;13:142. doi 10.1186/1471-2164-13-142
- Técher D., Martinez-Chois C., Laval-Gilly P., Henry S., Bennisroune A., D'Innocenzo M., Falla J. Assessment of *Miscanthus × giganteus* for rhizoremediation of long term PAH contaminated soils. *Appl Soil Ecol.* 2012;62:42-49. doi 10.1016/j.apsoil.2012.07.009
- Trieu A., Belaffif M.B., Hirannaiah P., Manjunatha S., Wood R., Bathula Y., Billingsley R.L., Arpan A., Sacks E.J., Clemente T.E., Moose S.P., Reichert N.A., Swaminathan K. Transformation and gene editing in the bioenergy grass *Miscanthus*. *Biotechnol Biofuels Bioprod.* 2022;15:148. doi 10.1186/s13068-022-02241-8
- Van Weyenberg S., Ulens T., de Reu K., Zwervaegher I., Demeyer P., Plum Y. Feasibility of *Miscanthus* as alternative bedding for dairy cows. *Vet Med.* 2016;60(3):121-132. doi 10.17221/8059-VETMED
- Wang C., Kong Y., Hu R., Zhou G. *Miscanthus*: a fast-growing crop for environmental remediation and biofuel production. *Glob Change Biol Bioenergy.* 2021;13(1):58-69. doi 10.1111/gcbb.12761
- Yan H., Zhang X., Fu C., Huang L., Yin G., Nie G., Liu W., Chen T., Lee S., Ma X., Peng Y., Yan Y., Ling Y., Liu W. Chloroplast DNA variation and genetic structure of *Miscanthus sinensis* in southwest China. *Biochem Syst Ecol.* 2015;58:132-138. doi 10.1016/j.bse.2014.11.007
- Yang Y., Saand M.A., Huang L., Abdelaal W.B., Zhang J., Wu Y., Li J., Sirohi M.H., Wang F. Applications of multi-omics technologies for crop improvement. *Front Plant Sci.* 2021;12:563953. doi 10.3389/fpls.2021.563953
- Zhang G., Ge C., Xu P., Wang S., Cheng S., Han Y., Wang Y., ... Ming R., Dong S., Ma J., Zhang X., Chen C. The reference genome of *Miscanthus floridulus* illuminates the evolution of Saccharinae. *Nat Plants.* 2021;7(5):608-618. doi 10.1038/s41477-021-00908-y
- Zhao H., Wang B., He J., Yang J., Pan L., Sun D., Peng J. Genetic diversity and population structure of *Miscanthus sinensis* germplasm in China. *PLoS One.* 2013;8(10):e75672. doi 10.1371/journal.pone.0075672

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 17.11.2025. После доработки 15.01.2026. Принята к публикации 16.02.2026.

doi 10.18699/vjgb-26-61

Создание растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) с инактивированным геном *StPain-1* с помощью CRISPR/Cas9

В.Д. Карлов , М.К. Волков , А.Д. Антипов , Ю.С. Монахова , А.С. Трофимов, Л.Н. Коновалова , А.В. Бабаков, Р.А. Комахин , В.В. Таранов 

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

 v4slvk@yandex.ru

Аннотация. Холодовое хранение клубней картофеля для последующей переработки осложнено развитием холодового осахаривания. При пониженной температуре происходит реакция ферментативного гидролиза сахарозы на глюкозу и фруктозу. Как следствие, высокое содержание гексоз негативно сказывается на качестве продуктов переработки картофеля – чипсов и фри, а также способствует образованию нейротоксина и канцерогена акриламида. Гидролиз сахарозы в процессе холодового осахаривания катализирует вакуолярная инвертаза, кодируемая геном *StPain-1*. Ранее было показано, что подавление активности фермента придает картофелю устойчивость к холодовому осахариванию, не снижая при этом питательных качеств клубней. В настоящей работе с помощью CRISPR/Cas9 были созданы растения культурного картофеля *Solanum tuberosum* L. сорта Фрителла с нокаутом гена *StPain-1*. Для редактирования целевого гена были собраны две генетические конструкции на основе вектора pKSE401 (Вектор А и Вектор В), каждая из которых несла две гидовые РНК: на участки в первом (sgRNA-P1.A и sgRNA-P1.B) и третьем (sgRNA-P3.A и sgRNA-P3.B) экзонах. Эффективность редактирования каждой gRNA была охарактеризована с применением высокопроизводительного секвенирования. С конструкцией Вектор А получено 48 трансформантов, среди которых 22 содержали нокаут всех аллелей гена *StPain-1*; с конструкцией Вектор В – 26 трансформантов, из них 10 были с нокаутом. Путем обжарки чипсов из клубней девяти отредактированных растений картофеля сорта Фрителла было наглядно продемонстрировано снижение активности вакуолярной инвертазы. Чипсы из образцов с нокаутом гена *StPain-1* имели более светлую окраску, чем чипсы из контрольного образца без редактирования. По результатам проведенной работы отобрано четыре растения с нокаутом гена *StPain-1*, по два для каждой конструкции, для которых количественная оценка глюкозы, фруктозы и сахарозы, а также измерение уровня мРНК подтвердили инактивацию фермента. Полученные растения обладают повышенной устойчивостью к холодовому осахариванию и являются перспективными источниками нефункциональных аллелей гена *StPain-1* для селекции новых сортов картофеля.

Ключевые слова: вакуолярная инвертаза; холодовое осахаривание; сахароза; глюкоза; фруктоза; картофель; CRISPR/Cas9; гидовая РНК

Для цитирования: Карлов В.Д., Волков М.К., Антипов А.Д., Монахова Ю.С., Трофимов А.С., Коновалова Л.Н., Бабаков А.В., Комахин Р.А., Таранов В.В. Создание растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) с инактивированным геном *StPain-1* с помощью CRISPR/Cas9. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(4):601-611. doi 10.18699/vjgb-26-61

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, FGUM-2026-0008.

Development of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants with inactivated *StPain-1* gene using CRISPR/Cas9

V.D. Karlov , M.K. Volkov , A.D. Antipov , Yu.S. Monahova , A.S. Trofimov, L.N. Konovalova , A.V. Babakov, R.A. Komakhin , V.V. Taranov 

All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia

 v4slvk@yandex.ru

Abstract. Storage of potato tubers intended for further processing is complicated by their cold-induced sweetening (CIS). Enzymatic hydrolysis of sucrose into glucose and fructose occurs at low temperatures. The resulting high hexose content adversely affects the quality of processed potato products such as chips and fries and promotes the formation of acrylamide, which is a neurotoxin and carcinogen. During CIS, sucrose hydrolysis is catalyzed by vacuolar invertase encoded by the *StPain-1* gene. Previous studies have shown that suppression of the enzyme activity confers potato resistance to CIS without reducing the nutritional value of tubers. In this study, CRISPR/Cas9 technology was used to generate *Solanum tuberosum* L. cv. Fritella plants with a knockout of *StPain-1*. Two binary vectors based on pKSE401 were constructed (Vector A and Vector B), each carrying two gRNAs targeting exon 1 (sgRNA-P1.A or sgRNA-P1.B) and exon 3 (sgRNA-P3.A or sgRNA-P3.B). Editing efficiency with each gRNA was evaluated through next-generation sequencing (NGS). Transformation with Vector A produced 48 transformants, 22 of which carried knockouts in all *StPain-1* alleles. Transformation with Vector B yielded 26 transformants, including 10 plants with complete *StPain-1* knockout. Chips made from tubers of nine edited Fritella plants

demonstrated reduced vacuolar invertase activity: chips from *StPain-1* knockout lines were lighter compared to the non-edited control sample. Quantitative assessment of glucose, fructose, and sucrose levels, as well as *StPain-1* mRNA expression in tubers of four selected transformants (two per vector), confirmed enzyme inactivation. The resulting plants exhibit increased resistance to cold-induced sweetening and can be used as a promising source of nonfunctional *StPain-1* alleles for breeding new potato varieties.

Key words: vacuolar invertase; cold-induced sweetening; sucrose; glucose; fructose; potato; CRISPR/Cas9; guide RNA

For citation: Karlov V.D., Volkov M.K., Antipov A.D., Monahova Yu.S., Trofimov A.S., Konovalova L.N., Babakov A.V., Komakhin R.A., Taranov V.V. Development of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants with inactivated *StPain-1* gene using CRISPR/Cas9. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(4):601-611. doi 10.18699/vjgb-26-61

Введение

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) – одна из главных продовольственных культур. По объему потребления картофель занимает третье место в мире и второе в России (Osipov, Zeldner, 2023). В странах умеренного климатического пояса урожай картофеля собирают один раз в год. Для сохранения товарных качеств клубни хранят при температурах 4–10 °C (Wustman, Struik, 2007). При таких температурах хранения в клубнях происходит холодное осахаривание – процесс избыточного накопления глюкозы и фруктозы (Zrenner et al., 1996). Клубни с холодным осахариванием становятся непригодными для дальнейшей переработки на чипсы или картофель фри, так как при обжарке приобретают темную окраску и горький вкус (Murata, 2021).

Ключевую роль в развитии холодного осахаривания играет фермент вакуолярная инвертаза (β -fructofuranosidase; EC 3.2.1.26) (Davies et al., 1989; Richardson et al., 1990; Blenkinsop et al., 2003), которая катализирует гидролиз сахарозы на гексозы – глюкозу и фруктозу (Zrenner et al., 1996; Zhu et al., 2024). При высокотемпературной обработке происходит реакция Майяра: гексозы взаимодействуют с аминокислотами белков и свободных аминокислот, приводя к образованию пигментов меланоидинов, а также акриламида – опасного для здоровья человека нейротоксина и канцерогена (Tareke et al., 2002; Siaw et al., 2018).

Содержание глюкозы и фруктозы в значительной степени определяет цвет, вкусовые качества и безопасность продуктов обжарки картофеля (Siaw et al., 2018). Использование для высокотемпературной переработки клубней с содержанием гексоз более 1 мг на 1 г сырой массы клубня (СМ) не рекомендуется ввиду высокого накопления акриламида в конечном продукте (Biedermann-Brem et al., 2003).

Для снижения уровня гексоз и повышения устойчивости клубней картофеля к холодному осахариванию было использовано несколько экспериментальных подходов, направленных на подавление ферментативной активности вакуолярной инвертазы, в частности сверхэкспрессия генов природных ингибиторов вакуолярной инвертазы (Greiner et al., 1999; McKenzie et al., 2013), подавление эндогенной экспрессии гена *StPain-1* методом РНК-сайленсинга (Zrenner et al., 1996; Zhang et al., 2008; Bhaskar et al., 2010; Wu et al., 2011; Zhu et al., 2014; Toufiq et al., 2025), а также инактивация гена *StPain-1* подходами геномного редактирования (Clasen et al., 2016; Yasmeen et al., 2022; Ly et al., 2023; Teper-Bamnolker et al., 2023; Shumbe et al., 2024; Egorova et al., 2025; Massa et al., 2025).

Для селекции сортов картофеля, устойчивых к холодному осахариванию, наиболее перспективным представляется метод геномного редактирования, поскольку он позволяет создать новые нефункциональные варианты гена *StPain-1*. Впоследствии нефункциональные аллели *StPain-1* могут быть переданы в новые сорта картофеля путем скрещивания. Причем достаточно инактивации части аллелей, чтобы в достаточной степени снизить активность фермента, что показано в работе (Yasmeen et al., 2022).

Ранее методами традиционной селекции получены сорта картофеля, предназначенные для переработки на чипсы и фри, такие как Королева Анна, Леди Клэр, Барин, Вымпел и др. При холодном хранении в клубнях этих сортов накапливаются меньшие количества глюкозы и фруктозы. Тем не менее содержания гексоз в них достаточно для снижения качества конечного продукта высокотемпературной обработки (Кулакова et al., 2022; Bruno et al., 2025). Растущий спрос на продукты переработки картофеля требует создания новых сортов с повышенной устойчивостью к холодному осахариванию.

Хотя существуют устойчивые к холодному осахариванию генотипы картофеля, созданные методами геномного редактирования на основе сортов Атлантик, Дезире, Симфония, однако наличие трансгена препятствует свободному использованию таких растений для промышленности в ряде стран ввиду законодательных ограничений (Ly et al., 2023; Teper-Bamnolker et al., 2023; Egorova et al., 2025; Massa et al., 2025).

В настоящей работе главной целью было осуществление нокаута гена вакуолярной инвертазы в растениях картофеля сорта Фрителла с целью создания растений – источников нефункциональных аллелей гена *StPain-1* для селекции новых сортов (Симаков и др., 2017). Выбор сорта был основан на повышенной пригодности клубней такого картофеля к переработке на фри и чипсы. Созданные в рамках работы растения представляются перспективными в качестве доноров для селекции новых нетрансгенных сортов картофеля с повышенной устойчивостью к холодному осахариванию.

Материалы и методы

Растительный материал. Тетраплоидные асептические растения картофеля *S. tuberosum* L. сорта Фрителла (предоставлены ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха», г. Москва) культивировали на питательной среде MS (Murashige, Skoog, 1962) при температуре 20–22 °C,

световом периоде 16 ч день/8 ч ночь и освещенности 80 мкмоль м⁻² с⁻¹. Асептические растения были проверены на отсутствие вирусной контаминации с помощью коммерчески доступного набора «ФИТОСКРИН» Potato Virus X, Y, M, L, S, A, PSTVd-PB методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени в рамках молекулярно-генетического экспертного исследования № 57/2023 от 26 июля 2023 г. компанией ООО «Синтол» (Москва, Россия). Агробактериальную трансформацию асептических листовых эксплантов растений картофеля выполняли согласно методике, опубликованной нами ранее (Vetchinkina et al., 2016). В теплице растения картофеля выращивали в сосудах при температуре 20–21 °С, световом периоде 16 ч день/8 ч ночь и освещенности 150 мкмоль м⁻² с⁻¹. Клубни хранили при температуре 4 °С в темноте.

Штамм агробактерий. Для трансформации эксплантов картофеля использовали бактерии *Agrobacterium tumefaciens* штамма AGL0.

Подбор и клонирование gRNA. Из листьев растений картофеля сорта Фрителла выделяли геномную ДНК с использованием цетилтриметиламмония бромидом (СТАВ). Для подбора gRNA кодирующие последовательности первого и третьего экзонов гена *StPain-1* анализировали с помощью алгоритма CRISPOR (<https://crispor.org>) (Concordet, Haecussler, 2018). В работе использовали четыре gRNA: две подобраны к первому экзону (sgRNA-P1.A и sgRNA-P1.B), две – к третьему экзону (sgRNA-P3.A и sgRNA-P3.B). Последовательность sgRNA-P3.A была взята из публикации (Yasmeen et al., 2022). Нуклеотидные последовательности gRNA были попарно клонированы в бинарный вектор для геномного редактирования pKSE401, согласно рекомендациям (Xing et al., 2014), в результате чего получены конструкции Вектор А (sgRNA-P1.A и sgRNA-P3.A) и Вектор В (sgRNA-P1.B и sgRNA-P3.B).

Генотипирование трансгенных растений. Геномную ДНК выделяли из листьев растений репродуктивного поколения T0 с применением цетилтриметиламмония бромида. Участки 1-го и 3-го экзона гена *StPain-1* амплифицировали с использованием олигонуклеотидов, указанных в табл. S1 Приложения¹.

Для проведения ПЦР готовили смесь 1× буфер для Taq-полимеразы, 0.2 мМ dNTP, 0.5 мМ каждого праймера, 1.25 ед. Taq ДНК-полимеразы («Евроген», Москва, Россия) и 20 нг геномной ДНК, с конечным объемом 25 мкл. ПЦР проводили при следующих условиях: 2 мин при 94 °С; затем 30 циклов 10 с при 94 °С, 15 с при 58–62 °С, 40 с при 72 °С; финальная элонгация – 5 мин при 72 °С. Ампликоны анализировали в 1.5 % агарозном геле и очищали с помощью набора ColGen («Синтол», Москва, Россия). Секвенирование ампликонов осуществляли на платформе Illumina MiSeq в ЦКП «Биотехнология» ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии». Качество секвенирования оценивали с помощью программы MultiQC (ver. 1.22.2) (Ewels et al., 2016). Эффективность редактирования це-

левого участка гена для каждого растения определяли в процентах как число прочтений, содержащих мутации, к общему числу прочтений с использованием программы CRISPResso2 (ver. 2.3.1) (Clement et al., 2019).

Оценка содержания сахаров. Отбирали 100 мг ткани клубня и гомогенизировали с помощью пестика в 500 мкл воды. Затем водой доводили объем гомогената до 1000 мкл и перемешивали с использованием вортекса. Остатки растительных тканей удаляли после центрифугирования 2 мин при 13 000 g. Для измерения содержания сахаров отбирали 100 мкл экстракта. Количественную оценку содержания глюкозы, фруктозы и сахарозы выполняли с применением коммерчески доступных наборов Enzytec Liquid D-Glucose/D-Fructose и Enzytec Liquid Sucrose/D-Glucose (R-Biopharm, Германия) согласно рекомендации производителя. Содержание глюкозы, фруктозы и сахарозы приводится в мг на г сырой массы клубня (мг/г СМ).

Оценка содержания крахмала. Фрагмент клубня массой 50 мг гомогенизировали с помощью пестика в 500 мкл смеси диметилсульфоксида с соляной кислотой HCl (соотношение компонентов 4:1 соответственно). Объем суспензии доводили той же смесью до 1.25 мл, перемешивали с использованием вортекса и инкубировали 30 мин при 60 °С. Затем добавляли 2.5 мл ddH₂O и титровали смесь 5 М раствором NaOH до pH 4–5. Смесь центрифугировали 2 мин при 13 000 g, для анализа отбирали 100 мкл надосадочной жидкости. Количественную оценку проводили с применением коммерчески доступного набора Enzytec Liquid Starch (R-Biopharm) согласно рекомендации производителя. Содержание крахмала приводится в мг/г СМ.

Экстракция РНК. Для экстракции РНК отбирали 100 мг ткани клубня и измельчали пестиком в ступке с жидким азотом. Выделение РНК проводили колоночным методом с помощью набора SKYprep RNA Pure Plant Plus Kit (SkyGen, Россия). Проверку качества РНК выполняли методом электрофореза в 1.5 % агарозном геле.

Обратная транскрипция. Реакцию обратной транскрипции осуществляли с помощью ревертазы MMLV («Евроген», Россия). Для проведения реакции готовили смесь 1 × First strand buffer, 0.2 мМ dNTP mix, 2 мМ праймера oligo(dT)₁₅, 1 мг препарата выделенной РНК, 2 мМ DTT, 100 ед. MMLV-RT с конечным объемом 20 мкл согласно рекомендации производителя. Реакцию проводили 60 мин при 37 °С, а затем 10 мин при 70 °С. Синтезированную кДНК использовали в качестве матрицы для проведения количественной ПЦР.

Количественный ПЦР-анализ. Реакционную смесь готовили с помощью 5 × qPCRmix-HS SYBR («Евроген»). Использованные олигонуклеотиды приведены в табл. S1. Реакция осуществлялась при следующих условиях: 3 мин при 95 °С, затем 50 циклов 10 с при 95 °С, 30 с при 60 °С, 30 с при 72 °С. В качестве референсных последовательностей были гены *Tubulin* и *EF-1a* (см. табл. S1) (Nicot et al., 2005; Zhu et al., 2014). Относительную оценку экспрессии гена *StPain-1* рассчитывали методом 2^{-ΔΔCt} (Vandesompele et al., 2002).

¹ Приложение см. по адресу:

<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx34.xlsx>

Жарка чипсов из клубней. Собранные клубни расте-
ний вегетативного поколения T0 после двух месяцев хра-
нения при температуре 4 °C нарезали на ломтики толщи-
ной примерно 1–2 мм и обжаривали в растительном масле
в течение 2 мин при 170 °C.

Статистический анализ. Все эксперименты проводи-
лись в трехкратной повторности. Для полученных данных
выполняли дисперсионный анализ ANOVA. Сравнение
исследуемых образцов с контролем осуществляли с ис-
пользованием критерия Даннетта. Для построения диа-
грамм, отображающих результаты количественной оценки
сахаров, крахмала и оценки относительной экспрессии,
рассчитывали средние величины и их стандартные от-
клонения. Расчеты выполнялись с помощью программы
GraphPad Prism 8.

Результаты

Подбор гидовых РНК для внесения нокаут-мутаций в ген вакуолярной инвертазы *StPain-1*

Ген вакуолярной инвертазы *StPain-1* состоит из 7 экзонов
и 6 интронов (Abbas et al., 2022). В качестве мишеней для
редактирования были выбраны первый и третий экзоны
гена *StPain-1*, поскольку внесение мутаций в 5'-концевую

последовательность гена повышает вероятность нокаута.
Для подбора gRNA было проведено таргетное секвени-
рование ампликонов первого и фрагмента третьего экзо-
нов гена *StPain-1*, полученных с геномной ДНК растения
картофеля сорта Фрителла. Выравнивание нуклеотидных
последовательностей ампликонов первого экзона с ре-
ференсной последовательностью гена *StPain-1* (NCBI:
HQ110080.1) показало наличие нескольких однонуклео-
тидных полиморфизмов в 32-, 174- и 288-м положениях
от старт-кодона, среди которых замена Т на С в 32-м по-
ложении (с.32Т>С) приводила к аминокислотной замене
Leu>Pro в трех аллелях из четырех (рис. 1). Нуклеотидные
последовательности фрагмента 3-го экзона во всех аллелях
были идентичны референсной (см. рис. 1, а).

Для редактирования было подобрано четыре гидовые
РНК к наиболее консервативным участкам гена вакуо-
лярной инвертазы: две – на первый экзон (sgRNA-P1.A
и sgRNA-P1.B) и две – на третий экзон (sgRNA-P3.A и
sgRNA-P3.B) (см. рис. 1, а и рис. 2, а). Последователь-
ности трех гидовых РНК (sgRNA-P1.A, sgRNA-P1.B и
sgRNA-P3.B) были выбраны с использованием инстру-
мента CRISPOR, одна гидовая РНК (sgRNA-P3.A) взята
из работы (Yasmeen et al., 2022). По две гидовые РНК
было клонировано в две генетические конструкции, обо-

HQ110080.1	ATGGCCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCTCCCATTCACATTC	HQ110080.1	GGACTTTAGAGACCCGACCCTGCTGGACCGGACCCCAAAATGGGCAATGGCTTTTAAAC
Pain-1_ex1_allele1	ATGGCCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCTCCCATTCACATTC	Pain-1_ex3_allele1	GGACTTTAGAGACCCGACCCTGCTGGACCGGACCCCAAAATGGGCAATGGCTTTTAAAC
Pain-1_ex1_allele2	ATGGCCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCTCCCATTCACATTC	Pain-1_ex3_allele2	GGACTTTAGAGACCCGACCCTGCTGGACCGGACCCCAAAATGGGCAATGGCTTTTAAAC
Pain-1_ex1_allele3	ATGGCCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCTCCCATTCACATTC	Pain-1_ex3_allele3	GGACTTTAGAGACCCGACCCTGCTGGACCGGACCCCAAAATGGGCAATGGCTTTTAAAC
Pain-1_ex1_allele4	ATGGCCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCTCCCATTCACATTC	Pain-1_ex3_allele4	GGACTTTAGAGACCCGACCCTGCTGGACCGGACCCCAAAATGGGCAATGGCTTTTAAAC
HQ110080.1	CTCCGGATCAACCCGATTCGGCCACCGGAAGTCCTTAAATCATCTCCGGCATTTTC	HQ110080.1	AATCGGGTCTAAGATTGGTAAACCGGTTATGCACTGTTTATGAAACTTCCAACCTCAC
Pain-1_ex1_allele1	CTCCGGATCAACCCGATTCGGCCACCGGAAGTCCTTAAATCATCTCCGGCATTTTC	Pain-1_ex3_allele1	AATCGGGTCTAAGATTGGTAAACCGGTTATGCACTGTTTATGAAACTTCCAACCTCAC
Pain-1_ex1_allele2	CTCCGGATCAACCCGATTCGGCCACCGGAAGTCCTTAAATCATCTCCGGCATTTTC	Pain-1_ex3_allele2	AATCGGGTCTAAGATTGGTAAACCGGTTATGCACTGTTTATGAAACTTCCAACCTCAC
Pain-1_ex1_allele3	CTCCGGATCAACCCGATTCGGCCACCGGAAGTCCTTAAATCATCTCCGGCATTTTC	Pain-1_ex3_allele3	AATCGGGTCTAAGATTGGTAAACCGGTTATGCACTGTTTATGAAACTTCCAACCTCAC
Pain-1_ex1_allele4	CTCCGGATCAACCCGATTCGGCCACCGGAAGTCCTTAAATCATCTCCGGCATTTTC	Pain-1_ex3_allele4	AATCGGGTCTAAGATTGGTAAACCGGTTATGCACTGTTTATGAAACTTCCAACCTCAC
HQ110080.1	CTCTCCTCTTTCCTTTTGGCTTCTGTAGCTCTTTCGGATCCTCAACAACCAATCACCG	HQ110080.1	AAGCTTTAAGCTATTGGATGAAGTGTGCTGATCGGGTTCGGGGTACGGGTATCTGGGAGTG
Pain-1_ex1_allele1	CTCTCCTCTTTCCTTTTGGCTTCTGTAGCTCTTTCGGATCCTCAACAACCAATCACCG	Pain-1_ex3_allele1	AAGCTTTAAGCTATTGGATGAAGTGTGCTGATCGGGTTCGGGGTACGGGTATCTGGGAGTG
Pain-1_ex1_allele2	CTCTCCTCTTTCCTTTTGGCTTCTGTAGCTCTTTCGGATCCTCAACAACCAATCACCG	Pain-1_ex3_allele2	AAGCTTTAAGCTATTGGATGAAGTGTGCTGATCGGGTTCGGGGTACGGGTATCTGGGAGTG
Pain-1_ex1_allele3	CTCTCCTCTTTCCTTTTGGCTTCTGTAGCTCTTTCGGATCCTCAACAACCAATCACCG	Pain-1_ex3_allele3	AAGCTTTAAGCTATTGGATGAAGTGTGCTGATCGGGTTCGGGGTACGGGTATCTGGGAGTG
Pain-1_ex1_allele4	CTCTCCTCTTTCCTTTTGGCTTCTGTAGCTCTTTCGGATCCTCAACAACCAATCACCG	Pain-1_ex3_allele4	AAGCTTTAAGCTATTGGATGAAGTGTGCTGATCGGGTTCGGGGTACGGGTATCTGGGAGTG
HQ110080.1	GACTTGCAGAGTAACCTCCGTTTCGCGCGGCCCGCTCAAGAGGTGTTTCTCAGGGAGTC	HQ110080.1	TCTGGACTTTTACCCGGTATCGACTGAAAAACAACCGGGTTGGACACATCATATAACGG
Pain-1_ex1_allele1	GACTTGCAGAGTAACCTCCGTTTCGCGCGGCCCGCTCAAGAGGTGTTTCTCAGGGAGTC	Pain-1_ex3_allele1	TCTGGACTTTTACCCGGTATCGACTGAAAAACAACCGGGTTGGACACATCATATAACGG
Pain-1_ex1_allele2	GACTTGCAGAGTAACCTCCGTTTCGCGCGGCCCGCTCAAGAGGTGTTTCTCAGGGAGTC	Pain-1_ex3_allele2	TCTGGACTTTTACCCGGTATCGACTGAAAAACAACCGGGTTGGACACATCATATAACGG
Pain-1_ex1_allele3	GACTTGCAGAGTAACCTCCGTTTCGCGCGGCCCGCTCAAGAGGTGTTTCTCAGGGAGTC	Pain-1_ex3_allele3	TCTGGACTTTTACCCGGTATCGACTGAAAAACAACCGGGTTGGACACATCATATAACGG
Pain-1_ex1_allele4	GACTTGCAGAGTAACCTCCGTTTCGCGCGGCCCGCTCAAGAGGTGTTTCTCAGGGAGTC	Pain-1_ex3_allele4	TCTGGACTTTTACCCGGTATCGACTGAAAAACAACCGGGTTGGACACATCATATAACGG
HQ110080.1	TCCGATAAGACTTTTGGAGATGCTGCTCAATGCTAGTCACGTTTCTTATGCGTGGTCCAAT	HQ110080.1	CCCGGGTGAAGCATGTGTTAAAGCAAGTTTATAGTACAATAAGCAAGATCACTATGC
Pain-1_ex1_allele1	TCCGATAAGACTTTTGGAGATGCTGCTCAATGCTAGTCACGTTTCTTATGCGTGGTCCAAT	Pain-1_ex3_allele1	CCCGGGTGAAGCATGTGTTAAAGCAAGTTTATAGTACAATAAGCAAGATCACTATGC
Pain-1_ex1_allele2	TCCGATAAGACTTTTGGAGATGCTGCTCAATGCTAGTCACGTTTCTTATGCGTGGTCCAAT	Pain-1_ex3_allele2	CCCGGGTGAAGCATGTGTTAAAGCAAGTTTATAGTACAATAAGCAAGATCACTATGC
Pain-1_ex1_allele3	TCCGATAAGACTTTTGGAGATGCTGCTCAATGCTAGTCACGTTTCTTATGCGTGGTCCAAT	Pain-1_ex3_allele3	CCCGGGTGAAGCATGTGTTAAAGCAAGTTTATAGTACAATAAGCAAGATCACTATGC
Pain-1_ex1_allele4	TCCGATAAGACTTTTGGAGATGCTGCTCAATGCTAGTCACGTTTCTTATGCGTGGTCCAAT	Pain-1_ex3_allele4	CCCGGGTGAAGCATGTGTTAAAGCAAGTTTATAGTACAATAAGCAAGATCACTATGC
HQ110080.1	GCTATGCTTAGCTGGCAAGAAGACTGCTTACCATTTCACACTCAAAAAAATGGATGAAC	HQ110080.1	TATTGGGACGTATGACTTGACAAGAATAAATGGACACC
Pain-1_ex1_allele1	GCTATGCTTAGCTGGCAAGAAGACTGCTTACCATTTCACACTCAAAAAAATGGATGAAC	Pain-1_ex3_allele1	TATTGGGACGTATGACTTGACAAGAATAAATGGACACC
Pain-1_ex1_allele2	GCTATGCTTAGCTGGCAAGAAGACTGCTTACCATTTCACACTCAAAAAAATGGATGAAC	Pain-1_ex3_allele2	TATTGGGACGTATGACTTGACAAGAATAAATGGACACC
Pain-1_ex1_allele3	GCTATGCTTAGCTGGCAAGAAGACTGCTTACCATTTCACACTCAAAAAAATGGATGAAC	Pain-1_ex3_allele3	TATTGGGACGTATGACTTGACAAGAATAAATGGACACC
Pain-1_ex1_allele4	GCTATGCTTAGCTGGCAAGAAGACTGCTTACCATTTCACACTCAAAAAAATGGATGAAC	Pain-1_ex3_allele4	TATTGGGACGTATGACTTGACAAGAATAAATGGACACC

6		1	10	20
	HQ110080.1_tr	MATQYHSSYDLENSASHYTF		
	Pain-1_ex1_allele1_tr	MATQYHSSYDLENSASHYTF		
	Pain-1_ex1_allele2_tr	MATQYHSSYDLENSASHYTF		
	Pain-1_ex1_allele3_tr	MATQYHSSYDLENSASHYTF		
	Pain-1_ex1_allele4_tr	MATQYHSSYDLENSASHYTF		

Рис. 1. Сходство между участками аллелей гена *StPain-1*.

а – выравнивание нуклеотидных последовательностей первого экзона и фрагмента третьего экзона выявленных четырех аллелей гена *StPain-1* на референсную последовательность (Madeira et al., 2024). Выделено: желтым цветом – полиморфизмы; зеленым – участки редактирования конструкцией Вектор А; серым – конструкцией Вектор В; б – трансляция первых 20 кодонов гена *StPain-1* референсной последовательности и последовательности четырех аллелей, обнаруженных в геноме картофеля сорта Фрителла. Полиморфизмы аминокислотных последовательностей аллелей выделены голубым цветом.

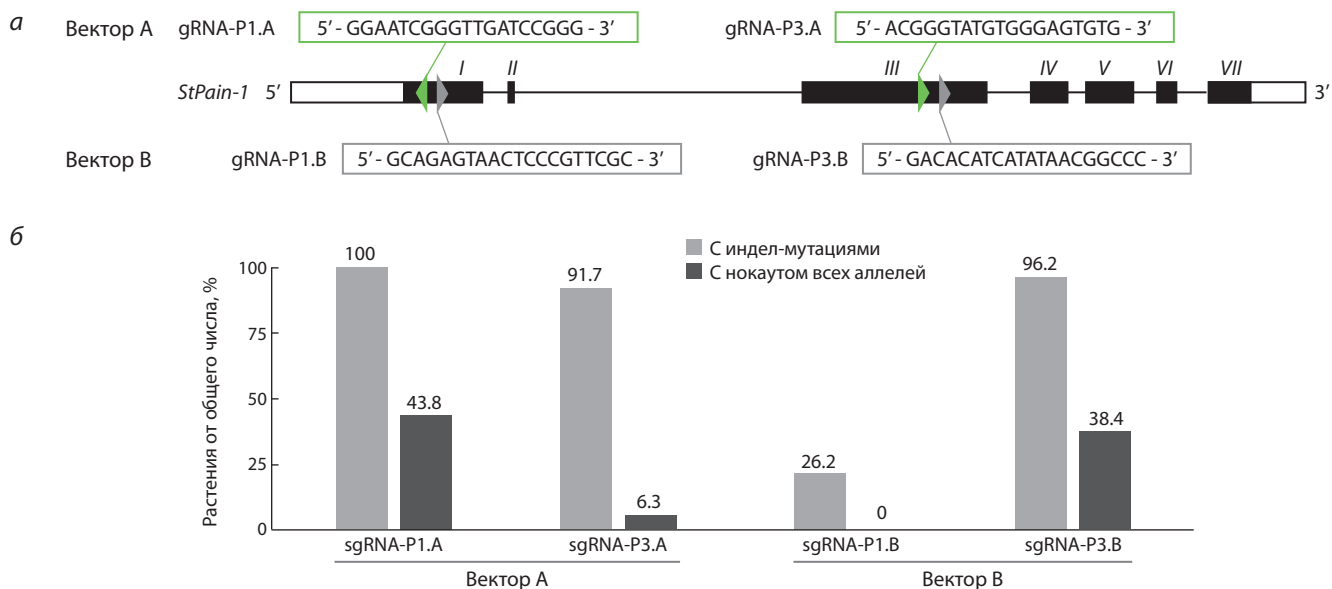


Рис. 2. Эффективность внесения мутаций с помощью разных гидовых РНК в ген вакуолярной инвертазы *StPain-1* растений картофеля сорта Фрителла.

а – схематичное изображение экзон-интронной структуры гена *StPain-1* и расположение гидовых РНК для конструкций Вектор А (выделены зеленым цветом) и Вектор В (выделены серым), стрелками указаны направления гидовых РНК; б – доля растений с индел-мутациями (указаны серым) и с нокаут-мутацией во всех аллелях (указаны черным) гена *StPain-1* среди трансформантов. Для конструкции Вектор А $n = 48$ трансформантов, для конструкции Вектор В $n = 26$ трансформантов.

значенные как Вектор А (sgRNA-P1.A и sgRNA-P3.A) и Вектор В (sgRNA-P1.B и sgRNA-P3.B) (см. рис. 2, а). Одновременное использование двух гидовых РНК в одной генетической конструкции было необходимо, чтобы повысить вероятность нокаута гена в случае низкой эффективности редактирования за счет аддитивного эффекта.

Эффективность редактирования гена *StPain-1* зависит от выбора gRNA

В результате агробактериальной трансформации листовых эксплантов картофеля получено 48 регенерантов для конструкции Вектор А и 26 – для конструкции Вектор В. Оценка эффективности редактирования проводилась с помощью таргетного высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina. Среднее число прочтений составило 1447 при минимальном числе прочтений 128 и максимальном – 4251. Генотипирование трансформантов показало высокую эффективность внесения индел-мутаций обеими генетическими конструкциями (см. рис. 2, б).

Наиболее высокой эффективностью внесения мутаций отличились гидовые РНК sgRNA-P1.A и sgRNA-P3.B, создав индел-мутации в 100 и 96.2 % трансформантов соответственно. При этом нокаут всех аллелей гена удалось достичь только в 43.75 % трансформантов с помощью sgRNA-P1.A и в 38.4 % трансформантов – с помощью sgRNA-P3.B. В случае использования sgRNA-P3.A, несмотря на высокую эффективность внесения индел-мутаций (91.7 % трансформантов), нокаут всех аллелей гена *StPain-1* обнаружен только в 6.25 % трансформантов (3 из 48). Самая низкая эффективность внесения индел-мутаций оказалась у sgRNA-P1.B: всего лишь в 26.9 % растений (7 из 26) были детектированы индел-мутации,

но ни в одном из трансформантов не получен нокаут всех аллелей гена-мишени. В табл. S2 и S3 приведены данные о процентном содержании индел-мутаций и нокаут-мутаций в трансформантах, рассчитанные по результатам NGS.

Разнообразие мутантных вариантов зависит от участка редактирования

По результатам секвенирования на платформе Illumina было охарактеризовано разнообразие вариантов индел-мутаций для каждой из четырех gRNA при редактировании гена *StPain-1* (рис. 3). Количество вариантов мутаций соотносилось с эффективностью gRNA: наиболее эффективные гидовые РНК генерировали большее разнообразие мутаций. Преобладающее большинство мутаций относилось к делециям 1–10 нуклеотидов.

В результате редактирования гена *StPain-1* с помощью конструкции Вектор А в первом экзоне обнаружено 17 различных вариантов индел-мутаций, среди которых чаще всего встречались делеции 4 нуклеотидов (в 28 растениях) и 1 нуклеотида (в 24 растениях). Максимальный размер делеции составлял 14 нуклеотидов. Три варианта индел-мутаций не приводили к сдвигу открытой рамки считывания – делеции 3, 6 и 9 нуклеотидов (см. рис. 3, а). В третьем экзоне обнаружен 21 вариант индел-мутаций, среди которых наиболее распространенными оказались вставка 1 нуклеотида с тиминным основанием (21 растение) и делеции 5 и 3 нуклеотидов (у 15 растений каждая). Максимальный размер делеции в третьем экзоне составил 28 нуклеотидов (см. рис. 3, б).

При использовании конструкции Вектор В в первом экзоне обнаружено всего семь вариантов мутаций: делеции 8, 5, 4, 3, 2, 1 нуклеотидов и вставка 1 нуклеотида с

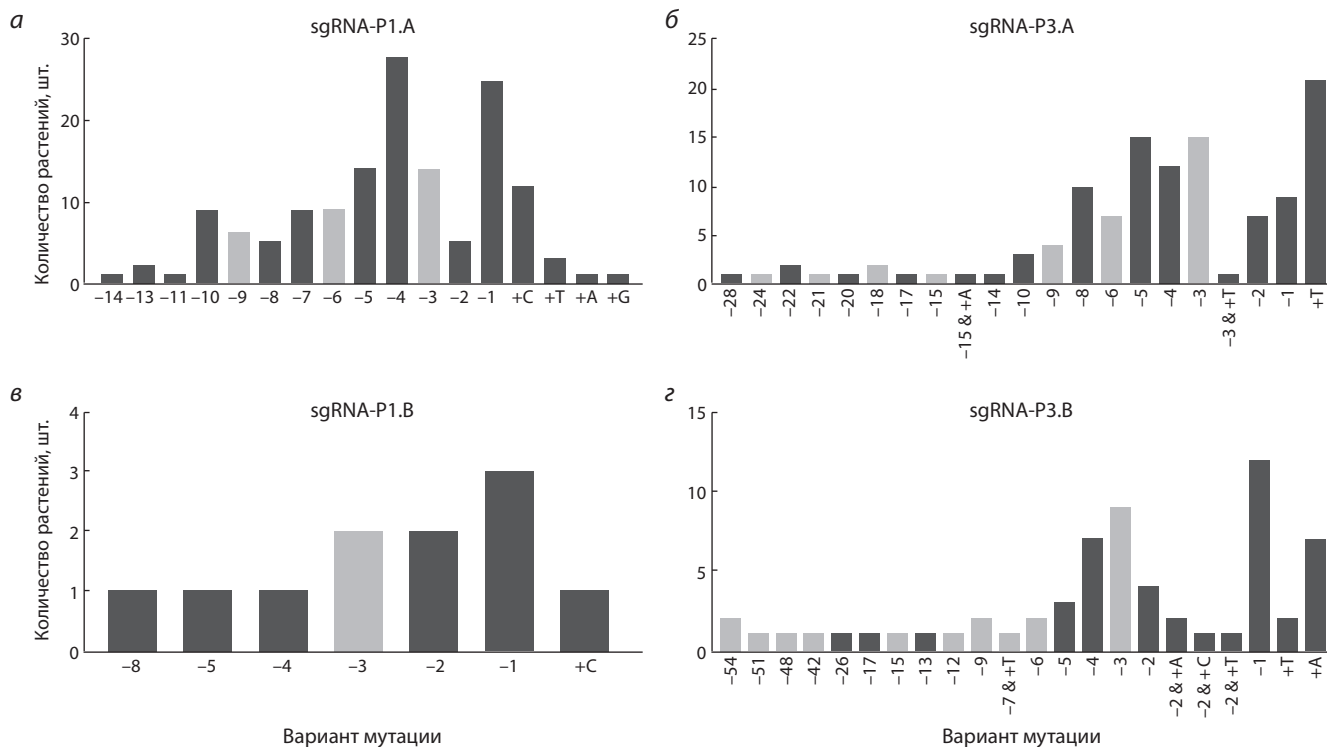


Рис. 3. Разнообразие индел-мутаций, вызывающих (черные столбцы) и не вызывающих (серые столбцы) сдвиг открытой рамки считывания в гене *StPain-1* у трансформантов картофеля сорта Фрителла, созданных с использованием конструкции Вектор А с направляющими sgRNA-P1.A (а) и sgRNA-P3.A (б) или конструкции Вектор В с направляющими sgRNA-P1.B (в) и sgRNA-P3.B (г).

цитозинового основанием (см. рис. 3, в). В третьем экзоне разнообразие индел-мутаций оказалось самым большим – 22 варианта. Наиболее распространенной была делеция 1 нуклеотида (12 растений). Максимальный размер делеции составил 54 нуклеотида (два растения). Почти половина детектированных индел-мутаций оказались делециями кратного трем числа нуклеотидов (см. рис. 3, г). Отсюда можно заключить, что высокая эффективность gRNA сопровождается генерацией большого разнообразия индел-мутаций. Причем разнообразие мутаций определяется конкретным сайтом редактирования. Большинство индел-мутаций приходится на делеции от 1 до 10 нуклеотидов (подробнее см. Приложение).

Оценка растений с нокаутом гена *StPain-1* на устойчивость к холодovому осахариванию

Для фенотипической оценки устойчивости трансформантов к холодovому осахариванию с помощью обжарки чипсов были взяты клубни девяти растений, полученных с помощью Вектора А (5-2, 11-2, 12-1, 13-2, 26-1, 36-1, 45-1, 49-1, 57-2), и клубни пяти растений, полученных с помощью Вектора В (16-1, 20-1, 42-2, 50-2, 56-2). В качестве контроля были клубни трансгенного растения 27-3 (Вектор В), не содержащего индел-мутаций ни в одном из аллелей гена *StPain-1* (см. таблицу).

Результаты обжарки чипсов показали, что для образцов с редактированием гена вакуолярной инвертазы свойственна более светлая окраска, чем для контрольного образца. У образца 11-2 (Вектор А) наблюдалось явное расхож-

дение генотипа с фенотипом: при подтвержденном NGS нокауте чипсы практически полностью имеют темную окраску (подробнее см. в разделе «Обсуждение»).

В эксперимент также было взято несколько образцов от растений, содержавших одновременно редактированные аллели и аллели дикого типа (26-1 – Вектор А и 20-1, 50-2 – Вектор В). Цвет чипсов образца 50-2 был заметно светлее контрольных, но темнее, чем у образцов с нокаутом. В то же время образцам 26-1 и 20-1 оказалось достаточно инактивации части аллелей для сохранения светлой окраски чипсов. Подобный эффект ранее показан в статье (Yasmeen et al., 2022): при инактивации двух из четырех аллелей гена *StPain-1* редактированный картофель приобретал устойчивость к холодovому осахариванию (подробнее см. в разделе «Обсуждение»). Для следующих экспериментов по измерению уровня мРНК *StPain-1*, а также количественной оценке сахаров, крахмала были отобраны клубни четырех растений: 36-1 и 45-1 – Вектор А, 16-1 и 56-2 – Вектор В.

Внесение индел-мутаций в кодирующую последовательность гена приводит к синтезу aberrантной мРНК, которая уничтожается клеточными системами контроля качества мРНК. При измерении экспрессии *StPain-1* в клубнях отобранных растений с нокаутом целевого гена наблюдалось значительное снижение уровня соответствующей мРНК относительно генов *Tubulin* и *EF-1a* (рис. 4, а).

Для подтверждения инактивации фермента вакуолярной инвертазы была проведена количественная оценка содержания сахаров и крахмала. Содержание глюкозы в образ-

Характеристика трансформантов картофеля сорта Фрителла по содержанию нокаут-мутаций в экзонах 1 и 3 гена *StPain-1* и реакции редуцирующих сахаров на обжарку ломтиков клубней

Конструкция	Образец	Прочтения с нокаут-мутациями, %		Чипсы
		в экзоне 1	в экзоне 3	
Вектор А	<u>27-3</u>	0	0	
	5-2	100	29	
	11-2	100	86	
	12-1	100	75	
	13-2	100	100	
	26-1	46	4	
	<u>36-1</u>	100	100	
	<u>45-1</u>	100	50	
	49-1	100	0	
	57-2	100	28	
Вектор В	<u>16-1</u>	20	100	
	20-1	0	47.5	
	42-2	0	100	
	50-2	24	64.7	
	<u>56-2</u>	0	100	

Примечание. Подчеркиванием отмечены образцы, взятые для оценки количества крахмала, сахаров, а также уровня мРНК *StPain-1*.

цах с нокаутом находилось в диапазоне от 0.2 до 0.6 мг/г сырой массы клубня (см. рис. 4, б), а фруктозы – от 0.1 до 0.2 мг/г СМ (см. рис. 4, в) и было достоверно ниже, чем в контрольном образце. Напротив, содержание сахарозы в образцах с нокаутом гена *StPain-1* колебалось в диапазоне от 18.1 до 24.5 мг/г СМ и оказалось значительно выше, чем в контроле (см. рис. 4, г). Как и ожидалось, при измерении содержания крахмала в клубнях различий между образцами не наблюдалось (см. рис. 4, д).

Таким образом, в результате работы созданы и охарактеризованы растения картофеля сорта Фрителла с нокаутом гена *StPain-1*. Содержание гексоз в клубнях полученных растений не превышало рекомендуемой величины в 1 мг гексоз на 1 г СМ (Biedermann-Brem et al., 2003). Создан-

ные растения являются перспективным источником нефункциональных аллелей гена *StPain-1* для селекции новых сортов картофеля, устойчивых к холодовому осахариванию.

Обсуждение

Современные подходы геномного редактирования позволили значительно ускорить селекцию новых сортов сельскохозяйственных культур. На сегодняшний день приоритетными задачами современной селекции считаются улучшение питательных качеств, повышение устойчивости к абиотическим и биотическим стрессам для обеспечения более рационального использования природных ресурсов и снижения экономических издержек для сельского хозяй-

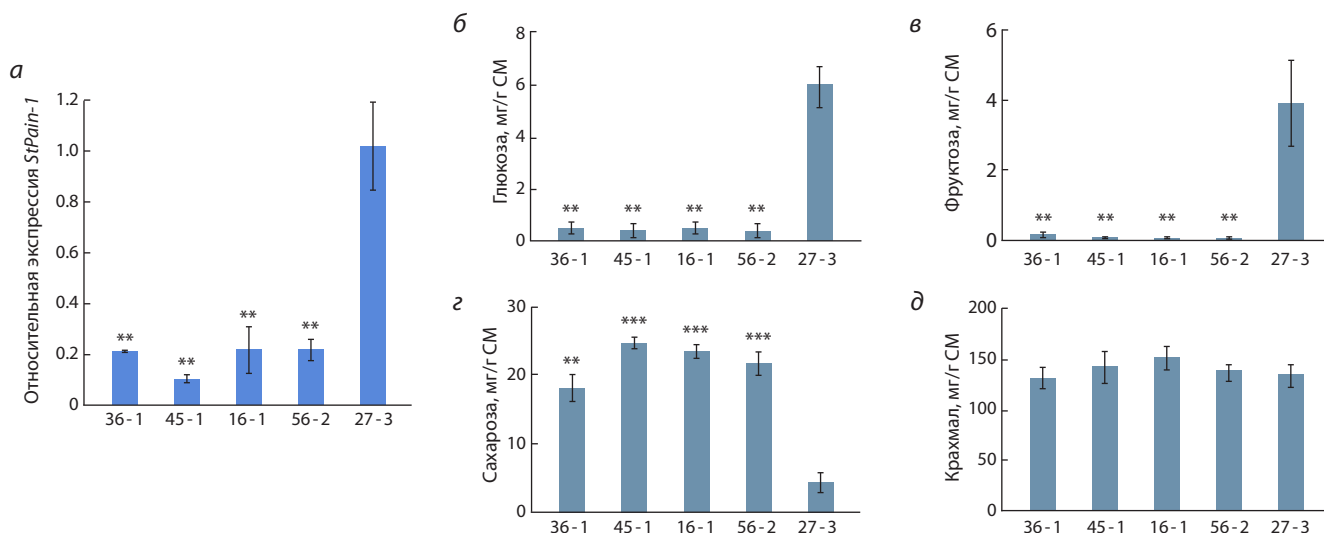


Рис. 4. Оценка содержания углеводов и уровня мРНК гена *StPain-1* в клубнях некоторых трансформантов картофеля сорта Фрителла с нокаутом всех аллелей гена *StPain-1*.

а – сравнение уровня мРНК гена *StPain-1* относительно референсных генов картофеля *Tubulin* и *EF-1a* методом ПЦР в реальном времени; *б* – содержание глюкозы; *в* – содержание фруктозы; *г* – содержание сахарозы; *д* – содержание крахмала, измеренные в мг/г сырой массы клубня (СМ); На диаграммах отражены средние значения ($n = 3$) и их стандартные ошибки. Достоверность различий, рассчитанная с использованием критерия Даннетта, обозначена звездочкой: * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

ства. Настоящая работа посвящена одной из экономически значимых проблем пищевой промышленности – холодовому осахариванию клубней картофеля, вызванному работой фермента вакуолярной инвертазы.

Для инактивации гена вакуолярной инвертазы *StPain-1* в работе использован инструмент CRISPR/Cas9. На основе вектора pKSE401 (Xing et al., 2014) сделаны две конструкции, содержащие по паре гидовых РНК (Вектор А и Вектор В). В каждой конструкции одна gRNA нацелена на участок первого экзона, а другая – на участок третьего экзона. Обе генетические конструкции показали высокую эффективность редактирования гена-мишени. Согласно данным NGS, в результате применения конструкции Вектор А все 48 регенерантов содержали индел-мутации хотя бы в одном аллеле целевого гена, а при использовании конструкции Вектор В – 25 из 26 регенерантов. Причем с помощью конструкции Вектор А удалось добиться нокаута всех аллелей гена *StPain-1* в 22 из 48 регенерантов, а с помощью конструкции Вектор В – в 10 из 26 регенерантов. Высокая эффективность редактирования гена-мишени в значительной степени обеспечивалась одной из двух клонированных gRNA: для Вектора А – sgRNA-P1.A, для Вектора В – sgRNA-P3.B.

Наша работа наглядно демонстрирует критическую важность выбора гидовой РНК при редактировании генов сельскохозяйственных культур. С помощью таргетного секвенирования ампликонов проведено сравнение эффективностей внесения индел-мутаций четырех гидовых РНК. Последовательности sgRNA-P1.A, sgRNA-P1.B и sgRNA-P3.B были выбраны исходя из высоких прогнозируемых эффективностей и минимального количества потенциальных off-target мишеней, согласно алгоритмам CRISPR и CRISPR-P (Lei et al., 2014; Concordet, Haussler, 2018).

Последовательность sgRNA-P3.A была взята из статьи (Yasmeen et al., 2022). На практике sgRNA-P1.B показала самую низкую эффективность редактирования: индел-мутации обнаружены только в 7 растениях из 26, однако мутации содержались не во всех аллелях. Действительно, финальный результат редактирования генома растений зависит от целого ряда факторов, таких как способ доставки редактирующей системы, стабильность комплекса gRNA-Cas9, пространственная организация генома и доступность целевого участка комплексу gRNA-Cas9, работа систем репарации генома и др. А.А. Egorova с коллегами (2025) при редактировании гена *StPain-1* использовали три гидовых РНК внутри одной конструкции – gRNA1, gRNA2, gRNA3, две из которых были направлены на участки в первом экзоне (gRNA1 и gRNA2). При секвенировании полученной выборки растений оказалось, что редактирование с помощью gRNA2 идет гораздо эффективнее, чем с помощью gRNA1. В то же время gRNA3, несмотря на высокую прогнозируемую активность, на опыте показала самую низкую эффективность среди этих гидовых РНК. Более того, эффективность редактирования может зависеть от сорта. Так, при использовании одних и тех же гидовых РНК эффективность нокаута гена *StPain-1* в сорте Атлантик оказалась выше, чем в сорте Спунта (Massa et al., 2025).

Система CRISPR/Cas9 известна своей высокой специфичностью, однако при редактировании организмов нередко возникает off-target эффект – внесение индел-мутаций в нецелевые участки генома с частично комплементарной gRNA последовательностью. Дополнительные мутации, вызванные off-target эффектом, могут влиять на фенотип растения. Очевидно, что у двух различных гидовых РНК набор off-target мишеней отличается. Поэтому в полученных с применением разных гидовых РНК растениях

будет разный набор off-target мутаций. Таким образом, использование двух генетических конструкций в данной работе позволило учесть возможное влияние off-target эффекта при оценке фенотипа редактированных растений.

В результате редактирования гена *StPain-1* наблюдалось большое разнообразие мутантных аллелей, большинство из которых содержали делеции 1, 3 или 4 нуклеотидов. Следует отметить некоторые отличия в формировании индел-мутаций как при редактировании в разных экзонах, так и при редактировании в разных участках одного экзона. Размер экзона 1 составляет 361 п.о., экзона 3 – 860 п.о. Максимальный размер делеции в первом экзоне не превышал 14 нуклеотидов, в то время как в третьем экзоне максимальный размер делеции доходил до 54 нуклеотидов. При inserции одного нуклеотида в первом экзоне чаще включался нуклеотид «С», а в третьем экзоне – «Т». Также в третьем экзоне чаще формировались мутации, не приводящие к сдвигу рамки считывания (мутации, кратные 3).

Отличия при редактировании разных участков внутри одного экзона заключались преимущественно в эффективности создания индел-мутаций. Эффективность нокаута всех аллелей гидовой РНК sgRNA-P3.A оказалась меньше в 6 раз, чем гидовой РНК sgRNA-P3.B, при том что расстояние между сайтами разрезания нуклеазой Cas9 всего в 61 п.о. Еще большей оказалась разница в эффективности нокаута всех аллелей у гидовых РНК sgRNA-P1.A (43.8 %) и sgRNA-P1.B (0 %), дистанция между которыми 137 п.о.

Для наглядного подтверждения инактивации гена вакуолярной инвертазы в регенерантах картофеля сорта Фрителла был проведен опыт по обжарке чипсов. Среди 14 отобранных регенерантов, полученных с помощью Вектора А и Вектора В, нокаут всех аллелей гена показан у 11 растений. При обжарке ломтиков клубней из растений с нокаутом у клубней одного образца, 11 - 2 (Вектор А), наблюдалась темная окраска чипсов с небольшими светлыми сегментами. Такой эффект может объясняться рядом возможных причин. К примеру, темный цвет чипсов, вероятно, вызванный высоким содержанием гексоз в клубне, мог оказаться индивидуальной реакцией трансформанта, спровоцированной изменениями в метаболизме сахарозы вследствие нокаута гена *StPain-1*. Накопление гексоз в таком случае могло быть вызвано другими ферментами, способными гидролизовать сахарозу (например, сахарозосинтаза или гомологичные инвертазы).

В то же время при агробактериальной трансформации растений происходит включение Т-ДНК в геном растения, причем нередко в эухроматиновые участки. Такие модификации генома могут приводить в том числе к изменениям экспрессии отдельных генов, что могло спровоцировать преобразования в метаболизме сахарозы. Причиной наблюдаемого эффекта также могла служить химерность растения-регенеранта. Наличие в одном растении клеток с разными генотипами – известное явление, возникающее при агробактериальной трансформации каллуса. Яркой демонстрацией такого эффекта может быть растение, полученное при инактивации гена *StLEAFY* (Lebedeva et al., 2022).

Еще три растения-регенеранта, из клубней которых были обжарены чипсы, сохранили один или два аллеля дикого типа (26-1, 20-1, 50-2). Однако темный цвет наблюдался только на чипсах образца 50-2. Действительно, пониженное содержание редуцирующих сахаров наблюдалось ранее при нокауте гена *StPain-1* (Yasmeen et al., 2022).

Можно предложить несколько гипотез, объясняющих данное явление. Тетраплоидный картофель известен высокой степенью гетерозиготности. Разные аллели гена *StPain-1* могут содержать нуклеотидные полиморфизмы, влияющие на ферментативную активность вакуолярной инвертазы (Draffehn et al., 2010; Слугина, Кочиева, 2014). В связи с этим инактивация аллеля, кодирующего наиболее активный фермент, может приводить к значительному снижению холододового осахаривания и наоборот. В то же время на скорость реакции может влиять количество фермента, определяемое клеточными системами регуляции экспрессии генов. Причем чаще всего синтез мРНК происходит в аллель-специфичной манере (Pham et al., 2017). Поэтому внесение мутаций в активно транскрибируемые аллели гена *StPain-1* также могло повлиять на содержание глюкозы и фруктозы в клубнях исследуемых трансформантов.

Заключение

На основе картофеля сорта Фрителла российской селекции, предназначенного для промышленной переработки, методом геномного редактирования получены растения с повышенной устойчивостью к холододовому осахариванию. Эти формы растений перспективны для использования в селекции новых сортов картофеля и служат донором нефункциональных аллелей гена вакуолярной инвертазы.

Список литературы / References

- Кулакова А.В., Ефремов Г.И., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Зависимость содержания крахмала и редуцирующих сахаров от уровня экспрессии генов β -амилаз *StBAM1* и *StBAM9* и ингибитора амилаз *StAI* при длительном низкотемпературном хранении клубней картофеля. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(6):507-514. doi 10.18699/VJGB-22-62
- [Kulakova A.V., Efremov G.I., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Dependence of the content of starch and reducing sugars on the level of expression of the genes of β -amylases *StBAM1* and *StBAM9* and the amylase inhibitor *StAI* during long-term low-temperature storage of potato tubers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov J Genet Breed*. 2022;26(6):507-514. doi 10.18699/VJGB-22-62]
- Симаков Е.А., Анисимов Б.В., Митюшкин А.В., Журавлев А.А. Сортовые ресурсы картофеля для целевого выращивания. *Картофель и овощи*. 2017;11:24-26
- [Simakov E.A., Anisimov B.V., Mityushkin A.V., Zhuravlev A.A. Varietal resources for intended potato growing. *Kartofel' i Ovoshchi = Potato and Vegetables*. 2017;11:24-26 (in Russian)]
- Слугина М.А., Кочиева Е.З. Вариативность фрагмента гена кислой вакуолярной инвертазы *Pain-1* у сортов картофеля. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014;18(4/1):718-723
- [Slugina M.A., Kochieva E.Z. Variability of a fragment of the acid vacuolar invertase *Pain-1* gene in potato cultivars. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov J Genet Breed*. 2014;18(4/1):718-723 (in Russian)]
- Abbas A., Shah A.N., Shah A.A., Nadeem M.A., Alsaleh A., Javed T., Alotaibi S.S., Abdelsalam N.R. Genome-wide analysis of invertase gene family, and expression profiling under abiotic stress conditions

- in potato. *Biology (Basel)*. 2022;11(4):539. doi 10.3390/biology11040539
- Bhaskar P.B., Wu L., Busse J.S., Whitty B.R., Hamernik A.J., Jansky S.H., Buell C.R., Bethke P.C., Jiang J. Suppression of the vacuolar invertase gene prevents cold-induced sweetening in potato. *Plant Physiol*. 2010;154(2):939-948. doi 10.1104/pp.110.162545
- Biedermann-Brem S., Noti A., Grob K., Imhof D., Bazzocco D., Pfefferle A. How much reducing sugar may potatoes contain to avoid excessive acrylamide formation during roasting and baking? *Eur Food Res Technol*. 2003;217:369-373. doi 10.1007/s00217-003-0779-z
- Blenkinsop R.W., Yada R.Y., Marangoni A.G. Metabolic control of low-temperature sweetening in potato tubers during postharvest storage. *Hortic Rev*. 2003;30:317-354. doi 10.1002/9780470650837.ch8
- Bruno F., Hein I., Jorat M.E., Ledbetter M., Harrower B., Davies B., Sturrock K., Montague G., Knott M., McNamara G., Fiore A. Effects of agronomical practices on potato growth, nutritional profile, and suitability for frying. *J Sci Food Agric*. 2025;105(7):3983-3992. doi 10.1002/jsfa.14147
- Clasen B.M., Stoddard T.J., Luo S., Demorest Z.L., Li J., Cedrone F., Tibebe R., ... Haun W., Baltes N.J., Mathis L., Voytas D.F., Zhang F. Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnol J*. 2016;14:169-176. doi 10.1111/pbi.12370
- Clement K., Rees H., Canver M.C., Gehrke J.M., Farouni R., Hsu J.Y., Cole M.A., Liu D.R., Joung J.K., Bauer D.E., Pinello L. CRISPResso2 provides accurate and rapid genome editing sequence analysis. *Nat Biotechnol*. 2019;37(3):224-226. doi 10.1038/s41587-019-0032-3
- Concordet J.-P., Haeussler M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(W1):W242-W245. doi 10.1093/nar/gky354
- Davies H.V., Jefferies R.A., Scobie L. Hexose accumulation in cold-stored tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.): the effects of water stress. *J Plant Physiol*. 1989;134(4):471-475. doi 10.1016/S0176-1617(89)80012-4
- Draffehn A.M., Meller S., Li L., Gebhardt C. Natural diversity of potato (*Solanum tuberosum*) invertases. *BMC Plant Biol*. 2010;10:271. doi 10.1186/1471-2229-10-271
- Egorova A.A., Zykova T.E., Kostina N.E., Saboiev I.A., Koloshina K.A., Filipenko E.A., HOFFIE I., Hertig C., Hiekel S., Kumlehn J., Kochetov A.V., Gerasimova S.V. Reduction in cold-induced sweetening by Cas9 endonuclease-mediated knockout of the *POTATO VACUOLAR INVERTASE 1* gene in the cultivar 'Symfonia.' *Potato Res*. 2025;68:1571-1593. doi 10.1007/s11540-024-09800-6
- Ewels P., Magnusson M., Lundin S., Källér M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. 2016;32:3047-3048. doi 10.1093/bioinformatics/btw354
- Greiner S., Rausch T., Sonnewald U., Herbers K. Ectopic expression of a tobacco invertase inhibitor homolog prevents cold-induced sweetening of potato tubers. *Nat Biotechnol*. 1999;17:708-711. doi 10.1038/10924
- Lebedeva M., Komakhin R., Konovalova L., Ivanova L., Taranov V., Monakhova Y., Babakov A., Klepikova A., Zlobin N. Development of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants with *StLEAFY* knockout. *Planta*. 2022;256:116. doi 10.1007/s00425-022-04032-9
- Lei Y., Lu L., Liu H.-Y., Li S., Xing F., Chen L.-L. CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. *Mol Plant*. 2014;7(9):1494-1496. doi 10.1093/mp/ssu044
- Lý D.N.P., Iqbal S., Fosu-Nyarko J., Milroy S., Jones M.G. Multiplex CRISPR-Cas9 gene-editing can deliver potato cultivars with reduced browning and acrylamide. *Plants (Basel)*. 2023;12(2):379. doi 10.3390/plants12020379
- Madeira F., Madhusoodanan N., Lee J., Eusebi A., Niewielska A., Tivey A.R.N., Lopez R., Butcher S. The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. *Nucleic Acids Res*. 2024;52(W1):W521-W525. doi 10.1093/nar/gkac241
- Massa G.A., Décima Oneto C.A., González M.N., Poulsen Hornum A., Arizmendi A., Sucar S., Divito S.B., Feingold S.E. CRISPR/Cas9-mediated development of potato varieties with long-term cold storage and bruising resistance. *Biology (Basel)*. 2025;14(4):445. doi 10.3390/biology14040445
- McKenzie M.J., Chen R.K.Y., Harris J.C., Ashworth M.J., Brummell D.A. Post-translational regulation of acid invertase activity by vacuolar invertase inhibitor affects resistance to cold-induced sweetening of potato tubers. *Plant Cell Environ*. 2013;36(1):176-185. doi 10.1111/j.1365-3040.2012.02565.x
- 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
- Murata M. Browning and pigmentation in food through the Maillard reaction. *Glycoconj J*. 2021;38:283-292. doi 10.1007/s10719-020-09943-x
- Nicot N., Hausman J.-F., Hoffmann L., Evers D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J Exp Bot*. 2005;56(421):2907-2914. doi 10.1093/jxb/eri285
- Osipov V.S., Zeldner A.G. Potato production in Russia and Ukraine. In: Çalişkan M.E., Bakhsh A., Jabran K. (Eds) *Potato Production Worldwide*. Academic Press, 2023;341-363. doi 10.1016/B978-0-12-822925-5.00023-2
- Pham G.M., Newton L., Wiegert-Rininger K., Vaillancourt B., Douches D.S., Buell C.R. Extensive genome heterogeneity leads to preferential allele expression and copy number-dependent expression in cultivated potato. *Plant J*. 2017;92(4):624-637. doi 10.1111/tbj.13706
- Richardson D.L., Davies H.V., Ross H.A., Mackay G.R. Invertase activity and its relation to hexose accumulation in potato tubers. *J Exp Bot*. 1990;41(1):95-99. doi 10.1093/jxb/41.1.95
- Shumbe L., Soares E., Muhovski Y., Smit I., Vanderschuren H. Mutation of the *Vinv* 5' UTR regulatory region reduces acrylamide levels in processed potato to reach EU food-safety standards. *Plant Biotechnol J*. 2024;22(10):2738-2740. doi 10.1111/pbi.14400
- Siaw M.O., Ofofu I.W., Lutterodt H.E., Ankar-Brewoo G.M. Acrylamide exposure and risks in most frequently consumed foods in a total diet study. *Am J Food Sci Technol*. 2018;6(4):123-137. doi 10.12691/ajfst-6-4-1
- Tareke E., Rydberg P., Karlsson P., Eriksson S., Törnqvist M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J Agric Food Chem*. 2002;50(17):4998-5006. doi 10.1021/jf020302f
- Teper-Bamnolker P., Roitman M., Katar O., Peleg N., Aruchamy K., Suher S., Doron-Faigenboim A., ... Fält A., Volpin H., Hofvander P., Gal-On A., Eshel D. An alternative pathway to plant cold tolerance in the absence of vacuolar invertase activity. *Plant J*. 2023;113(2):327-341. doi 10.1111/tbj.16049
- Toufiq N., Adeyinka O.S., Khan A., Shafique S., Jahan N., Bhatti M.U., Khalid R., Naeem A., Abbas Q., Shafique S., Tabassum B. Multiple transgenic strategies positively regulate cold-induced sweetening in low temperature stored potato tubers. *Potato Res*. 2025;68:69-88. doi 10.1007/s11540-024-09733-0
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3(7):research0034. doi 10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- Vetchinkina E.M., Komakhina V.V., Vysotskii D.A., Zaitsev D.V., Smirnov A.N., Babakov A.V., Komakhin R.A. Expression of plant antimicrobial peptide *pro-SmAMP2* gene increases resistance of transgenic potato plants to *Alternaria* and *Fusarium* pathogens. *Russ J Genet*. 2016;52:939-951. doi 10.1134/S1022795416080147
- Wu L., Bhaskar P.B., Busse J.S., Zhang R., Bethke P.C., Jiang J. Developing cold-chipping potato varieties by silencing the vacuolar

- invertase gene. *Crop Sci.* 2011;51(3):981-990. doi 10.2135/cropsci.2010.08.0473
- Wustman R., Struik P.C. The canon of potato science: 35. Seed and ware potato storage. *Potato Res.* 2007;50:351-355. doi 10.1007/s11540-008-9079-0
- Xing H.-L., Dong L., Wang Z.-P., Zhang H.-Y., Han C.-Y., Liu B., Wang X.-C., Chen Q.-J. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol.* 2014;14:327. doi 10.1186/s12870-014-0327-y
- Yasmeen A., Shakoor S., Azam S., Bakhsh A., Shahid N., Latif A., Shahid A.A., Husnain T., Rao A.Q. CRISPR/Cas-mediated knock-down of vacuolar invertase gene expression lowers the cold-induced sweetening in potatoes. *Planta.* 2022;256:107. doi 10.1007/s00425-022-04022-x
- Zhang C., Xie C., Song B., Liu X., Liu J. RNAi effects on regulation of endogenous acid invertase activity in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Chin J Agric Biotechnol.* 2008;5(2):107-112. doi 10.1017/S1479236208002192
- Zhu X., Richael C., Chamberlain P., Busse J.S., Bussan A.J., Jiang J., Bethke P.C. Vacuolar invertase gene silencing in potato (*Solanum tuberosum* L.) improves processing quality by decreasing the frequency of sugar-end defects. *PLoS One.* 2014;9:e93381. doi 10.1371/journal.pone.0093381
- Zhu X., Chen A., Butler N.M., Zeng Z., Xin H., Wang L., Lv Z., Eshel D., Douches D.S., Jiang J. Molecular dissection of an intronic enhancer governing cold-induced expression of the vacuolar invertase gene in potato. *Plant Cell.* 2024;36(5):1985-1999. doi 10.1093/plcell/koae050
- Zrenner R., Schöler K., Sonnwald U. Soluble acid invertase determines the hexose-to-sucrose ratio in cold-stored potato tubers. *Planta.* 1996;198(2):246-252. doi 10.1007/BF00206250

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 07.11.2025. После доработки 16.02.2026. Принята к публикации 17.02.2026.

doi 10.18699/vjgb-26-62

Грибные патогены растений: расшифровка механизмов фузариозного увядания

М.П. Банкин ¹, А.А. Самсонова ¹, Т.А. Рожмина², М.Г. Самсонова  ¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия² Федеральный научный центр лубяных культур, Торжок, Россия m.g.samsonova@gmail.com


Аннотация. Несовершенные грибы вида *Fusarium oxysporum* (*Fo*) относятся к числу самых опасных почвенных патогенов, вызывая фузариозное увядание и корневые гнили более чем у 100 видов растений по всему миру. Некоторые штаммы патогена способны также поражать организмы животных и человека с ослабленным иммунитетом. В связи с этим особую важность представляет изучение молекулярных механизмов, ассоциированных с вирулентностью патогена и иммунным ответом растения на разных стадиях развития заболевания. Процесс обнаружения потенциального хозяина патогеном и все стадии развития инфекционного процесса включают в себя широкий репертуар специфических сигнальных молекул, эффекторных белков, рецепторных комплексов, а также взаимосвязанных и перекрывающихся сигнальных путей. Растения, в свою очередь, выработали сложную систему защиты, чтобы противостоять этой атаке: они тоже обладают комплексными механизмами на молекулярном уровне, которые, будучи запущенными в результате атаки патогена, передают сигналы для активации защитного ответа. В данном обзоре мы рассматриваем основные из известных на сегодняшний день молекулярные механизмы взаимодействия *Fo* с хозяином в системе «растение–патоген»: с момента обнаружения растения и направленного роста гиф патогена, обусловленного реакцией хемотропизма, и до сложных взаимодействий на уровне иммунного ответа и специфических тактик его подавления со стороны гриба. Обзор включает разделы, посвященные динамике заражения растений *Fo*, рассмотрению особенностей организации генома патогена и его геномного разнообразия, иммунному ответу растений и тактике его подавления патогеном, а также анализ основных известных эффекторных молекул патогена и связанных с ними транскрипционных факторов. Отдельное внимание уделено специальной форме *Fo*, поражающей растения льна (*Linum usitatissimum* L.).

Ключевые слова: *Fusarium oxysporum*; взаимодействие растение–патоген; иммунитет растений; эффекторы

Для цитирования: Банкин М.П., Самсонова А.А., Рожмина Т.А., Самсонова М.Г. Грибные патогены растений: расшифровка механизмов фузариозного увядания. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(4):612-624. doi 10.18699/vjgb-26-62

Финансирование. Работа поддержана грантом РФФ 23-16-00037.

Fungal pathogens of plants: deciphering the mechanisms of Fusarium wilt

М.П. Банкин ¹, А.А. Samsonova ¹, Т.А. Rozhmina², М.Г. Samsonova  ¹ Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St.Petersburg, Russia² Federal Research Center for Bast Fiber Crops, Torzhok, Russia m.g.samsonova@gmail.com

Abstract. *Fusarium oxysporum* (*Fo*) is among the most dangerous soilborne pathogens, causing Fusarium wilt and root rots in over 100 plant species worldwide. Some pathogen strains can also infect immunocompromised animals and humans. Consequently, studying the molecular mechanisms associated with pathogen virulence and the plant immune response at different stages of disease development is of paramount importance. The process of host recognition by the pathogen and all stages of the infection process involve a wide repertoire of specific signaling molecules, effector proteins, receptor complexes, as well as interconnected and overlapping signaling pathways. Plants, in turn, have evolved a complex defense system to counter this attack: they also possess intricate molecular-level mechanisms that, triggered by pathogen assault, transmit signals to activate a defensive response. In this review, we examine the main currently known molecular mechanisms of *Fo*-host interaction within the plant-pathogen system: from plant detection and directed hyphal growth driven by chemotropism, to complex interactions at the level of immune response and specific fungal tactics for its suppression. The review includes sections dedicated to the dynamics of plant infection,

pathogen genome organization and its genomic diversity, plant immune response and pathogen suppression tactics, as well as an analysis of the main known effector molecules of the pathogen and associated transcription factors. Special emphasis is put on the special form of *Fo* that infects flax (*Linum usitatissimum* L.).

Key words: *Fusarium oxysporum*; host-pathogen interaction; plant immunity; effectors

For citation: Bankin M.P., Samsonova A.A., Rozhmina T.A., Samsonova M.G. Fungal pathogens of plants: deciphering the mechanisms of Fusarium wilt. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(4):612-624. doi 10.18699/vjgb-26-62

Введение

Фузариозное увядание – опасное заболевание растений, которое вызывают патогенные штаммы микроскопического гриба вида *Fusarium oxysporum* (*Fo*) (Gordon, 2017; Zhang, Ma, 2017). Оно представляет собой серьезную угрозу для сельского хозяйства, а *Fo* входит в десятку наиболее разрушительных грибковых патогенов растений во всем мире (Kommedahl et al., 1970; Dean et al., 2012; Rozhmina et al., 2022). Вызванная *Fo* инфекция может приводить к катастрофическим потерям урожая, ярким примером является фузариозное увядание банана (Widnigraheni et al., 2018; Zhang et al., 2024). Помимо фузариозного увядания растений, некоторые штаммы *Fo* могут также вызывать корневую гниль (Gargouri Jbir et al., 2024; Ma K. et al., 2024).

Патогенность *Fo* зависит от конкретного хозяина, так как обычно штаммы, инфицирующие один вид растений, не вызывают заболевания у других (Kistler, 1997; O'Donnell et al., 1998; Edel-Herrmann, Lecomte, 2019). На основе этой хозяиноспецифичности патогенные штаммы *Fo* были классифицированы в так называемые специальные формы (ff. spp.), которых в настоящее время описано более ста (Dean et al., 2012; Edel-Herrmann, Lecomte, 2019). Помимо форм, заражающих растения, известны формы *Fo*, способные заражать животных и человека (Zhang et al., 2020). Для *Fo* характерен полиморфный образ жизни, который варьирует у разных генотипов. В него входят как почвенные сапрофиты и эндофитные штаммы, так и специализированные паразиты (Dean et al., 2012). Эндофиты *Fo* населяют ткани живых растений, не вызывая каких-либо негативных последствий для их функционирования и развития (de Lamo, Takken, 2020). Еще одной особенностью является то, что никто пока не наблюдал полового размножения у *Fo*, несмотря на наличие консервативных генов типа спаривания (*MAT1-1* или *MAT1-2*), которые характерны для видов, размножающихся половым путем (Yun et al., 2000; Fayyaz et al., 2023; Zhang et al., 2024). Так, большинство изученных нами патогенных штаммов *Fo*, поражающих растения льна (*Linum usitatissimum*), содержали идиоморфу локуса типа спаривания *MAT1-2*, соответствующую типу спаривания “а”, и только один штамм – идиоморфу *MAT1-1*, соответствующую типу спаривания “alpha” (Logachev et al., 2024). Поскольку *Fo* размножается бесполом путем, сам факт сохранения этих генов в геноме патогена представляет загадку.

Восприятие хозяина и вирулентность *Fo* включают несколько рецепторов и сигнальных каскадов. Мембранный белок Msb2 регулирует сигнальный путь Fmk1, который играет ключевую роль в вирулентности *Fo* (Pérez-Nadales,

Di Pietro, 2011). Члены комплекса Velvet (LaeA/VeA/VelB/VelC), белки Ras, компоненты G-белков и путь сАМР также могут регулировать вирулентность *Fo* (Husaini et al., 2018). Четыре белка комплекса Velvet имеют критическое значение в обеспечении доступности хроматина и экспрессии кластера генов биосинтеза боверицина – депсипептидного микотоксина. Белки VeA и LaeA были необходимы для полной вирулентности *Fo* на растениях томата (López-Berger et al., 2013). ГТФаза Rho1 *Fo* важна для поддержания гифальной архитектуры и инфицирования растений, но не животных (Martínez-Rocha et al., 2008). Гены альфа- и бета-субъединиц G-белков *FGA2* и *FGB1* участвуют в патогенности *Fo* f. sp. *cubense*. *FGA2* регулирует вирулентность гриба напрямую, а *FGB1* участвует как в вирулентности, так и в развитии через множество путей, включая путь сАМР-РКА (Guo et al., 2016).

Динамика заражения растений *Fo*

Процесс колонизации растения патогеном начинается с обнаружения корня спорами или гифами *Fo*, оказавшимися в непосредственной близости от него. Идентификация растения-хозяина основана на хемотропизме – направленном росте патогена по градиенту концентрации выделяемых растением химических веществ (Nordzieke et al., 2019). Корневые экссудаты растения содержат углеводы, которые индуцируют прорастание хламидоспор и микроконидий патогена томатов *Fo* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) и *Fo* f. sp. *radicis-lycopersici* (*Forl*) (Steinkeller et al., 2005; Turrà et al., 2015). Помимо этого, хемотропизм гиф к корням томата запускается секретлируемыми пероксидазами растений (Prx) (Turrà et al., 2015; Nordzieke et al., 2019; Sridhar et al., 2020).

После прорастания спор эндофитные и патогенные штаммы *Fo* колонизируют корневую систему растений. Гифы гриба проникают в корни через раны, трещины в эпидермисе, точки выхода боковых корней или путем прямого проникновения в кончик корня в зависимости от штамма *Fo* и вида растения (Zhou et al., 2020). Гифы достигают сосудов через апопласт кортекса корня. Как патогенные, так и непатогенные штаммы колонизируют кортекс, но хотя первоначальная картина колонизации сходна, степень и характер колонизации различаются на более поздних стадиях (Validov et al., 2011). Как правило, только патогенные штаммы способны эффективно проникать в сосуды ксилемы, откуда они колонизируют надземные ткани (Mes et al., 2000; Benhamou, Garand, 2001; Van der Does et al., 2019). Возможное объяснение этому факту было недавно получено в работе (Ayukawa et al., 2021). Оказалось, что колонизации стебля растений *Arabidopsis* штаммом

Cong:1-1 *Fo f. sp. conglutinans (Focn)* препятствует активности генов *CYP79B2/CYP79B3*, которые контролируют синтез вторичных метаболитов на основе триптофана. Одна из хромосом *Focn* Chr^{SC10/SC20}, содержащая сцепленные гены *Six8* и *PSE1*, обеспечивала колонизацию стебля за пределы сосудов корневой ксилемы у двойных мутантов по этим генам.

Геном *Fo* и геномное разнообразие

К настоящему времени секвенированы десятки геномов многих специальных форм *Fo*, поражающих экономически важные культуры, например, *fragariae* (Henry et al., 2021), *sepaе* (Armitage et al., 2018), *vasinfectum* (Seo et al., 2020), *ciceris* (Fayyaz et al., 2023), *pisi* (Williams et al., 2016; Jenkins et al., 2021), а также эндофитных штаммов (Wang B. et al., 2020). Все эти геномы компартиментализованы и демонстрируют мозаичную архитектуру, включающую, с одной стороны, обогащенные генами и обедненные транспозонами районы, содержащие высококонсервативные гены домашнего хозяйства, и, с другой – районы, обедненные генами и богатые повторами, которые содержат быстро эволюционирующие гены, связанные с вирулентностью,

например эффекторных генов (Dong et al., 2015). Дополнительными характеристиками варибельной части генома *Fo* могут быть АТ-богатые изомеры, специфические модификации хроматина и физическая организация в виде добавочных хромосом, что усиливает компартиментализацию геномов и, как полагают, обеспечивает быструю их эволюцию (Frantzeskakis et al., 2019; Torres et al., 2020).

Большинство известных геномов *Fo* имеют около 11 хромосом, относящихся к консервативной части генома. Варибельная часть генома может быть полностью включена в состав консервативных хромосом в виде протяженных блоков, так что все хромосомы оказываются химерами (*Fo f. sp. cubense*) (Zhang et al., 2024), либо может частично входить в состав химерных хромосом, а частично быть представлена отдельными хромосомами, которые называются также добавочными (у *Fo f. sp. lycopersici*, *Fo f. sp. conglutinans*) (Ma L.-J. et al., 2010; Wang Y. et al., 2024). Существуют геномы, у которых химерные хромосомы отсутствуют, например *Fo f. sp. lini* (рис. 1) или эндофитный штамм *Fo47* (Kanapin et al., 2020; Wang B. et al., 2020; Samsonova et al., 2021). Количество добавочных хромосом варьирует от 1 до 9 в зависимости от штамма

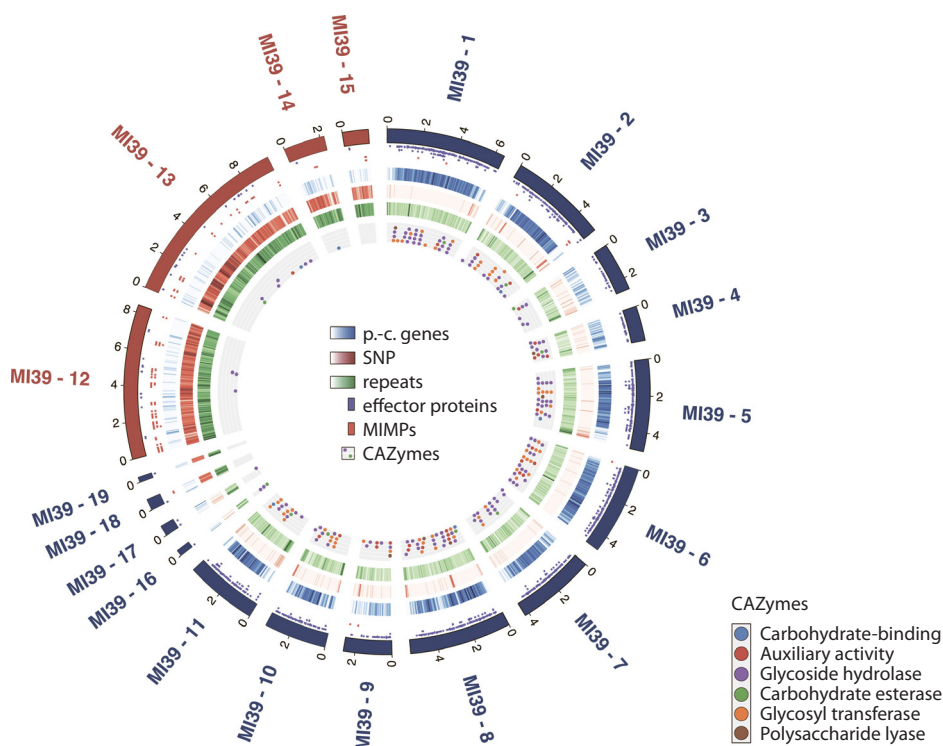


Рис. 1. Организация генома *Fo f. sp. lini*.

Референсный геном *Folini* собран из коротких прочтений Illumina и длинных чтений PacBio ДНК высоковирулентного штамма MI39 (Samsonova et al., 2021). На диаграмме Circos внешний круг изображает хромосомную идеограмму, где хромосомы отнесены к коровому (синий) или варибельному (красный) компартаментам генома. Всего 19 хромосом. Следующие два кольца (фиолетовые и красные штрихи) показывают гены, кодирующие эффекторы (необходимы для вирулентности), и геномные позиции транспозонов MIMP соответственно. Плотность белок-кодирующих генов (p-с. генов), однонуклеотидных полиморфизмов и повторяющихся элементов вдоль хромосом представлена в виде синих, красных и зеленых дорожек. Градиент интенсивности цвета отражает изменения в плотности: самый темный оттенок соответствует максимальным значениям плотности. Самая внутренняя дорожка (серая с круговыми глифами) показывает расположение ферментов, участвующих в синтезе и расщеплении углеводов (CAZymes). Типы CAZyme обозначены следующим образом: синий – углеводсвязывающие; красный – ауксиллярная активность; фиолетовый – гликозидгидролазы; зеленый – эстеразы углеводов; оранжевый – гликозилтрансферазы; коричневый – полисахаридлиазы.

и специальной формы. Соответственно размеры геномов *Fo*, а также число белок-кодирующих генов варьируют в пределах 50–70 Мб и 14000–21000 соответственно (Ma L.-J. et al., 2010; Williams et al., 2016; Armitage et al., 2018; Kanapin et al., 2020; Seo et al., 2020; Wang B. et al., 2020; Samsonova et al., 2021; Fayyaz et al., 2023; Wang Y. et al., 2024).

Анализ индивидуальных геномов специальных форм выявил высокую коллинеарность коровых хромосом и отсутствие коллинеарности между гомологичными добавочными хромосомами (рис. 2), что указывает на то, что добавочные хромосомы в индивидуальных геномах претерпевают множественные структурные перестройки (Bates et al., 2024; Logachev et al., 2024). Индивидуальные сравнения также продемонстрировали высокий уровень вариабельности в репертуаре индивидуальных генов. Так, например, из всего репертуара генов *Folini* лишь 54 % присутствуют в геномах 13 изолятов этой специальной формы. Более того, разные изоляты *Folini* различаются репертуаром генов, кодирующих эффекторы и другие необходимые для инфекции секретируемые белки, что позволяет им эффективно обходить защитные механизмы растений (Logachev et al., 2024).

Филогенетический анализ *F. oxysporum* выявляет полифилетическое разделение, при котором изоляты, заражающие одно растение-хозяин, могут попадать в разные клады. Так, на дереве максимального правдоподобия для данных о последовательности гена EF-1 alpha для группы из 50 изолятов, включая 13 геномов *Folini* и геномы других специальных форм, различные изоляты, заражающие лен, находятся в разных кладах (Logachev et al., 2024). Это означает, что они возникли независимо в ходе эволюции на разных генетических фонах. Поскольку у *Fo* нет полового процесса, механизм, с помощью которого это происходит, долгое время оставался неуловимым, но недавно было показано, что за появление новых патогенных линий отвечает горизонтальный перенос хромосом.

Горизонтальный перенос добавочных или специфических для каждой линии хромосом описан у ряда патогенных для растений нитчатых грибов (Vlaardingerbroek et al., 2016). Впервые возможность горизонтального переноса хромосом у *Fo* продемонстрирована на примере специальной формы *Fol*, заражающей томаты. В результате коинкубации микроконидий двух штаммов – патогенного штамма *Fol007* и эндофитного штамма *Fo47*, различающихся по устойчивости к антибиотикам, были отобраны штаммы гриба с устойчивостью сразу к двум антибиотикам (Ma L.-J. et al., 2010). Эти штаммы были патогенными при заражении томата, а электрофорез в однородном электрическом поле с фиксированным контуром показал, что, помимо хромосом эндофитного штамма *Fo47*, все они содержали одну или две новых хромосомы. Одна них соответствует добавочной хромосоме 14 *Fol*. В настоящее время горизонтальный перенос хромосом продемонстрирован еще у одной специальной формы *Fo* – *radicis cucumerinum* (*Forc*), которая патогенна на огурце, дыне и арбузе (Vlaardingerbroek et al., 2016; van Dam et al., 2017; Li et al., 2020).

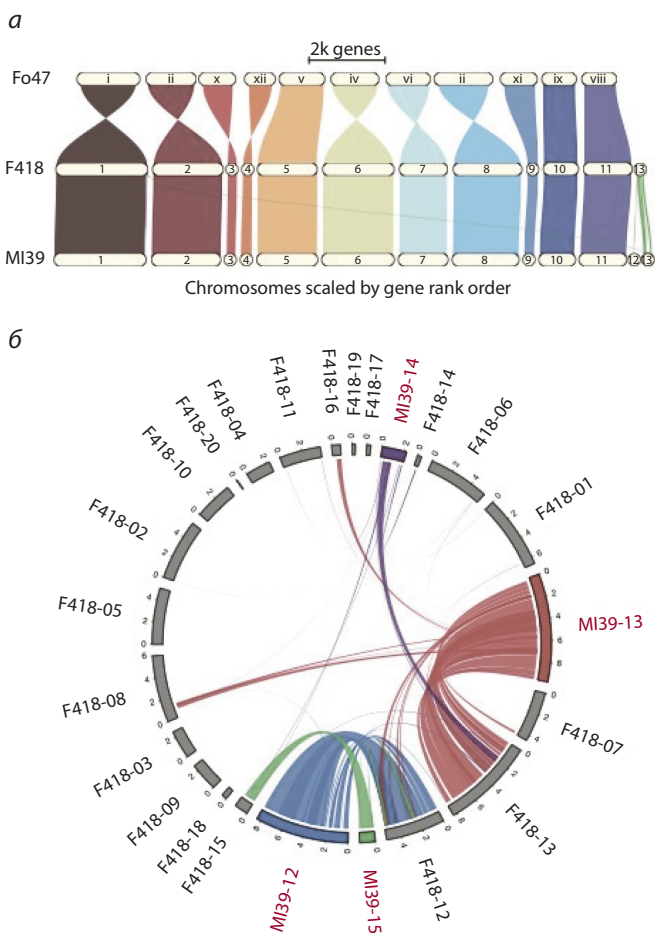


Рис. 2. Сравнение геномных сборок MI39 и F418.

а – карта областей синтении для коровой части геномов двух изолятов *Folini* MI39, F418 и эндофитного штамма *Fo47*; б – график Circos (Krzywinski et al., 2009), показывающий области синтении между добавочными хромосомами этих же штаммов.

Механизмы иммунного ответа растений

Несмотря на отсутствие у растений подвижных иммунных клеток и адаптивной иммунной системы, они демонстрируют эффективный иммунный ответ на широкий спектр патогенов (Jones, Dangl, 2006; Kourelis, van der Hoorn, 2018).

Защитные механизмы растений в ответ на атаку патогена включают несколько видов иммунного ответа. Первый, называемый РТИ (pattern triggered immunity), активируется патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (PAMP) или поврежденно-ассоциированными молекулярными паттернами (DAMP), которые обычно представляют собой небольшие молекулы, вырабатываемые патогеном или возникающие в результате разрушения клеточной стенки растения (Balint-Kurti, 2019). Патоген-ассоциированные молекулярные паттерны распознаются рецепторами распознавания паттернов (PRR) (Kunstler et al., 2016), которые являются мембраносвязанными белками. В ответ происходит несколько сигнальных событий, таких как активация каскада MAP-киназ, приток Ca в цитозоль и производство реактивных форм кислорода (ROS).

В результате запуск серии сигнальных реакций приводит к синтезу антимикробных соединений и активации защитных генов.

Вторая линия защиты запускается эффекторами – белками, которые могут модифицировать клеточные мишени для подавления РТИ (Tsuda, Katagiri, 2010). Эффекторно-триггерный иммунитет (ЕТИ) активируется, когда белок R-гена растения распознает эффектор, кодируемый геном авирулентности (Avr) патогена (Kunstler et al., 2016). Этот тип взаимодействия, так называемые отношения «ген за ген», был впервые обнаружен Флором (Flor, 1971), когда он изучал взаимодействие хозяина и патогена льна/ржавчины льна. Взаимодействие эффекторов с продуктами R-генов вызывает сильный защитный ответ, часто заканчивающийся локальной гибелью клеток и называемый реакцией сверхчувствительности (HR). РТИ и ЕТИ взаимно связаны и вместе потенцируют иммунный ответ (Ngou et al., 2021; Nguyen et al., 2021).

Доказанные внутриклеточные функции эффекторов грибов включают манипуляцию метаболическими процессами

или транскрипционными регуляторами (Djamei et al., 2011; Plett et al., 2014; Tanaka et al., 2014; Weßling et al., 2014). Недавно было показано, что эффекторы грибов могут подавлять внутриклеточную сигнализацию РТИ (Di et al., 2017; Irieda et al., 2019; Navarrete et al., 2022), однако общность такого механизма для грибов еще предстоит доказать (Tintor et al., 2020).

Тактика подавления иммунного ответа растения у *Fo*

За последнее время удалось идентифицировать много новых эффекторных генов *Fo* и сделать ряд обобщений относительно их локализации в геноме, нахождении их продуктов в растении и о механизме их действия (рис. 3). Прежде всего, стало очевидно, что эффекторные гены располагаются не только на добавочных хромосомах (Sun et al., 2022). Исследование геномов *Folini* показало, что большинство эффекторных генов локализуется в консервативной части генома и что около 40 % таких генов присутствует в геномах не всех штаммов. Это означает,

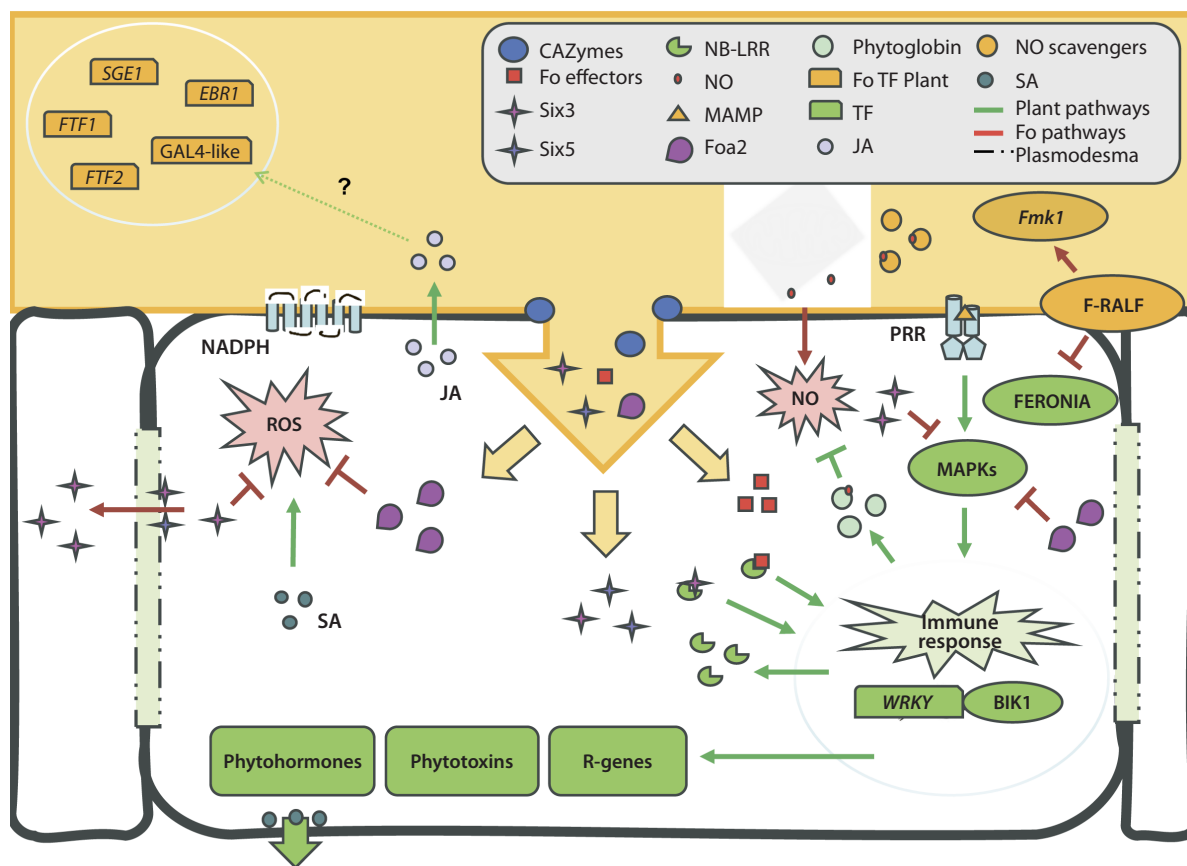


Рис. 3. Схематическое представление взаимодействия эффекторов *Fo* с основными компонентами иммунной системы растений.

На схеме красными линиями обозначены основные пути действия патогена на растение, зелеными – пути ответной реакции растения на вторжение патогена. Сокращения в легенде: CAZymes – ферменты, активно расщепляющие и синтезирующие углеводы; Fo effectors – эффекторы *Fo*; Six3/Six5 – небольшие, богатые цистеином белки-эффекторы *Fo*; NB-LRR/PRR – основные продукты работы генов иммунного ответа растения (R-генов) с цитоплазматической и трансмембранной локализацией соответственно; NO – оксид азота; MAMP – микроб-ассоциированные молекулярные паттерны; Foa2 – эффектор *Fo*; Phytoglobin – растительные белки, участвующие в инактивации NO; Fo TF Plant – транскрипционные факторы *Fo*; TF – транскрипционные факторы растений; JA – жасмоновая кислота; NO scavengers – белки *Fo*, участвующие в инактивации NO; SA – салициловая кислота.

что разные изоляты *Folini* имеют разный репертуар эффекторов (Logachev et al., 2024).

Белки SIX – наиболее хорошо изученный класс эффекторов у *Fo*. Эти небольшие, богатые цистеином белки были выделены из ксилемного сока проростков томата, инфицированных *Fo f. sp. lycopersici* (Rep et al., 2002). Гены *SIX* принадлежат к 14 семействам генов и расположены на вариабельных хромосомах. Каждая специальная форма имеет характерный профиль белков SIX и последовательности генов (De Sain, Rep, 2015). Геномы эндوفитных штаммов *Fo* могут содержать ортологи известных генов-эффекторов, однако по сравнению с патогенными изолятами эндифиты обычно содержат меньше кандидатных эффекторных генов (van Dam et al., 2017; de Lamo, Takken, 2020; Constantin et al., 2021). Интересно, что в наших исследованиях мы не смогли обнаружить гены *SIX* у двух слабовирулентных штаммов *Folini*, F365 и F482 (Logachev et al., 2024). Вероятно, изоляты *Folini* могут заражать растения и в отсутствие генов *SIX*. Тем не менее остальные геномы *Folini*, независимо от их статуса патогенности, демонстрировали идентичные наборы семейств генов *SIX*, а именно *SIX1*, *SIX7*, *SIX10*, *SIX12* и *SIX13*. Таким образом, можно предположить сохранение репертуара генов *SIX* у специальной формы, заражающей лен (Logachev et al., 2024).

Потеря генов *SIX* снижает патогенность *Fo*. Такие результаты получены для *SIX1*, *SIX3*, *SIX5*, *SIX6* и *SIX8*, прежде всего на специальной форме *Fo*, заражающей томаты, и для гена *SIX6* у *Forc* – специальной формы, заражающей огурец (Rep et al., 2004; Houterman et al., 2009; Gawehns et al., 2014, 2015; Ma L. et al., 2015; Ayukawa et al., 2021).

Несмотря на очевидную важность для заражения растения-хозяина, функции большинства белков SIX до сих пор не установлены (Jangir et al., 2021). Единственным исключением является ген *SIX3* (*AVR2*) (Houterman et al., 2009), который манипулирует иммунитетом растения на уровне РТИ (см. рис. 3). В качестве фактора вирулентности *Avr2* подавляет несколько реакций РТИ, включая накопление ROS, отложение каллозы и активацию MAPK. Недавние исследования у *Arabidopsis thaliana* позволили установить, что механизм действия *Avr2* связан с рецептороподобной цитоплазматической киназой BOTRYTIS-INDUCED KINASE1 (BIK1). Бактериальный флагеллин (и его производное, пептид flg22) и грибной хитин – два хорошо изученных PAMP, которые распознаются рецепторами распознавания паттернов (PRR) *A. thaliana* FLAGELLIN SENSING 2 (FLS2) и CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE 1 (CERK1)/LYSINE MOTIF RECEPTOR KINASE 5 (LYK5) соответственно. При связывании с flg22 FLS2 образует сигнальный комплекс со своим корцептоном BAK1. BAK1 – это рецепторная киназа, обогащенная лейциновыми повторами, которая в составе комплекса FLS2-BAK1 фосфорилирует рецептороподобную цитоплазматическую киназу BIK1 в нескольких местах (Lin et al., 2014). Затем BIK1 моноубиквитинируется E3-лигазами RHA3A и RHA3B, что позволяет ей диссоцииро-

вать из комплекса FLS2-BAK1 в цитозоль (Blekemolen et al., 2023).

Иммунорегулирующая функция BIK1 зависит как от ядерной, так и от цитозольной локализации. Ядерная локализация BIK1 необходима для активации экспрессии защитных генов, например, путем фосфорилирования транскрипционных факторов WRKY, участвующих в регуляции защитных гормонов – салициловой и жасмоновой кислот. Цитоплазматическая локализация BIK1 при диссоциации от иммунорецепторного комплекса на плазматической мембране необходима для запуска ROS-опосредованного сигналинга через фосфорилирование комплекса RBOHD, локализованного на плазматической мембране (Fu et al., 2024). *Avr2* нарушает моноубиквитинирование BIK1, а поскольку моноубиквитинирование BIK1 необходимо для ее интернализации в присутствии *Avr2*, BIK1 остается на плазматической мембране и не может осуществлять иммунорегулирующую функцию (Blekemolen et al., 2023; Li et al., 2024).

У патогена томата гены эффекторов *Six3* и *Six5* имеют общий промотор, расположенный «выше по течению» по отношению к кодирующим областям этих генов. Было показано, что *Six3* и *Six5* локализуются как в цитоплазме, так и в ядре клеток, но их колокализация обнаруживается только на плазмодесме (Cao et al., 2018). Взаимодействие *Six5* с *Six3* изменяет физические свойства плазмодесмы, позволяя *Six3* перемещаться в соседние клетки. В восприимчивом растении это выгодно патогену и способствует распространению инфекции.

Помимо рецептороподобных киназ, мишенями эффекторов *Fo* на первом уровне защиты могут быть сигнальный каскад MAP-киназ, а также оксидативный стресс (см. рис. 3). Было показано (Tintor et al., 2020), что стабильная экспрессия гена эффектора *Foa2* гриба *Fo5176*, заражающего *A. thaliana*, в клетках этого растения блокирует накопление ROS и аккумуляцию фосфорилированных MAP-киназ в ответ на стимуляцию PAMP – хитина и flg22.

У *Fo* оксид азота (NO) является ключевой сигнальной молекулой, участвующей во взаимодействии гриба с растением-хозяином (Terrón-Camero et al., 2023) (см. рис. 3). Раса *Fo f. sp. cubense* R1 специальной формы, инфицирующей банан, уничтожила торговлю бананами (*Musa acuminata*) сорта Грос Мишель, а теперь тропическая раса 4 (TR4) угрожает мировому производству его заменителя – бананам сорта Кэвендиш (Viljoen et al., 2020). При инфицировании расой TR4 у растений наблюдали уникальную индукцию генов, локализованных в митохондриях путей биосинтеза и детоксикации оксида азота (NO) (Zhang et al., 2024). Стимуляция метил-жасмонатом приводила к всплеску NO у изолятов TR4. Нокаут двух высокоиндуцируемых генов TR4, участвующих в пути биосинтеза NO, значительно снижал продукцию NO и вирулентность гриба, что указывает на то, что индукция всплеска NO непосредственно влияет на инфекционность TR4. Высказано предположение, что способность производить NO-всплеск, который одновременно обезоруживает защиту хозяина и защищает гриб от токсического воздей-

ствия окружающей среды, была приобретена расой TR4 благодаря появлению на добавочных участках хромосом, специфических для этой расы генов, которые участвуют в производстве NO и вирулентности гриба.

Белки F-RALF также являются эффекторами, которые подавляют иммунитет хозяина, защелачивая среду, окружающую корни растения (см. рис. 3). Во время инфицирования растений *Fo* вызывает повышение внеклеточного pH, что приводит к активации связанного с патогенностью сигнального каскада MAPK Fmk1, способствуя тем самым инвазивному росту гиф и вирулентности (Masachis et al., 2016). Мутанты *Fo* f. sp. *lycopersici* по гену *FOXG-21151*, кодирующему F-RALF-белок с функцией повышения pH, демонстрировали сниженную способность колонизировать растение-хозяин и вызывали значительно меньшую смертность, чем дикий тип или комплементарный штамм, а также активацию защитных реакций растений (индукцию генов защиты, аккумуляцию реактивных форм кислорода и отложение каллозы). В растении томата действие F-RALF опосредовано взаимодействием с рецептороподобной киназой FERONIA, которая тоже взаимодействует с эндогенными белками RALF растения и функционирует как негативный регулятор иммунного ответа (Stegmann et al., 2017).

Некоторые эффекторы высоко консервативны и присутствуют, по всей видимости, у всех грибов, взаимодействующих с растениями (Redkar et al., 2022a). Делеция генов таких эффекторов, названных ERC, в геноме патогенного гриба *Fo4787* томата уменьшает его вирулентность и приводит к быстрой активации генов иммунного ответа, а в геноме эндофитного штамма *Fo47* уменьшает степень колонизации корня и способность выступать в качестве биоконтролирующего агента. Эффекторы ERC участвуют также в заражении печеночника *Marchantia polymorpha* штаммом *Fo14287*.

Помимо эффекторов, у патогенных штаммов вирулентность могут определять гены вторичных метаболитов (Ito et al., 2004; Coleman et al., 2011), гены, контролирующие проникновение гриба (Liu et al., 2019), гены липидного метаболизма (He, Ding, 2020) и гены, кодирующие CAZymes (ферменты, синтезирующие и расщепляющие углеводы) (Menna et al., 2021).

Транскрипционные факторы и активность эффекторов

Транскрипционный фактор SGE1 (SIX gene expression 1) регулирует экспрессию *SIX*-генов *Fol* *in vivo* (Michielse et al., 2009) (см. рис. 3). У других специальных форм *Fo* SGE1 необходим для экспрессии *SIX* генов, а также генов, продукты которых связаны со вторичным метаболизмом (Jonkers et al., 2012; Brown et al., 2014; Zhao S. et al., 2020). Ген *SGE1* является ортологом консервативного грибного транскрипционного фактора *Wor1* из *Candida albicans* и *Histoplasma capsulatum*, который регулирует морфологический переход и связан с вирулентностью по отношению к человеку (Zhao S. et al., 2020).

В дополнение к *SGE1*, который находится в коровой части генома, группа генов, названная *FTF* (*Fusarium*

transcription factor) (см. рис. 3), обнаруживается как на основных, так и на добавочных хромосомах *Fol*. У *Fo* f. sp. *phaseoli* экспрессия *FTF1* повышается во время заражения растений фасоли и необходима для патогенности возбудителя (de Vega-Bartol et al., 2011). Нокаутирование генов *FTF* позволило предположить, что они регулируют патогенность в основном путем контроля экспрессии эффекторов (Niño-Sánchez et al., 2015). Анализ экспрессионного профиля показал, что уровни транскрипции *SGE1* и *FTF1* повышаются во время инфекционных процессов, а конститутивная экспрессия *FTF1*, *FTF2* или *SGE1* индуцирует экспрессию большого перекрывающегося набора известных эффекторных генов в *Fol*, что указывает на взаимодействие этих транскрипционных факторов (van der Does et al., 2016).

Еще один транскрипционный фактор у *Fo*, *EBR1* (Enhanced Branching 1), участвует в вирулентности, подобно своему ортологу в *F. graminearum* (Zhao C. et al., 2011; Jonkers et al., 2014). *EBR1* расположен в хромосоме 7 *Fo* f. sp. *lycopersici* и, таким образом, является частью основного генома, тогда как другие паралоги *EBR* расположены на добавочных хромосомах. Мутанты по гену *EBR1* показали замедленный рост при выращивании в культуре и сниженную вирулентность против растений томата (Niño-Sánchez et al., 2015).

Перспективные методы борьбы с фузариозной инфекцией

Разработка средств борьбы с фузариозом осложняется тем, что разные изоляты одной специальной формы могут использовать разные механизмы подавления иммунитета хозяина (Logachev et al., 2024), а также высокой скоростью эволюции дополнительной части геномов, что позволяет патогенам легко и быстро обойти разработанные защитные механизмы.

Среди современных способов борьбы с фузариозным увяданием особое внимание надо уделить биологическим методам защиты, как наиболее отвечающим экологическим запросам, а также использованию моделей прогнозирования заболеваний на основе анализа состава микробных сообществ, характерных для конкретных почв.

Микробиом почвы представляет собой одну из сложнейших систем, которая напрямую связана с развитием и здоровьем растений (Raaijmakers, Mazzola, 2016). Бактериальные и грибные сообщества обладают способностью влиять на гормональный сигналинг в растениях, тем самым манипулируя защитными механизмами (Eichmann et al., 2021), а также на продуктивность сельского хозяйства, формируя важнейшие функции экосистемы, такие как круговорот питательных веществ и устойчивость к патогенам растений (Yuan et al., 2020).

Эти свойства микробных сообществ можно применять в качестве средств борьбы с фузариозным увяданием. Так, в работе (Bubici et al., 2019) была продемонстрирована возможность контроля фузариоза в полевых условиях с эффективностью до 79 % при использовании штаммов *Pseudomonas* spp. и с эффективностью 70 % при использо-

вании нескольких эндофитов и штаммов *Trichoderma* spp. Более низкую эффективность биоконтроля (42–55 %) наблюдали при применении арбускулярных микоризных грибов, *Bacillus* spp. и непатогенных штаммов *Fusarium* (Bubici et al., 2019).

Использование штамма EGB миксобактерии *Corallococcus* sp. снизило заболеваемость огурца фузариозом на 9.6 % в условиях теплицы, а также на 66.0 и 53.9 % в полевых условиях в 2015 и 2016 гг. соответственно (Ye et al., 2020). В то же время микробиота ризосферы, сформированная в гидропонной системе с многократной параллельной минерализацией, оказалась способна контролировать динамику популяции *Fo*, но не уничтожить грибной патоген. При этом *Fo*, выживший в гидропонной системе, образовывал хламидоспоры при контакте с ризосферной микробиотой. Авторы исследования предположили, что микробиота подавляет распространение *Fo*, контролируя морфогенез патогена и создавая экосистему, позволяющую сосуществовать с *Fo* (Fujiwara et al., 2013). Максимальное снижение тяжести заболевания корневой гнилью гороха (80 %) в тепличных условиях было достигнуто синергетической тройной обработкой, состоящей из арбускулярных микоризных грибов *Trichoderma harzianum* и *Pseudomonas fluorescens* (El-Sharkawy et al., 2021).

Применение арбускулярной микоризы и *T. harzianum* на растениях томата также выявило их эффективность в смягчении фузариозного увядания на 45.14 и 44.91 % соответственно по сравнению с необработанными инфицированными растениями (Meddad-Hamza et al., 2023). *P. fluorescens* смягчает симптомы корневой гнили арахиса даже в полевых условиях и заметно ингибирует рост *Fo* (Rep et al., 2024). Исследование взаимодействия *Fo* f. sp. *lycopersici* с растениями томата показало, что производство фузаровой кислоты патогеном вызывает системные изменения в ризосферной микробиоте и непосредственно влияет на набор определенных таксонов, подавляющих болезнь (Jin et al., 2024).

На сегодняшний день наиболее известными способами ограничения риска заболевания льна фузариозным увяданием считаются создание устойчивых сортов и подходящие севообороты. Однако возникновение новых патогенных штаммов требует разработки альтернативных методов для снижения заболевания, прежде всего методов биологической защиты. Так, в работе (Planchon et al., 2021) был обнаружен штамм *Bacillus subtilis*, обладающий биоконтролирующей активностью. С помощью метода термogravиметрии авторы показали, что этот штамм, действуя сортоспецифично, способствовал укреплению клеточных стенок стебля.

Математические модели могут быть использованы для прогнозирования потенциальной возможности возникновения фузариоза путем выявления ключевых биологических индикаторов и особенностей, характерных для микробиома пораженной почвы. Например, машинное обучение позволяет классифицировать зараженные и не зараженные *Fo* образцы почв с учетом их бактериальных и грибковых сообществ (Yuan et al., 2020). Оказалось, что

микробиом здоровой почвы отличается более высокой представленностью *Streptomyces mirabilis*, *Bradyrhizobiaceae*, *Comamonadaceae*, *Mortierella* и непатогенных штаммов *Fusarium*. Метод случайного леса выявил 45 бактериальных и 40 грибных OTU, которые классифицировали состояние здоровья почвы с точностью более 80 % (Yuan et al., 2020).

Заключение

Отсутствие эффективных методов борьбы с фузариозным увяданием ставит под угрозу производство экономически важных культур, в число которых входит и лен, по всему миру. При заражении *Fo* проникает в растения непосредственно через корни с помощью инфекционных гиф, а затем колонизирует и размножается в сосудах ксилемы (Yadeta, Thomma, 2013). При этом восприятие потенциального хозяина у *Fo* начинается с направленного хемотропного роста к корням растения (Nordzieke et al., 2019), в котором задействованы как корневые экссудаты, индуцирующие прорастание хламидоспор и микрокониций *Fo* (Steinkeller et al., 2005; Turrà et al., 2015), так и секретлируемые пероксидазы растений (Turrà et al., 2015; Nordzieke et al., 2019; Sridhar et al., 2020). Многие молекулярные аспекты хемотропизма требуют дальнейшего изучения, например, с точки зрения функций и взаимодействия привлеченных на ранних стадиях рецепторов (Jiang et al., 2019).

В процессе коэволюции со своими хозяевами фитопатогены выработали молекулярные механизмы, позволяющие эффективно преодолевать иммунный ответ растений. К настоящему времени накоплен значительный материал о сигнальных каскадах, включающихся в ответ на инфекцию *Fo* (см. рис. 3). Однако наши знания о регуляции взаимодействия этого патогена с растением исчерпываются анализом транскрипционного ответа (van der Does et al., 2016), и роль ДНК метилирования и других эпигенетических механизмов в этом процессе еще только предстоит исследовать.

Недавний метаанализ транскрипционного ответа растений на инфекцию *Fo* (Cai et al., 2022) выявил гены-хабы, кодирующие ряд CAZymes, включая ксиланглюканазу и β-глюкозидазу. Необходимы дальнейшие исследования для более глубокого понимания молекулярных механизмов у *Fo* в отношении углеводного метаболизма и ферментов, которые в нем участвуют. Так, в рамках нашей работы было показано, что белки, расщепляющие углеводы, составляют значительную часть секрета изолятов *Folini* (Logachev et al., 2024).

Очевидно, что гены, кодирующие важные факторы вирулентности, регулируются более чем одним транскрипционным фактором, например, FTF1 и SGE1 совместно участвуют в регуляции генов семейства *SIX* (van der Does et al., 2016). *SIX* гены специфически экспрессируются в процессе инфекции, но как именно FTF1 и SGE1 способствуют экспрессии генов *SIX* в процессе инфекции, пока неизвестно. Таким образом, необходим геномный эпигенетический анализ и детальный анализ функциональных

механизмов для этих важных транскрипционных факторов, связанных с вирулентностью.

Вопросом, заслуживающим отдельного внимания, являются механизмы, определяющие хозяиноспецифичность различных специальных форм *Fo*. На первый взгляд может показаться, что поскольку эффекторных белков много, то контроль этого процесса должен быть полигенным. Оказалось, однако, что это не так (Li et al., 2020). Штамм Forc016 *Fo* f. sp. *radicis-cucumerinum* способен вызывать заболевание у огурца, дыни и арбуза, тогда как штамм Fom005 f. sp. *melonis* (*Fom*) может заражать только растения дыни. Forc016 был трансформирован эффекторным геном *g14035*, локализуемым на патогенной хромосоме Fom005. У трансформантов была сильно понижена или отсутствовала патогенность по отношению к огурцу и при этом сохранялась патогенность по отношению к дыне и арбузу. Это позволяет предположить, что белок, кодируемый геном *g14035*, распознается иммунным рецептором в растениях огурца.

Еще один результат, указывающий на то, что смена растения-хозяина может быть обусловлена одним геном, был получен при трансформации специальной формы, заражающей лен, геном *FoPDA1* *Fo* f. sp. *pisi*. Этот ген кодирует деметилазу, которая детоксифицирует фитоалексин пизатин у растений гороха (Coleman et al., 2011).

Эндофитные взаимодействия *Fo* с растениями встречаются гораздо чаще, чем патогенные (de Lamo, Takken, 2020; de Lamo et al., 2021; Redkar et al., 2022b), но такие взаимодействия гораздо меньше изучены на молекулярном уровне и генетическая основа, лежащая в основе эндофитного и патогенного поведения, неизвестна.

В настоящее время ни один биоконтролирующий агент не обеспечивает 100 % уровень защиты от вредоносного действия *Fo*. Такая же картина наблюдалась при селекции сортов сельскохозяйственных культур на устойчивость – 100 % устойчивость обеспечивает, как правило, комбинация генов. Совершенствование средств биологической защиты тоже, по-видимому, должно идти в направлении создания сообществ, включающих несколько бактерий/грибов, каждый из которых уменьшает вредоносный эффект *Fo*. Этот императив, однако, выводит проблему разработки биоконтролирующих агентов на новый уровень сложности, поскольку требует учета и анализа взаимодействий в сложной многокомпонентной системе, составленной из членов сообщества, растения, патогена, других ризосферных микробов и окружающей среды.

Таким образом, несмотря на значительный объем имеющихся на сегодня знаний о молекулярных механизмах взаимодействия *Fo* с растениями, остается множество требующих дальнейшего изучения вопросов.

Список литературы / References

Armitage A.D., Taylor A., Sobczyk M.K., Baxter L., Greenfield B.P.J., Bates H.J., Wilson F., Jackson A.C., Ott S., Harrison R.J., Clarkson J.P. Characterisation of pathogen-specific regions and novel effector candidates in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Sci Rep*. 2018;8(1):13530. doi 10.1038/s41598-018-30335-7
Ayukawa Y., Asai S., Gan P., Tsushima A., Ichihashi Y., Shibata A., Komatsu K., Houterman P.M., Rep M., Shirasu K., Arie T. A pair

of effectors encoded on a conditionally dispensable chromosome of *Fusarium oxysporum* suppress host-specific immunity. *Commun Biol*. 2021;4(1):707. doi 10.1038/s42003-021-02245-4
Balint-Kurti P. The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Mol Plant Pathol*. 2019;20(8):1163-1178. doi 10.1111/mpp.12821
Bates H.J., Pike J., Price R.J., Jenkins S., Connell J., Legg A., Armitage A., Harrison R.J., Clarkson J.P. Comparative genomics and transcriptomics reveal differences in effector complement and expression between races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucaae*. *Front Plant Sci*. 2024;15:1415534. doi 10.3389/fpls.2024.1415534
Benhamou N., Garand C. Cytological analysis of defense-related mechanisms induced in pea root tissues in response to colonization by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Phytopathology*. 2001;91(8):730-740. doi 10.1094/PHYTO.2001.91.8.730
Blekemolen M.C., Liu Z., Stegman M., Zipfel C., Shan L., Takken F.L.W. The PTI-suppressing Avr2 effector from *Fusarium oxysporum* suppresses mono-ubiquitination and plasma membrane disassociation of BIK1. *Mol Plant Pathol*. 2023;24(10):1273-1286. doi 10.1111/mpp.13369
Brown D.W., Busman M., Proctor R.H. *Fusarium verticillioides* SGE1 is required for full virulence and regulates expression of protein effector and secondary metabolite biosynthetic genes. *Mol Plant Microbe Interact*. 2014;27(8):809-823. doi 10.1094/MPMI-09-13-0281-R
Bubic G., Kaushal M., Prigigallo M.I., Gómez-Lama Cabanás C., Mercado-Blanco J. Biological control agents against Fusarium wilt of banana. *Front Microbiol*. 2019;10:616. doi 10.3389/fmicb.2019.00616
Cai H., Yu N., Liu Y., Wei X., Guo C. Meta-analysis of fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum* infection-related gene profiles using transcriptome datasets. *Front Microbiol*. 2022;13:970477. doi 10.3389/fmicb.2022.970477
Cao L., Blekemolen M.C., Tintor N., Cornelissen B.J.C., Takken F.L.W. The *Fusarium oxysporum* Avr2-Six5 effector pair alters plasmodesmal exclusion selectivity to facilitate cell-to-cell movement of Avr2. *Mol Plant*. 2018;11(5):691-705. doi 10.1016/j.molp.2018.02.011
Coleman J.J., Wasmann C.C., Usami T., White G.J., Temporini E.D., McCluskey K., VanEtten H.D. Characterization of the gene encoding pisatin demethylase (*FoPDA1*) in *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Microbe Interact*. 2011;24(12):1482-1491. doi 10.1094/MPMI-05-11-0119
Constantin M.E., Fokkens L., De Sain M., Takken F.L.W., Rep M. Number of candidate effector genes in accessory genomes differentiates pathogenic from endophytic *Fusarium oxysporum* strains. *Front Plant Sci*. 2021;12:761740. doi 10.3389/fpls.2021.761740
de Lamo F.J., Takken F.L.W. Biocontrol by *Fusarium oxysporum* using endophyte-mediated resistance. *Front Plant Sci*. 2020;11:37. doi 10.3389/fpls.2020.00037
de Lamo F.J., Šimkovicová M., Fresno D.H., De Groot T., Tintor N., Rep M., Takken F.L.W. Pattern-triggered immunity restricts host colonization by endophytic fusaria, but does not affect endophyte-mediated resistance. *Mol Plant Pathol*. 2021;22(2):204-215. doi 10.1111/mpp.13018
De Sain M., Rep M. The role of pathogen-secreted proteins in fungal vascular wilt diseases. *Int J Mol Sci*. 2015;16(10):23970-23993. doi 10.3390/ijms161023970
De Vega-Bartol J.J., Martín-Dominguez R., Ramos B., García-Sánchez M.-A., Díaz-Minguez J.M. New virulence groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*: the expression of the gene coding for the transcription factor *ftfl* correlates with virulence. *Phytopathology*. 2011;101(4):470-479. doi 10.1094/PHYTO-09-10-0252
Dean R., Van Kan J.A.L., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K.E., Di Pietro A., Spanu P.D., Rudd J.J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J., Foster G.D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*. 2012;13(4):414-430. doi 10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x

- Di X., Cao L., Hughes R.K., Tintor N., Banfield M.J., Takken F.L.W. Structure-function analysis of the *Fusarium oxysporum* Avr2 effector allows uncoupling of its immune-suppressing activity from recognition. *New Phytologist*. 2017;216(3):897-914. doi 10.1111/nph.14733
- Djamei A., Schipper K., Rabe F., Ghosh A., Vincon V., Kahnt J., Osorio S., ... Stierhof Y.-D., Schwarz H., Macek B., Mann M., Kahmann R. Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature*. 2011;478(7369):395-398. doi 10.1038/nature10454
- Dong S., Raffaele S., Kamoun S. The two-speed genomes of filamentous pathogens: waltz with plants. *Curr Opin Genet Dev*. 2015;35:57-65. doi 10.1016/j.gde.2015.09.001
- Edel-Hermann V., Lecomte C. Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. *Phytopathology*. 2019;109(4):512-530. doi 10.1094/PHYTO-08-18-0320-RVW
- Eichmann R., Richards L., Schäfer P. Hormones as go-betweens in plant microbiome assembly. *Plant J*. 2021;105(2):518-541. doi 10.1111/tpl.15135
- El-Sharkawy H.H.A., Abbas M.S., Soliman A.S., Ibrahim S.A., El-Nady I.A.I. Synergistic effect of growth-promoting microorganisms on bio-control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, growth, yield, physiological and anatomical characteristics of pea plants. *Pestic Biochem Physiol*. 2021;178:104939. doi 10.1016/j.pestbp.2021.104939
- Fayyaz A., Robinson G., Chang P.L., Bekele D., Yimer S., Carrasquilla-Garcia N., Negash K., Surendrarao A., Von Wettberg E.J.B., Kemal S.-A., Tesfaye K., Fikre A., Farmer A.D., Cook D.R. Hiding in plain sight: genome-wide recombination and a dynamic accessory genome drive diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2023;120(27):e2220570120. doi 10.1073/pnas.2220570120
- Flor H.H. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol*. 1971;9(1):275-296. doi 10.1146/annurev.py.09.090171.001423
- Frantzeskakis L., Kusch S., Panstruga R. The need for speed: compartmentalized genome evolution in filamentous phytopathogens. *Mol Plant Pathol*. 2019;20(1):3-7. doi 10.1111/mpp.12738
- Fu J., Wang H., Chen Y., Zhang C., Zou Y. The multifaceted ubiquitination of BIK1 during plant immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Int J Mol Sci*. 2024;25(22):12187. doi 10.3390/ijms252212187
- Fujiwara K., Iida Y., Iwai T., Aoyama C., Inukai R., Ando A., Ogawa J., Ohnishi J., Terami F., Takano M., Shinohara M. The rhizosphere microbial community in a multiple parallel mineralization system suppresses the pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *MicrobiologyOpen*. 2013;2(6):997-1009. doi 10.1002/mbo3.140
- Gargouri Jbir T., Zitnick-Anderson K., Pasche J.S., Kalil A.K. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* associated with root rot of field pea in North Dakota and the effects of temperature on aggressiveness. *Plant Dis*. 2024;108(2):365-374. doi 10.1094/PDIS-05-23-0908-RE
- Gawehns F., Houterman P.M., Ichou F.A., Michielse C.B., Hijdra M., Cornelissen B.J.C., Rep M., Takken F.L.W. The *Fusarium oxysporum* effector Six6 contributes to virulence and suppresses I-2-mediated cell death. *Mol Plant Microbe Interact*. 2014;27(4):336-348. doi 10.1094/MPMI-11-13-0330-R
- Gawehns F., Ma L., Bruning O., Houterman P.M., Boeren S., Cornelissen B.J.C., Rep M., Takken F.L.W. The effector repertoire of *Fusarium oxysporum* determines the tomato xylem proteome composition following infection. *Front Plant Sci*. 2015;6:967. doi 10.3389/fpls.2015.00967
- Gordon T.R. *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* wilt syndrome. *Annu Rev Phytopathol*. 2017;55(1):23-39. doi 10.1146/annurev-phyto-080615-095919
- Guo L., Yang L., Liang C., Wang J., Liu L., Huang J. The G-protein subunits FGA2 and FGB1 play distinct roles in development and pathogenicity in the banana fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Physiol Mol Plant Pathol*. 2016;93:29-38. doi 10.1016/j.pmp.2015.12.003
- He M., Ding N.-Z. Plant unsaturated fatty acids: multiple roles in stress response. *Front Plant Sci*. 2020;11:562785. doi 10.3389/fpls.2020.562785
- Henry P.M., Pincot D.D.A., Jenner B.N., Borrero C., Avilés M., Nam M.H., Epstein L., Knapp S.J., Gordon T.R. Horizontal chromosome transfer and independent evolution drive diversification in *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. *New Phytol*. 2021;230:327-340. doi 10.1111/nph.17141. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33616938/>
- Houterman P.M., Ma L., Van Ooijen G., De Vroomen M.J., Cornelissen B.J.C., Takken F.L.W., Rep M. The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *Plant J*. 2009;58(6):970-978. doi 10.1111/j.1365-313X.2009.03838.x
- Husaini A.M., Morimoto K., Chandrasekar B., Kelly S., Kaschani F., Palmero D., Jiang J., Kaiser M., Ahrazem O., Overkleeft H.S., Van Der Hoorn R.A.L. Multiplex fluorescent, activity-based protein profiling identifies active α -glycosidases and other hydrolases in plants. *Plant Physiol*. 2018;177(1):24-37. doi 10.1104/pp.18.00250
- Irieda H., Inoue Y., Mori M., Yamada K., Oshikawa Y., Saitoh H., Uemura A., Terauchi R., Kitakura S., Kosaka A., Singkaravanit-Ogawa S., Takano Y. Conserved fungal effector suppresses PAMP-triggered immunity by targeting plant immune kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116(2):496-505. doi 10.1073/pnas.1807297116
- Ito S., Eto T., Tanaka S., Yamauchi N., Takahara H., Ikeda T. Tomatidine and lycotetraose, hydrolysis products of α -tomatine by *Fusarium oxysporum* tomatinase, suppress induced defense responses in tomato cells. *FEBS Lett*. 2004;571(1-3):31-34. doi 10.1016/j.febslet.2004.06.053
- Jangir P., Mehra N., Sharma K., Singh N., Rani M., Kapoor R. Secreted in xylem genes: drivers of host adaptation in *Fusarium oxysporum*. *Front Plant Sci*. 2021;12:628611. doi 10.3389/fpls.2021.628611
- Jenkins S., Taylor A., Jackson A.C., Armitage A.D., Bates H.J., Mead A., Harrison R.J., Clarkson J.P. Identification and expression of *Secreted In Xylem* pathogenicity genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. *Front Microbiol*. 2021;12:593140. doi 10.3389/fmicb.2021.593140
- Jiang C., Cao S., Wang Z., Xu H., Liang J., Liu H., Wang G., Ding M., Wang Q., Gong C., Feng C., Hao C., Xu J.-R. An expanded subfamily of G-protein-coupled receptor genes in *Fusarium graminearum* required for wheat infection. *Nat Microbiol*. 2019;4(9):1582-1591. doi 10.1038/s41564-019-0468-8
- Jin X., Jia H., Ran L., Wu F., Liu J., Schlaeppi K., Dini-Andreote F., Wei Z., Zhou X. Fusaric acid mediates the assembly of disease-suppressive rhizosphere microbiota via induced shifts in plant root exudates. *Nat Commun*. 2024;15(1):5125. doi 10.1038/s41467-024-49218-9
- Jones J.D.G., Dangl J.L. The plant immune system. *Nature*. 2006;444(7117):323-329. doi 10.1038/nature05286
- Jonkers W., Dong Y., Broz K., Corby Kistler H. The Wor1-like protein Fgp1 regulates pathogenicity, toxin synthesis and reproduction in the phytopathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *PLoS Pathog*. 2012;8(5):e1002724. doi 10.1371/journal.ppat.1002724
- Jonkers W., Xayamongkhon H., Haas M., Olivain C., Van Der Does H.C., Broz K., Rep M., Alabouvette C., Steinberg C., Kistler H.C. *EBR1* genomic expansion and its role in virulence of *Fusarium* species. *Environ Microbiol*. 2014;16(7):1982-2003. doi 10.1111/1462-2920.12331
- Kanapin A., Samsonova A., Rozhmina T., Bankin M., Logachev A., Samsonova M. The genome sequence of five highly pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. *Mol Plant Microbe Interact*. 2020;33(9):1112-1115. doi 10.1094/MPMI-05-20-0130-SC
- Kistler H.C. Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*. 1997;87(4):474-479. doi 10.1094/PHYTO.1997.87.4.474
- Kommedahl Thor, Christensen J.J., Frederiksen R.A. A half century of research in Minnesota on flax wilt caused by *Fusarium oxysporum*. *Tech Bull Agric Exp Stn*. 1970;273. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19711608337>

- Kourelis J., van der Hoorn R.A.L. Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function. *Plant Cell*. 2018;30(2):285-299. doi 10.1105/tpc.17.00579
- Krzywinski M., Schein J., Birol I., Connors J., Gascoyne R., Horsman D., Jones S.J., Marra M.A. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res*. 2009;19(9):1639-1645. doi 10.1101/gr.092759.109
- Kunstler G., Falster D., Coomes D.A., Hui F., Kooyman R.M., Laughlin D.C., Poorter L., ... Zavala M.A., Zeng H., Zimmerman J.K., Zimmermann N.E., Westoby M. Plant functional traits have globally consistent effects on competition. *Nature*. 2016;529(7585):204-207. doi 10.1038/nature16476
- Li J., Fokkens L., Conneely L.J., Rep M. Partial pathogenicity chromosomes in *Fusarium oxysporum* are sufficient to cause disease and can be horizontally transferred. *Environ Microbiol*. 2020;22(12):4985-5004. doi 10.1111/1462-2920.15095
- Li J., Ai M., Hou J., Zhu P., Cui X., Yang Q. Plant-pathogen interaction with root rot of *Panax notoginseng* as a model: insight into pathogen pathogenesis, plant defence response and biological control. *Mol Plant Pathol*. 2024;25(2):e13427. doi 10.1111/mpp.13427
- Lin W., Li B., Lu D., Chen S., Zhu N., He P., Shan L. Tyrosine phosphorylation of protein kinase complex BAK1/BIK1 mediates *Arabidopsis* innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(9):3632-3637. doi 10.1073/pnas.1318817111
- Liu S., Wu B., Yang J., Bi F., Dong T., Yang Q., Hu C., ... Shao C., Chen Y., Yi G., Li C., Guo X. A cerato-platanin family protein FocCPI is essential for the penetration and virulence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. *Int J Mol Sci*. 2019;20(15):3785. doi 10.3390/ijms20153785
- Logachev A., Kanapin A., Rozhmina T., Stanin V., Bankin M., Samsonova A., Orlova E., Samsonova M. Pangenomics of flax fungal parasite *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. *Front Plant Sci*. 2024;15:1383914. doi 10.3389/fpls.2024.1383914
- López-Berges M.S., Hera C., Sulyok M., Schäfer K., Capilla J., Guarro J., Di Pietro A. The velvet complex governs mycotoxin production and virulence of *Fusarium oxysporum* on plant and mammalian hosts. *Mol Microbiol*. 2013;87(1):49-65. doi 10.1111/mmi.12082
- Ma K., Cai L., Wang R., Wang J., Zhan H., Ni H., Lu B., Zhang Y., Gao J. Complete genome sequence of a novel mitovirus isolated from the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *ginseng* causing ginseng root rot. *Arch Virol*. 2024;169(3):53. doi 10.1007/s00705-024-05962-3
- Ma L., Houterman P.M., Gawehns F., Cao L., Sillo F., Richter H., Clavijo-Ortiz M.J., Schmidt S.M., Boeren S., Vervoort J., Cornelissen B.J.C., Rep M., Takken F.L.W. The *AVR2-SLX5* gene pair is required to activate *I-2*-mediated immunity in tomato. *New Phytol*. 2015;208(2):507-518. doi 10.1111/nph.13455
- Ma L.-J., Van Der Does H.C., Borkovich K.A., Coleman J.J., Daboussi M.-J., Di Pietro A., Dufresne M., ... Zhou S., Galagan J., Cuomo C.A., Kistler H.C., Rep M. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*. 2010;464(7287):367-373. doi 10.1038/nature08850
- Martínez-Rocha A.L., Roncero M.I.G., López-Ramírez A., Mariné M., Guarro J., Martínez-Cadena G., Di Pietro A. Rho1 has distinct functions in morphogenesis, cell wall biosynthesis and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Cell Microbiol*. 2008;10(6):1339-1351. doi 10.1111/j.1462-5822.2008.01130.x
- Masachis S., Segorbe D., Turrà D., Leon-Ruiz M., Fürst U., El Ghali M., Leonard G., López-Berges M.S., Richards T.A., Felix G., Di Pietro A. A fungal pathogen secretes plant alkalizing peptides to increase infection. *Nat Microbiol*. 2016;1(6):16043. doi 10.1038/nmicrobiol.2016.43
- Meddad-Hamza A., Benzina F., Meddad C., Hamza N., Reghmit A., Ziane H., Ksentini H. Biological control of arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum* and *Verticillium dahliae* induced wilt in tomato plants. *Egypt J Biol Pest Control*. 2023;33(1):91. doi 10.1186/s41938-023-00737-5
- Menna A., Dora S., Sancho-Andrés G., Kashyap A., Meena M.K., Sklodowski K., Gasperini D., Coll N.S., Sánchez-Rodríguez C. A primary cell wall cellulose-dependent defense mechanism against vascular pathogens revealed by time-resolved dual transcriptomics. *BMC Biol*. 2021;19(1):161. doi 10.1186/s12915-021-01100-6
- Mes J.J., Van Doorn A.A., Wijbrandi J., Simons G., Cornelissen B.J.C., Haring M.A. Expression of the *Fusarium* resistance gene *I-2* co-localizes with the site of fungal containment. *Plant J*. 2000;23(2):183-193. doi 10.1046/j.1365-313x.2000.00765.x
- Michiels C.B., Van Wijk R., Reijnen L., Manders E.M.M., Boas S., Olivain C., Alabouvette C., Rep M. The nuclear protein Sge1 of *Fusarium oxysporum* is required for parasitic growth. *PLoS Pathog*. 2009;5(10):e1000637. doi 10.1371/journal.ppat.1000637
- Navarrete F., Gallei M., Kornienko A.E., Saado I., Khan M., Chia K.-S., Darino M.A., Bindics J., Djamei A. TOPLESS promotes plant immunity by repressing auxin signaling and is targeted by the fungal effector Naked1. *Plant Commun*. 2022;3(2):100269. doi 10.1016/j.xplc.2021.100269
- Ngou B.P.M., Ahn H.-K., Ding P., Jones J.D.G. Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature*. 2021;592(7852):110-115. doi 10.1038/s41586-021-03315-7
- Nguyen Q.-M., Iswanto A.B.B., Son G.H., Kim S.H. Recent advances in effector-triggered immunity in plants: new pieces in the puzzle create a different paradigm. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9):4709. doi 10.3390/ijms22094709
- Niño-Sánchez J., Tello V., Casado-Del Castillo V., Thon M.R., Benito E.P., Díaz-Minguez J.M. Gene expression patterns and dynamics of the colonization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by highly virulent and weakly virulent strains of *Fusarium oxysporum*. *Front Microbiol*. 2015;6:234. doi 10.3389/fmicb.2015.00234
- Nordzickie D.E., Fernandes T.R., El Ghalid M., Turrà D., Di Pietro A. NADPH oxidase regulates chemotrophic growth of the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* towards the host plant. *New Phytol*. 2019;224(4):1600-1612. doi 10.1111/nph.16085
- O'Donnell K., Kistler H.C., Cigelnik E., Ploetz R.C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(5):2044-2049. doi 10.1073/pnas.95.5.2044
- Pérez-Nadales E., Di Pietro A. The membrane mucin Msb2 regulates invasive growth and plant infection in *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell*. 2011;23(3):1171-1185. doi 10.1105/tpc.110.075093
- Planchon A., Durambur G., Besnier J.-B., Plasson C., Gügi B., Bernard S., Mériaux A., Trouvé J.-P., Dubois C., Laval K., Driouich A., Mollet J.-C., Gattin R. Effect of a *Bacillus subtilis* strain on flax protection against *Fusarium oxysporum* and its impact on the root and stem cell walls. *Plant Cell Environ*. 2021;44(1):304-322. doi 10.1111/pce.13882
- Plett J.M., Daguerre Y., Wittulsky S., Vayssières A., Deveau A., Melton S.J., Kohler A., Morrell-Falvey J.L., Brun A., Veneault-Fourrey C., Martin F. Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus* JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(22):8299-8304. doi 10.1073/pnas.1322671111
- Raaijmakers J.M., Mazzola M. ECOLOGY. Soil immune responses. *Science*. 2016;352(6292):1392-1393. doi 10.1126/science.aaf3252
- Redkar A., Sabale M., Schudoma C., Zechmann B., Gupta Y.K., López-Berges M.S., Venturini G., Gimenez-Ibanez S., Turrà D., Solano R., Di Pietro A. Conserved secreted effectors contribute to endophytic growth and multihost plant compatibility in a vascular wilt fungus. *Plant Cell*. 2022a;34(9):3214-3232. doi 10.1093/plcell/koac174
- Redkar A., Sabale M., Zuccaro A., Di Pietro A. Determinants of endophytic and pathogenic lifestyle in root colonizing fungi. *Curr Opin Plant Biol*. 2022b;67:102226. doi 10.1016/j.pbi.2022.102226
- Ren J., Cao T., Zang X., Liu J., Yang D. Antifungal mechanisms and characteristics of *Pseudomonas fluorescens*: promoting peanut growth and combating *Fusarium oxysporum*-induced root rot. *Plant Physiol Biochem*. 2024;216:109092. doi 10.1016/j.plaphy.2024.109092

- Rep M., Dekker H.L., Vossen J.H., De Boer A.D., Houterman P.M., Speijer D., Back J.W., De Koster C.G., Cornelissen B.J.C. Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato. *Plant Physiol.* 2002;130(2):904-917. doi 10.1104/pp.007427
- Rep M., Van Der Does H.C., Meijer M., Van Wijk R., Houterman P.M., Dekker H.L., De Koster C.G., Cornelissen B.J.C. A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Mol Microbiol.* 2004;53(5):1373-1383. doi 10.1111/j.1365-2958.2004.04177.x
- Rozhmina T., Samsonova A., Kanapin A., Samsonova M. An account of Fusarium wilt resistance in flax *Linum usitatissimum*: the disease severity data. *Data Brief.* 2022;41:107869. doi 10.1016/j.dib.2022.107869
- Samsonova A., Kanapin A., Bankin M., Logachev A., Gretsova M., Rozhmina T., Samsonova M. A genomic blueprint of flax fungal parasite *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5):2665. doi 10.3390/ijms22052665
- Seo S., Pokhrel A., Coleman J.J. The genome sequence of five genotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*: a resource for studies on Fusarium wilt of cotton. *Mol Plant Microbe Interact.* 2020;33(2):138-140. doi 10.1094/MPMI-07-19-0197-A
- Sridhar P.S., Trofimova D., Subramaniam R., González-Peña Fundora D., Foroud N.A., Allingham J.S., Loewen M.C. Ste2 receptor-mediated chemotropism of *Fusarium graminearum* contributes to its pathogenicity against wheat. *Sci Rep.* 2020;10(1):10770. doi 10.1038/s41598-020-67597-z
- Stegmann M., Monaghan J., Smakowska-Luzan E., Rovenich H., Lehner A., Holton N., Belkhadir Y., Zipfel C. The receptor kinase FER is a RALF-regulated scaffold controlling plant immune signaling. *Science.* 2017;355(6322):287-289. doi 10.1126/science.aal2541
- Steinkellner S., Mammerler R., Vierheilig H. Microconidia germination of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* in the presence of root exudates. *J Plant Interact.* 2005;1(1):23-30. doi 10.1080/17429140500134334
- Sun X., Fang X., Wang D., Jones D.A., Ma L. Transcriptome analysis of Fusarium-tomato interaction based on an updated genome annotation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* identifies novel effector candidates that suppress or induce cell death in *Nicotiana benthamiana*. *J Fungi (Basel).* 2022;8(7):672. doi 10.3390/jof8070672
- Tanaka S., Brefort T., Neidig N., Djamei A., Kahnt J., Vermerris W., Koenig S., Feussner K., Feussner I., Kahmann R. A secreted *Ustilago maydis* effector promotes virulence by targeting anthocyanin biosynthesis in maize. *eLife.* 2014;3:e01355. doi 10.7554/eLife.01355
- Terrón-Camero L.C., Molina-Moya E., Peláez-Vico M.Á., Sandoval L.M., Romero-Puertas M.C. Nitric oxide and globin G1b1 regulate *Fusarium oxysporum* infection of *Arabidopsis thaliana*. *Antioxidants.* 2023;12(7):1321. doi 10.3390/antiox12071321
- Tintor N., Paauw M., Rep M., Takken F.L.W. The root-invading pathogen *Fusarium oxysporum* targets pattern-triggered immunity using both cytoplasmic and apoplastic effectors. *New Phytol.* 2020;227(5):1479-1492. doi 10.1111/nph.16618
- Torres D.E., Oggenfuss U., Croll D., Seidl M.F. Genome evolution in fungal plant pathogens: looking beyond the two-speed genome model. *Fungal Biol Rev.* 2020;34(3):136-143. doi 10.1016/j.fbr.2020.07.001
- Tsuda K., Katagiri F. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol.* 2010;13(4):459-465. doi 10.1016/j.pbi.2010.04.006
- Turrà D., El Ghalid M., Rossi F., Di Pietro A. Fungal pathogen uses sex pheromone receptor for chemotropic sensing of host plant signals. *Nature.* 2015;527(7579):521-524. doi 10.1038/nature15516
- Validov S.Z., Kamilova F.D., Lugtenberg B.J.J. Monitoring of pathogenic and non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strains during tomato plant infection. *Microb Biotechnol.* 2011;4(1):82-88. doi 10.1111/j.1751-7915.2010.00214.x
- van Dam P., Fokkens L., Ayukawa Y., van der Gragt M., Ter Horst A., Brankovics B., Houterman P.M., Arie T., Rep M. A mobile pathogenicity chromosome in *Fusarium oxysporum* for infection of multiple cucurbit species. *Sci Rep.* 2017;7(1):9042. doi 10.1038/s41598-017-07995-y
- van der Does H.C., Fokkens L., Yang A., Schmidt S.M., Langereis L., Lukasiewicz J.M., Hughes T.R., Rep M. Transcription factors encoded on core and accessory chromosomes of *Fusarium oxysporum* induce expression of effector genes. *PLoS Genet.* 2016;12(11):e1006401. doi 10.1371/journal.pgen.1006401
- van der Does H.C., Constantin M.E., Houterman P.M., Takken F.L.W., Cornelissen B.J.C., Haring M.A., van den Burg H.A., Rep M. *Fusarium oxysporum* colonizes the stem of resistant tomato plants, the extent varying with the R-gene present. *Eur J Plant Pathol.* 2019;154(1):55-65. doi 10.1007/s10658-018-1596-3
- Viljoen A., Mostert D., Chiconela T., Beukes I., Fraser C., Dwyer J., Murray H., ... Rose L.J., Beed F., Dusunceli F., Chao C.-P., Molina A. Occurrence and spread of the banana fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* TR4 in Mozambique. *S Afr J Sci.* 2020;116(11/12). doi 10.17159/sajs.2020/8608
- Vlaardingerbroek I., Beerens B., Rose L., Fokkens L., Cornelissen B.J.C., Rep M. Exchange of core chromosomes and horizontal transfer of lineage-specific chromosomes in *Fusarium oxysporum*. *Environ Microbiol.* 2016;18(11):3702-3713. doi 10.1111/1462-2920.13281
- Wang B., Yu H., Jia Y., Dong Q., Steinberg C., Alabouvette C., Edel-Hermann V., Kistler H.C., Ye K., Ma L.-J., Guo L. Chromosome-scale genome assembly of *Fusarium oxysporum* strain Fo47, a fungal endophyte and biocontrol agent. *Mol Plant Microbe Interact.* 2020;33(9):1108-1111. doi 10.1094/MPMI-05-20-0116-A
- Wang Y., Liu X., Yuan B., Chen X., Zhao H., Ali Q., Zheng M., ... Xu J., Shi J., Wu H., Gao X., Gu Q. *Fusarium graminearum* rapid alkalization factor peptide negatively regulates plant immunity and cell growth via the FERONIA receptor kinase. *Plant Biotechnol J.* 2024;22(7):1800-1811. doi 10.1111/pbi.14303
- Weßling R., Epple P., Altmann S., He Y., Yang L., Henz S.R., McDonald N., ... Weigel D., Schulze-Lefert P., Dangel J.L., Panstruga R., Braun P. Convergent targeting of a common host protein-network by pathogen effectors from three kingdoms of life. *Cell Host Microbe.* 2014;16(3):364-375. doi 10.1016/j.chom.2014.08.004
- Widinugraheni S., Niño-Sánchez J., van der Does H.C., van Dam P., García-Bastidas F.A., Subandiyah S., Meijer H.J.G., Kistler H.C., Kema G.H.J., Rep M. A *SIX1* homolog in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 contributes to virulence towards Cavendish banana. *PLoS One.* 2018;13(10):e0205896. doi 10.1371/journal.pone.0205896
- Williams A.H., Sharma M., Thatcher L.F., Azam S., Hane J.K., Sperschneider J., Kidd B.N., ... Saxena R., Pande S., Ma L.-J., Varshney R.K., Singh K.B. Comparative genomics and prediction of conditionally dispensable sequences in legume-infecting *Fusarium oxysporum* formae speciales facilitates identification of candidate effectors. *BMC Genomics.* 2016;17(1):191. doi 10.1186/s12864-016-2486-8
- Yadeta K.A., Thomma B.P.H.J. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Front Plant Sci.* 2013;4:97. doi 10.3389/fpls.2013.00097
- Ye X., Li Z., Luo X., Wang W., Li Y., Li R., Zhang B., ... Wang H., Huang Y., Cao H., Cui Z., Zhang R. A predatory myxobacterium controls cucumber Fusarium wilt by regulating the soil microbial community. *Microbiome.* 2020;8(1):49. doi 10.1186/s40168-020-00824-x
- Yuan J., Wen T., Zhang H., Zhao M., Penton C.R., Thomashow L.S., Shen Q. Predicting disease occurrence with high accuracy based on soil macroecological patterns of Fusarium wilt. *ISME J.* 2020;14(12):2936-2950. doi 10.1038/s41396-020-0720-5
- Yun S.-H., Arie T., Kaneko I., Yoder O.C., Turgeon B.G. Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic, and asexual *Gibberella/Fusarium* species. *Fungal Genet Biol.* 2000;31(1):7-20. doi 10.1006/fgbi.2000.1226

- Zhang Y., Ma L.-J. Deciphering pathogenicity of *Fusarium oxysporum* from a phylogenomics perspective. In: Townsend J.P., Wang Z. (Eds) *Advances in Genetics*. Vol. 100. Academic Press, 2017;179-209. doi [10.1016/bs.adgen.2017.09.010](https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2017.09.010)
- Zhang Y., Yang H., Turra D., Zhou S., Ayhan D.H., Delulio G.A., Guo L., ... Pearlman E., Schwartz D.C., Di Pietro A., Kistler H.C., Ma L.-J. The genome of opportunistic fungal pathogen *Fusarium oxysporum* carries a unique set of lineage-specific chromosomes. *Commun Biol*. 2020;3(1):50. doi [10.1038/s42003-020-0770-2](https://doi.org/10.1038/s42003-020-0770-2)
- Zhang Y., Liu S., Mostert D., Yu H., Zhuo M., Li G., Zuo C., ... Grigoriev I.V., Yi G., Viljoen A., Li C., Ma L.-J. Virulence of banana wilt-causing fungal pathogen *Fusarium oxysporum* tropical race 4 is mediated by nitric oxide biosynthesis and accessory genes. *Nat Microbiol*. 2024;9(9):2232-2243. doi [10.1038/s41564-024-01779-7](https://doi.org/10.1038/s41564-024-01779-7)
- Zhao C., Waalwijk C., de Wit P.J.G.M., van der Lee T., Tang D. EBR1, a novel Zn₂Cys₆ transcription factor, affects virulence and apical dominance of the hyphal tip in *Fusarium graminearum*. *Mol Plant Microbe Interact*. 2011;24(12):1407-1418. doi [10.1094/MPMI-06-11-0158](https://doi.org/10.1094/MPMI-06-11-0158)
- Zhao S., An B., Guo Y., Hou X., Luo H., He C., Wang Q. Label free proteomics and systematic analysis of secretome reveals effector candidates regulated by SGE1 and FTF1 in the plant pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. *BMC Genomics*. 2020;21(1):275. doi [10.1186/s12864-020-6695-9](https://doi.org/10.1186/s12864-020-6695-9)
- Zhou F., Emonet A., Dénervaud Tendon V., Marhavy P., Wu D., Lahaye T., Geldner N. Co-occurrence of damage and microbial patterns controls localized immune responses in roots. *Cell*. 2020;180(3):440-453.e18. doi [10.1016/j.cell.2020.01.013](https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.013)

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.


Поступила в редакцию 11.04.2025. После доработки 24.05.2025. Принята к публикации 17.06.2025.

doi 10.18699/vjgb-26-63

Использование геномных методов скрининга в создании селекционного материала риса с высоким качеством зерна

Н.Г. Туманьян  , Ж.М. Мухина 

Федеральный научный центр риса Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, пос. Белозерный, Краснодар, Россия

 tngerag@yandex.ru; agroplazma@gmail.com

Аннотация. Рис как ключевая модель в изучении геномики агроэкосистем находится в центре внимания исследований по решению задач производства достаточного количества продуктов для растущего населения Земли. Качество зерна возделываемых сортов риса лежит в основе его конкурентоспособности и культуры потребления. На основе анализа отечественных и зарубежных исследований представлены сведения о молекулярно-генетических методах и достижениях в создании новых ценных генотипов риса при использовании данных секвенирования геномов. Непрерывное обогащение генплазмы риса в мировых селекционных центрах происходит благодаря высокоэффективным подходам с применением постгеномных и клеточных технологий в сочетании с традиционными методами фенотипирования. В обзоре рассматриваются достижения молекулярно-генетических исследований риса, относящихся к ценным признакам качества зерна – его стекловидности (мучнистости) и форме (размерам). В программах по маркер-ориентированной и геномной селекции риса широко используется анализ GWAS. В последние годы генотипирование методом GBS стало широко применяться для выявления взаимосвязи между фенотипом и генотипом на основе анализа двуродительских картирующих популяций и выборок сортообразцов. Постгеномный период исследований, связанный с поиском генов-кандидатов ценных признаков качества, начался после получения референсных последовательностей геномов. В результате были обнаружены сотни QTL признака мучнистости по 12 хромосомам, немногие из них были картированы или секвенированы. К 2018 г. секвенировано и охарактеризовано несколько основных QTL, влияющих на размер зерна. Наличие рецессивного аллеля *GS3* и доминантного аллеля *GW7^{TFA}* увеличивает соотношение длины зерна к ширине. В 2023 г. было показано, что сверхэкспрессия *OsFIF3* ингибирует экспрессию *FLO2* и *SUT1*, тем самым увеличивает мучнистость зерна и снижает его размеры. Селекционный прорыв связывают с использованием неспецифических маркеров признаков длины, ширины, толщины, отношения длины зерновки к ширине, *GS3RGS1* и *RM505* в качестве маркеров выбора. Все исследования представляют собой непрерывный процесс с целью выхода на максимально возможный уровень реализации высоких параметров качества продукции из риса.

Ключевые слова: рис; селекция; генотипирование; секвенирование; маркер; качество риса; стекловидность зерна; форма зерна


Для цитирования: Туманьян Н.Г., Мухина Ж.М. Использование геномных методов скрининга в создании селекционного материала риса с высоким качеством зерна. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(4): 625-635. doi 10.18699/vjgb-26-63

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда и Кубанского научного фонда, грант № 25-16-20103, <https://rscf.ru/project/25-16-20103/>.

Using genomic screening methods to create high-quality rice breeding material

N.G. Tumanyan  , Zh.M. Mukhina 

Federal Rice Research Centre of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation, Belozerny, Krasnodar, Russia

 tngerag@yandex.ru; agroplazma@gmail.com

Abstract. Rice, as a key model in the study of agroecosystem genomics, is the focus of research meant to address the challenges of producing sufficient food for the growing global population. In breeding programs developing new varieties, improving the physicochemical properties of the grain is crucial. Based on the analysis of national and international research, this article presents information on new molecular genetic methodologies and advances in the development of new valuable rice genotypes using genome sequencing data. Continuous enrichment of rice germplasm at global breeding centers is achieved through the use of highly effective approaches employing postgenomic and cellular technologies in combination with traditional phenotyping methods. This review examines the achievements of molecular genetic research in rice, focusing on valuable grain quality traits such as vitreousness (chalkiness) and shape

(size). GWAS analysis is widely used in marker-assisted and genomic rice breeding programs. More recently, GBS analysis has been used to identify relationships between phenotype and genotype based on the analysis of bi-parental mapping populations and varietal accessions. The post-genomic research period, focused on the search for candidate genes for valuable quality traits, had started after the genomic reference sequences were obtained. As a result, hundreds of QTLs for the chalkiness trait were discovered across 12 chromosomes, few were accurately mapped or sequenced. By 2018, several major QTLs affecting grain size were sequenced and characterized. For example, the presence of the recessive *GS3* allele and the dominant *GW7^{TFA}* allele increases the grain length-to-width ratio. In 2023, it was shown that overexpression of *OsFIF3* inhibits the expression of *FLO2* and *SUT1*, thereby increasing chalkiness and reducing grain size. This breeding breakthrough is attributed, for example, to the use of non-digital markers for length, width, thickness, and the grain length-to-width ratio, *GS3RGS1* and *RM505*, as selection markers. All research is an ongoing process aimed at achieving the highest possible level of high-quality rice products.

Key words: rice; selection; genotyping; sequencing; marker; rice quality; vitreousness; grain shape

For citation: Tumanyan N.G., Mukhina Zh.M. Using genomic screening methods to create high-quality rice breeding material. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(4):625-635. doi 10.18699/vjgb-26-63

Введение

В России ценная крупяная культура рис занимает в последние годы первое-второе место по потреблению среди круп и используется как в традиционном, так и в диетическом питании. С одной стороны, рис – основная культура для половины населения планеты, с другой – ключевая модель в изучении геномики агроэкосистем, в связи с чем находится в центре внимания исследований в рамках решения задач производства достаточного количества продуктов для растущего населения Земли (Wing et al., 2018). До настоящего времени место происхождения риса однозначно не установлено: были обнаружены очаги этой культуры в Корее, Индии, Китае.

Мировое потребление рисопродуктов составляет около 500 млн т в год, от 0.01–0.9 кг/чел. в Ливане и Латвии до 230–280 кг/чел. во Вьетнаме и Мьянме в год соответственно. Около 90 % риса производится в странах с традиционным его потреблением – Восточной и Юго-Восточной Азии.

Потребление риса в России составляет около 670 тыс. т в год. Российское рисоводство, являясь значимой частью в производстве отечественных сельхозкультур (восемь регионов занимается производством риса), обеспечивает продовольственную безопасность страны в отношении риса.

Экономическая ценность риса определяется рентабельностью производства сырья (зерна риса) и рисопродуктов. Среди факторов, ее определяющих, большое значение имеют физико-химические признаки зерна, в том числе формирующие пищевые и кулинарные достоинства (ECQ). В связи с этим качество зерна возделываемых сортов риса находится в основе культуры потребления и его конкурентоспособности.

Параметры качества риса, востребованные в производстве и потреблении, выступают главными ориентирами в селекционных программах создания новых сортов. Качество риса – сложнейший интегральный показатель, обусловленный множеством физических свойств зерна (Алешин Е.П., Алешин Н.Е., 1997). Безусловные требования, которым должны соответствовать перспективные сорта риса, – это высокие показатели и соответствие стандартам производства и потребительскому спросу боль-

шого количества морфологических, физико-химических и биохимических признаков, относящихся к понятию «качество риса», которые, как правило, являются предметом фундаментальных, прикладных и междисциплинарных исследований (Han et al., 2004; Koutroubas et al., 2004; Addison et al., 2015; Odoom et al., 2021).

Набор физико-химических признаков качества зерна составляют самые разнообразные параметры – объекты оценки в научных селекционных программах и производственных процессах: влажность, калорийность зерна, его стекловидность, плотность, твердость, прочность, трещиноватость зерна, общий выход крупы, содержание целого ядра в крупе, пленчатость, насыпная плотность и др. В группу морфологических признаков входят: «размеры» (длина, ширина, толщина), «форма» (отношение длины зерновки к ширине), «масса», «остистость», «опушенность», «ребристость зерновки» и др.

Успехи зарубежной селекции сельскохозяйственных растений в значительной степени определяются современными биотехнологиями, широко применяемыми в селекционных программах, такими как полногеномное секвенирование, секвенирование участков генома растений в рамках широкомасштабного генотипирования, таргетное генотипирование, гаплоидные технологии и др.

Качество зерна риса.

Стекловидность, размеры и форма зерна

С ростом уровня жизни населения улучшение качества риса становится все более важным. Общеизвестно, что во всем мире достижения в улучшении качества отстают от урожайности. Качество риса обусловлено множеством физических свойств зерна. Внешний вид зерна и его технологические параметры априори определяются его основными физическими свойствами (стекловидность–мучнистость, форма–размеры зерна и др.) – основными факторами рыночной стоимости риса.

Стекловидность риса определяют как содержание стекловидных зерен в зерновой массе, выраженное в процентах (см. рисунок). Мучнистость риса – крайне нежелательный признак качества зерна, формирующийся в процессе его налива. Она влияет не только на внешний вид зерна, но и на физические и химические свойства, качество



Короткозерный стекловидный рис



Короткозерный мучнистый рис



Среднезерный рис



Длиннозерный рис

Виды риса по стекловидности зерна и форме зерновки.

шлифования, а также кулинарии (Peng et al., 2014). Из-за неупорядоченной структуры гранул крахмала, воздушных пространств мучнистые зерна легко ломаются при шелушении и шлифовании, что снижает выход качественных рисопродуктов. Мучнистость, включая белые сердцевину, брюшко и спинку, относится к непрозрачной части эндосперма риса, вызванной рыхлыми гранулами крахмала, которая может зависеть как от потенциальных возможностей сорта, так и от его реакции на природные и антропогенные факторы (Guo et al., 2011; Peng et al., 2014; Du et al., 2023; Gong et al., 2023).

В оценке размеров зерна определяют длину зерновки, ее ширину и толщину в мм; форму зерна как отношение длины зерновки к ширине. Размеры зерна, которые относятся к морфологическим признакам, являются одним из ключевых агрономических признаков, связанных с урожайностью и его качеством. Мелкозерный рис может иметь длину зерновки до 5 мм, длиннозерный – более 6.5 мм. В отечественной селекции сорта риса относят к короткозерным (отношение длины зерновки к ширине, l/b , до 2.0 включительно), среднезерным (l/b до 3.0), длиннозерным (l/b выше 3.0).

Высокостекловидный рис ценится выше, чем рис, у которого преобладают мучнистые зерна. Однако существуют сорта, которые используют при приготовлении традиционных итальянских и испанских блюд, ризотто и паэльи, характеризующихся практически полным отсутствием стекловидных зерен.

В настоящем обзоре поставлена цель – представить мировые достижения геномной селекции риса в части качества риса, которые внесли существенный вклад в создание новых востребованных генотипов культурного риса (см. рисунок).

Биотехнологические методы обогащения генплазмы сельскохозяйственных культур

Непрерывное обогащение генплазмы риса в мировых селекционных центрах происходит на основе использования высокоэффективных подходов с применением постгеном-

ных и клеточных технологий в сочетании с традиционными методами фенотипирования, что обеспечивает ускорение селекционного процесса, высокую информативность характеристик – признаков интереса и приводит к максимальному положительному результату в современных реалиях научного селекционного процесса (Addison et al., 2015; Гаркуша и др., 2022).

Геномный подход за рубежом в практических селекционных схемах сельскохозяйственных растений очень популярен, и высокая затратность не останавливает его использование в связи с его эффективностью. При создании современных гибридов подсолнечника его применяет французская компания “Limagrain”; селекционных форм сорговых культур (зерновое, сахарное сорго, сорго-суданковые гибриды) – «Евралис Семанс», подсолнечника, кукурузы, овощных культур и др. – «Сингента». Использование геномных методов скрининга и создания селекционного материала уже в рутинном режиме во многом определяет селекционные успехи компаний.

В настоящее время будущее в селекции культурных растений связано с новейшими разработками в области технологий секвенирования и сборки геномов культурных растений (Дмитриев и др., 2022). Разработка методов молекулярной биологии рестриционного анализа, ПЦР-амплификации ДНК и затем определения нуклеотидной последовательности секвенированием ДНК уже на начальных этапах привела к использованию участков ДНК (нуклеотидных последовательностей), сцепленных с генами интереса или находящихся в их структуре (которые определяют какие-либо признаки качества сельскохозяйственной культуры), в качестве новой группы молекулярно-генетических маркеров.

Применение технологий секвенирования геномов привело к получению основополагающих результатов: идентификации генов интереса с оценкой полиморфизма внутри вида и разработке молекулярных маркеров хозяйственно ценных признаков (в том числе признаков качества зерна), на основе которых реализуются маркер-ориентированные и геномные селекционные программы культурных растений.

В программах по маркер-ориентированной и геномной селекции широко используется метод GWAS (genome wide association studies). Появившийся позже GBS (genotyping-by sequencing – генотипирование высокопроизводительным секвенированием) используется для выявления взаимосвязи между фенотипом и генотипом на основе анализа двуродительских картирующих популяций и выборок сортообразцов. В основе метода – разработанные SNP-чипы (SNP – однонуклеотидные полиморфизмы) и методы генотипирования NGS-секвенированием (NGS – технология коротких прочтений) выборочных фракций генома. Разрешение метода GWAS может достигать до одного нуклеотида. При этом идентифицируются, валидируются и маркируются гены-кандидаты (Baxla et al., 2025). Широкомасштабное использование технологии GBS успешно применяется на сельскохозяйственных растениях, что подтверждается массой публикаций в иностранной научной литературе.

Используемая в селекции сельскохозяйственных культур геномная селекция (GS), имеющая преимущество при отборе с полигенным контролем перед маркер-ориентированной селекцией, эффективной при моногенном контроле признаков, включает этапы анализа Training population по данным фенотипирования и генотипирования, выявления корреляций между фенотипом и генотипом и отбора по генотипу среди набора «кандидатов на селекцию» (selection candidates). При этом оптимальное количество Training population, маркеров и их соотношение – залог селекционного результата. Внедрение ускоренных геномных технологий GS, NGS, SNP-опосредованной селекции (с применением маркеров и GWAS) с сопровождающим фенотипированием и биоинформатикой уже широко применяется в современной селекции и приводит к созданию и использованию в сельском хозяйстве новых генотипов культурных растений.

Развитие высокоэффективных технологий секвенирования, получение референсных последовательностей геномов растений привело к «постгеномному» периоду исследований, в рамках которого осуществляются эффективный поиск генов-кандидатов хозяйственно ценных признаков, новых маркеров и вовлечение полученных данных в геномную селекцию.

В России впервые учеными из Сколковского института науки и технологий (Сколтех) совместно с коллегами из Университета Южной Калифорнии, Федерального исследовательского центра ВИР им. Н.И. Вавилова, Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур им. В.С. Пустовойта, селекционно-семеноводческой компании «Агроплазма» осуществлено широкомасштабное генотипирование коллекции подсолнечника на платформе Illumina. Исследователи провели генетический анализ и фенотипирование 601 линии культурного подсолнечника, что позволило биоинформатическим анализом выявить генетические маркеры для контроля жирнокислотного состава масла (Goryunova et al., 2019). В рамках гранта РНФ и КНФ (22-16-20015) проведено фенотипирование образцов сегрегирующих популяций риса с

различными содержанием амилозы и окраской зерновки с целью выбора SNP кандидатных маркеров для селекции риса по признаку содержания амилозы с последующим секвенированием ДНК-библиотек на приборе Illumina MiSeq (Mukhina et al., 2024).

Большое значение для использования биотехнологий в селекционных программах имеет разработка исследователей из Новосибирска. Усилиями ученых Института цитологии и генетики СО РАН, Курчатовского геномного центра ИЦиГ СО РАН, Новосибирского государственного аграрного университета и Новосибирского национального исследовательского государственного университета разработан биоинформатический конвейер GBS-DP на основе системы управления процессами Snakemake. Программа позволяет полностью автоматизировать анализ данных GBS, включая процесс установки необходимых программных пакетов и обработку больших наборов данных (более 400 образцов) (Пронозин и др., 2023).

В Санкт-Петербургском политехническом университете Петра Великого разработана SNP-панель из набора молекулярных маркеров на основе однонуклеотидных полиморфизмов генома сои, с помощью которых идентифицируются генотипы, что позволяет оценивать геномную значимость селекционного материала сои и проводить селекцию сои по комплексу хозяйственно ценных признаков – продуктивности сорта/линии, содержания масла и белка в семенах (Самсонова и др., 2021).

Зарубежные исследования по геномному подходу в практических селекционных схемах культурных растений, в том числе для риса, представляют интерес в связи с актуальностью внедрения новейших мировых достижений в селекционный процесс создания отечественных сортов.

Рис – модельное растение для изучения и понимания аспектов геномики и феномики этой культуры. Первая культура, для которой была опубликована первая референсная последовательность генома с использованием технологий NGS (2002 г.), – это рис (*Oryza sativa*). Дальнейшее применение новейших технологий секвенирования, которые дают прочтения длиной от 20000 п. н., решило проблемы полиплоидии и высокого содержания повторов. Уже в 2010 г. появилась информация о полногеномном анализе из 1536 SNP с применением технологий Illumina для генотипирования 395 разнообразных образцов риса (*O. sativa*).

Анализ был разработан на основе подмножества SNP, выявленных с использованием технологии гибридизации Perlegen, и служил для проверки большинства обнаруженных SNP в высококачественном наборе данных MBML-intersect (Zhao K. et al., 2010). Технология применялась на таких культурах, как ячмень (Yao et al., 2018), сорта и гибриды пшеницы (Turka et al., 2021), *Brassica napus* L., *Ralstonia solanacearum*, *Papaver bracteatum* (Rahmati et al., 2024), *Vigna radiata* L. (Kumari et al., 2023), *B. napus* L. (Kim et al., 2024), лонган (тайский фрукт рода *Dimocarpus*) (Riangwong et al., 2023), *Eucommia ulmoides* (произрастает в Китае) (Liu C. et al., 2022), *Cucumis sativus* L. (Kishor et

al., 2021) и многих других, в Китае, Южной Корее, США, Индии, Иране и других странах.

Результаты работ по секвенированию и ресеквенированию геномов культурных растений позволили выявить SNP и разработать SNP-чипы, которые используются для генотипирования множества генотипов. Технологии РНК-seq, экзомное секвенирование также позволяют находить новые SNP.

В области генотипирования известны работы по высокоэффективному секвенированию риса научных коллективов из Китая (Zhu et al., 2018; Eltahawy et al., 2020; Wang Y. et al., 2020; Yuyu et al., 2020; Pan et al., 2021; Yang W. et al., 2021b; Li J. et al., 2022; Du et al., 2023; Gong et al., 2023; Jin et al., 2023; Tang et al., 2023; Wang N. et al., 2023; Wu et al., 2023; Gao J. et al., 2024; Liu J. et al., 2024; Xu et al., 2024; Yang W. et al., 2024), Индии (Naidu et al., 2017; Ngangkham et al., 2018), США (Zhao K. et al., 2010; Kumar et al., 2023), Филиппин (Cuevas et al., 2016), Вьетнама (Piao et al., 2023), Индонезии (Susiyanti et al., 2020), Израиля (Heifetz, Soller, 2015), интернациональных коллективов из Филиппин, Китая и Германии (Sreenivasulu et al., 2022), Китая, Филиппин, Франции (Qiu et al., 2015), Уругвая, США, Аргентины (Quero et al., 2018), Индии и США (Kumari et al., 2023), Египта и Китая (Ali et al., 2020) и др.

Огромное количество данных секвенирования и ресеквенирования геномов риса позволило разработать базы данных для разнообразных целей, включая карту вариаций генома (the Genome Variation Map) (Song et al., 2018), RiceVarMap (Zhao H. et al., 2015), базу данных SNP-Seek (Alexandrov et al., 2015), RPN и MBK V1 (Institute of Genetics and Developmental Biology, CAS, 2018).

На основании данных секвенирования 3010 геномов риса разработаны инструменты для поиска и визуализации пангеномов риса – Rice Pan-genome Browser (RPN, <http://cgm.sjtu.edu.cn/3kricedb/>) и Rice Functional and Genomic Breeding (RFGB, <http://www.rmbreeding.cn/Index/>), содержащие геномные последовательности, аннотации генов, данные экспрессии и PAV (presence/absence variations – присутствие/отсутствие вариаций). Было включено более 12000 генов, отсутствующих в референсном геноме риса (Sun et al., 2017; Wang H. et al., 2020).

Технология GBS успешно применена для генетической детерминации признаков «число дней до цветения», «высота растений», «продуктивность метелки» в условиях стресса засухой на двух картирующих популяциях риса, полученных от скрещивания сортов Swarna*2/Dular и IR11N121*2/Aus 196 (Yadav et al., 2019). В результате генотипирования с использованием кастомной панели маркеров сегрегирующей популяции риса F₂ сорта Nirpobare с диким африканским рисом *O. longistaminata* выявлено 8154 информативных SNP-маркеров и локализованы количественные локусы (QTL), ответственные за признак «количество метелок» на хромосомах 1, 3, 4 и 8 (Furuta et al., 2017). В целях повышения эффективности селекции с использованием маркеров развивается метод высокоточного картирования локусов (QTN), ответственных за генетическую изменчивость количественных признаков (Heifetz, Soller, 2015).

Технология геномного редактирования (впервые применена на растениях в 2013 г.) на основе системы CRISPR/Cas9 (система мультиплексного редактирования генома), позволяющей вносить точечные мутации, вставлять и удалять гены в определенные участки генома, является прорывной и масштабно используется на рисе. Технология уже применена на множестве генов-мишеней риса, что позволило улучшить селекционный материал в отношении качества зерна, получать нетрансгенные растения и быстро внедрять генетическое разнообразие в селекцию сельскохозяйственных культур.

В 2017 г. китайские исследователи сообщили о создании вектора, нацеленного на восемь агрономических генов риса, с помощью системы CRISPR/Cas9. При дальнейшей генетической трансформации и секвенировании ДНК обнаружена высокая эффективность мутаций восьми целевых генов, в том числе в последующих поколениях в гомозиготном и гетерозиготных состояниях различных фенотипов, связанных с генами редактирования. Полученные результаты демонстрируют потенциал CRISPR/Cas9 для быстрого внедрения генетического разнообразия в селекцию сельскохозяйственных культур (Shen et al., 2017).

Инактивирование соответствующих ферментов при таком виде трансформации позволило увеличить и уменьшить содержание амилозы, существенно снизить содержание ионов кадмия в зерне, привело к увеличению содержания устойчивой олеиновой кислоты в зерне, приданию аромата (Lu, Zhu, 2017; Sun et al., 2017; Хлесткина, 2019; Hua et al., 2019).

Признаки стекловидности–мучнистости зерна в молекулярной селекции риса

Внешний вид зерна напрямую связан с его свойствами – формой зерна, размерами и стекловидностью (мучнистостью) (Guo et al., 2011). За последние 20 лет зарубежными исследователями достигнут существенный прогресс в обнаружении генов QTL, определяющих важнейшие признаки, включающие внешний вид, аромат, консистенцию и питательные свойства. Маркеры, полученные на основе этих генетических открытий, стали эффективным инструментом селекции с использованием для улучшения качества риса.

Мучнистость зерна риса, вызванная рыхлыми гранулами крахмала эндосперма, снижает его качество, негативно влияя на процессы выработки рисопроductов. В многочисленных центрах по рису в Китае в последние 10 лет ключевой момент в исследованиях – изучение природы формирования мучнистого эндосперма и формы зерновки. Обнаружены сотни QTL признака мучнистости. Что касается генетической сложности и нестабильности признака мучнистости зерна риса, то до настоящего времени были точно картированы или секвенированы только несколько аллелей гена. *Chalk5* как фактор положительной регуляции, особенно экспрессирующийся в эндосперме, который был расположен на хромосоме 5, кодирующей вакуолярную пирофосфатазу, транслоцирующую H⁺, является первым секвенированным основным QTL, определяющим мучнистость зерновки. Он оказывает влияние

на транспортную систему зерновки, воздействуя на pH, дополнительно влияет на субклеточную ультраструктуру эндосперма и образование мучнистых пятен (Li Y. et al., 2014).

Кроме того, было точно картировано несколько QTL, таких как *qPGWC-7* (Zhou et al., 2009), *qPGWC-8* (Guo et al., 2011) и *qACE-9* (Gao F. et al., 2016), что полезно для секвенирования генов и функционального анализа. QTL содержания мучнистых зерен (PCG), *qPCG1*, был локализован в области размером 139 т.н. на длинном плече хромосомы 1 с использованием сегрегирующих популяций, полученных из остаточных гетерозигот кросса Xieqingzao B (XB)/Zhonghui 9308 (9308). Аллель из 9308 снижал PCG, но оказывал незначительное влияние на основные агрономические признаки, которые можно использовать для улучшения внешнего вида зерна без снижения урожайности (Zhu et al., 2018).

Зарегистрировано большое количество QTL, отвечающих за появление мучнистых пятен в зерне риса по всем 12 хромосомам, но немногие из них были точно картированы или секвенированы. В 2021 г. точно картировано два QTL, отвечающих за мучнистость в двух линиях с односегментным замещением (SSSL): 11-09 с замещенным сегментом от *O. sativa* и HP67-11 с замещенным сегментом от *O. glaberrima* (Yang W. et al., 2021a).

В отношении однонуклеотидного полиморфизма 3830 маркеров было сопоставлено с 12 группами сцепления общей длиной 2456.4 сМ со средним генетическим расстоянием 0.82 сМ. Было исследовано семь показателей качества зерна, в том числе прозрачность (стекловидность), содержание мучнистых зерен риса, относительной площади мучнистого пятна в зерне – в популяции F₂. Всего было идентифицировано 15 QTL с баллами по логарифму шансов (LOD) > 4, которые сопоставлены с хромосомами 6, 7 и 9. Эти локусы включают четыре QTL для стекловидности, четыре – для процентного содержания мучнистого риса. Из них только один совпадал с ранее опубликованными QTL, а остальные были новыми. Путем сравнения основных областей QTL в геноме риса идентифицировано несколько ключевых генов-кандидатов, которые, как сообщается, играют решающую роль в определении характеристик зерна. Данные результаты ускорят точное картирование этих QTL и пирамидирование QTL, что будет способствовать генетическому улучшению качества риса (Jin et al., 2023).

В Институте исследований риса Аньхойской академии сельскохозяйственных наук и Агрономическом колледже Аньхойского сельскохозяйственного университета (Хэфэй, Китай) выполнен полногеномный анализ ассоциаций степени мучнистости эндосперма (DEC) и содержания мучнистых зерен (PGWC) путем объединения 1.2 млн SNP с фенотипическими данными 173 образцов риса и идентифицировано 13 QTL для DEC и 9 для PGWC (Xu et al., 2024).

Учеными из Лаборатории молекулярной селекции растений провинции Гуандун, Государственной ключевой лаборатории сохранения и использования субтропических агробиоресурсов Южно-Китайского сельскохозяйствен-

ного университета и Гуандунской лаборатории современного сельского хозяйства (Гуанчжоу) было использовано шесть QTL с низкой мучнистостью для создания 17 линий пирамидирования с 2–4 QTL. Результаты показали, что мучнистость снижалась с увеличением количества QTL в линиях пирамидирования. Сделан вывод, что с применением пирамидирования QTL генотипов с низкой мучнистостью возможно выведение высококачественных сортов риса с высокой стекловидностью зерна (низкой мучнистостью) (Yang W. et al., 2024).

Ранее описанный QTL показателя мучнистости, *qWCR4*, был подтвержден в сегрегирующей популяции BC₅F₂ и картирован в области 35.26 кб (Shi et al., 2022).

Признаки размеров и формы зерна в молекулярной селекции риса

Форма зерна определяется тремя признаками, длиной, шириной и толщиной зерна, и одновременно влияет на урожайность и качество риса. Хотя в последние годы секвенировано большое количество основных генов, регулирующих форму зерна, еще предстоит открыть множество второстепенных генов.

Размер зерна является одним из ключевых агрономических признаков, связанных с урожайностью и его качеством. Показано, что локусы основных количественных признаков *GS3* и *GL3.1* играют преобладающую роль в негативной регуляции размера зерна (Yuyu et al., 2020). Уже к 2018 г. более 8500 QTL, регулирующих различные агрономически важные признаки риса, включая размер зерна, были картированы с использованием различных контрастных сегрегирующих популяций, полученных от разных родителей, в том числе секвенировано и охарактеризовано несколько основных QTL, влияющих на размер зерна и урожайность риса (Ngangkham et al., 2018).

Сопоставление ассоциаций на основе 18824 высококачественных маркеров дало 38 QTL для 10 признаков, пять из которых соответствовало известным генам или точно картированным QTL (Qiu et al., 2015; Quero et al., 2018).

Результаты, полученные к 2019 г., стали основой для изучения биоразнообразия длины зерна и молекулярной селекции различных типов зерна. Анализ вторичной популяции F₂ от скрещивания сортов риса Nipponbare и Z741 позволил идентифицировать 20 QTL для важных агрономических признаков. Показано, что длина зерна Z741 контролируется главным QTL (*qKL3*) и второстепенным QTL (*qKL7*); секвенирование гена-кандидата выявило, что *qKL3* может быть аллелем *OsPPKL1*, кодирующего протеинфосфатазу, участвующую в передаче сигнала brassinosterоидами, а *qKL7* – неучтенный QTL; подтверждено восемь QTL, *qKL3*, *qKL7*, *qRLW3-1*, *qRLW7*, *qPH3-1*, *qKWT3*, *qKWT7* и *qNPB6*, с использованием трех отобранных линий с односегментным замещением (SSSL), S1, S2 и S3; обнаружено пять QTL: *qKL6*, *qKW3*, *qKW7*, *qKW6* и *qRLW6*, в S1, S2 и S3, которые не были обнаружены в популяции F₂ Nipponbare/Z741. Вероятно, минорные QTL подвержены влиянию факторов окружающей среды, так как QTL *qNPB3*, *qNPB7* и *qPL3* не были валидированы тремя SSSL (Wang H. et al., 2020).

Изучение генетических эффектов формы зерна, содержания амилозы и других признаков качества в Лаборатории генетического улучшения сельскохозяйственных культур и биотехнологии и Ключевой лаборатории генетики и селекции риса Академии сельскохозяйственных наук Гуанси (Китай) показало, что гены *gs3*, *GW7*, *TFA*, *gw8* и *chalk5* улучшают внешний вид риса. Наличие аллелей *gs3*, *GW7* и *TFA* увеличивает соотношение длины зерновки риса к ширине; добавление аллеля *gw8* может еще больше уменьшить ширину зерна.

Полногеномные ассоциации, одновременно определяющие размер и стекловидность (мучнистость) риса

Уделяется большое внимание полногеномным ассоциативным исследованиям внешнего вида зерна (размерам, форме, мучнистости, содержанию мучнистого зерна в общей массе) (Zhao D. et al., 2022) мировой коллекции зародышевой плазмы риса, исторических селекционных популяций.

Восемь ассоциаций маркер–признак идентифицированы путем скрининга 124 генотипов с праймерами, специфичными для признаков размера зерна. Специфические маркеры признаков длины, ширины, толщины, отношения длины зерновки к ширине, *GS3RGS1* и *RM505*, потенциально могут быть использованы в качестве маркеров выбора в селекции риса (Naidu et al., 2017).

Низкая корреляция с мучнистостью была продемонстрирована при ширине зерен менее 2.0 мм с минимальными различиями между аллелями *Chalk 5* и *chalk 5* (ген, регулирующий проявление мучнистого пятна у риса) (Gao J. et al., 2024). Учеными из Сельскохозяйственной академии Гуанси показано, что *OsMKK3* кодирует киназу MAP-киназы, которая контролирует размер и мучнистость зерна, влияя на пролиферацию клеток в оболочке колосков; *OsSPL16*, *GS5* и *GIF1* оказывают существенное влияние на путь изменения размера зерна, регулируемый *OsMKK3* (Pan et al., 2021).

Разработан набор рекомбинантных инбредных линий (RIL), полученных от Gang46B (G46B) и K1075, интрогрессионной линии G46B с более низким PGWC. На основе карты сцепления, содержащей 33 маркера простого повтора последовательности (SSR), обнаружено в общей сложности 15 аддитивных QTL, определяющих шесть признаков качества, в том числе мучнистости и формы зерновки (Gao F. et al., 2016). Найден новый QTL, *qGL11*, который может быть новым, кодирующим *sucyt1*, играющим специфическую роль в регулировании длины зерен (Li J. et al., 2022).

Ученые Сельскохозяйственного университета провинции Хунань провели DAP-seq множества образцов риса и показали, что сверхэкспрессия *OsFIF3* ингибирует экспрессию *FLO2* и *SUT1*, тем самым увеличивает мучнистость зерна и снижает его размеры (Tang et al., 2023).

В 2024 г. появилось сообщение, что с использованием популяции Cypress и KY131 при обратном скрещивании построена карта генетических связей со 151 полиморф-

ным маркером и с помощью анализа QTL-картирования обнаружено 37 QTL для определения формы зерна, мучнистости и содержания амилозы. Среди них три QTL – для определения формы зерна (*qGW3*, *qGL7.2* и *qLWR7.1*) и четыре – для определения мучнистости зерна (*qWBR1.2*, *qBR2*, *qWCR3* и *qWCR11*) продемонстрировали повторяемые и обнаруживаемые генетические эффекты в популяциях разных поколений. В результате *LOC_Os03g45210* может быть геном-кандидатом для *qWCR3*.

Генетические эффекты трех QTL формы зерна – *qGL7.2*, *qLWR7.2* и *qGW3*, и трех QTL мучнистости – *qBR2*, *qWCR3* и *qWCR11*, были затем подтверждены в случайной популяции. С помощью метода анализа потомства ген *qWCR3* был точно картирован в области 100 кб на хромосоме 3. Результаты этого исследования закладывают основу для картографического секвенирования данных QTL (Liu J. et al., 2024).

Выделено два тесно связанных локуса количественных признаков (QTLs), контролирующих мучнистость и форму зерен на хромосоме 8 риса с помощью односегментных линий замещения (SSSL) (Yang W. et al., 2021b).

В области *qWCR4* гены *LOC_Os04g50060* и *LOC_Os04g50070* показали значительные различия в уровне экспрессии в эндосперме между двумя NIL, тогда как четыре других гена не экспрессировались. *qWCR4^{J23B}* (аллель *qWCR4* в гене *J23B*) повышал мучнистость, количество зерен на растении, скорость завязывания семян, ширину зерна и массу тысячи зерен, способствуя более высокой урожайности с растения. Результаты исследований закладывают основу для секвенирования *qWCR4* на базе картографических данных (Shi et al., 2022).

В 2023 г. опубликованы результаты исследований по картированию локусов количественных признаков высокого разрешения путем секвенирования для определения качественных характеристик зерна риса с особым вниманием к мучнистости. Проведен полногеномный анализ ассоциаций формы зерна риса и их мучнистости на примере образцов коллекции Сианя (Китай). В панели, состоящей из 137 маркеров, показаны значительные генетические вариации по шести признакам качества зерна. Двадцать семь QTL было идентифицировано с помощью GWAS. N. Wang с коллегами (2023) считают, что полученные результаты улучшают понимание генетической основы физических признаков массы, формы зерен и мучнистости риса, и на их основе могут быть даны рекомендации для будущей селекции с использованием маркеров с QTL или пирамидирования генов для стабилизации и улучшения качества риса.

Сто восемьдесят пять рекомбинантных инбредных линий F₁₂ (RILS), полученных в США от скрещивания сортов Cypress (толерантный к HNT) и LaGrue (чувствительный к HNT), было подвергнуто скринингу на признаки качества зерна – длины зерна, ширины и относительного содержания мучнистых зерен в условиях контроля и стресса. Всего было идентифицировано 15 QTL на 9 хромосомах, отсканированных на предмет естественной генетической изменчивости в панели разнообразия японской культуры

(JDP) для выявления генов-кандидатов для определения этих параметров. Обнаружено 6160 высокоэффективных SNP (Kumar et al., 2023).

Связанный с митохондриями белок PPR (показано на стабильном мутанте WBG1) регулирует мучнистость и размеры зерна (Wu et al., 2023).

Ген *RGAI*, кодирующий α -субъединицу рисового G-белка, играет важную роль в регуляции структуры риса, размера семян и реакции на абиотический стресс. Исследования китайских ученых показали, что ген *RGAI* участвует не только в контроле структуры риса и размера зерна, но и в регулировании качества риса и всхожести семян (Yang X. et al., 2024).

Недавно выявлено 25 количественных признаков, связанных с длиной, шириной и мучнистостью зерен при тепловом стрессе, или три набора перекрывающихся QTL, расположенных на хромосомах 3, 5 и 11, которые можно отнести к приоритетным генам-кандидатам для QTL, связанных с качеством внешнего вида зерна (размеры и мучнистость при тепловом стрессе). У мутантов *LOC_Os05g06920*, *LOC_Os05g06970* и *LOC_Os11g28104* были повышены длина зерновки и отношение длины зерна к ширине, снижена ширина, в том числе в условиях теплового стресса; у мутантов *LOC_Os05g06970* и *LOC_Os11g28104* значительно снижались стекловидность зерна и его прозрачность (Chen et al., 2025).

Таким образом, предыдущие исследования показали, что многочисленные гены, связанные с качеством зерна, влияют как на размер, так и на мучнистость риса (Yang W. et al., 2021b; Zhao D. et al., 2022; Tang et al., 2023; Yang X. et al., 2024), например *OsMKK3*, *OsSPL16*, *GS5* и *GIF1* (Pan et al., 2021); несколько генов, отвечающих за форму зерен, в том числе *gw8*, *GW7*, *lgy3* и *gs9*, могут снижать содержание крахмала и значительно улучшать внешний вид зерен риса (Liu Q. et al., 2018; Zhao D. et al., 2018).

Заключение

Полученные в мире на настоящее время результаты использования высокоэффективных биотехнологических методов углубляют понимание молекулярных механизмов, регулирующих качество зерна риса, и обеспечивают теоретическую поддержку молекулярной селекции для улучшения качества риса, в частности посредством разработки маркеров хозяйственно ценных признаков и ресурсов зародышевой плазмы для генетического улучшения культурных растений, в том числе риса, по признакам, связанным с важнейшими физическими свойствами зерна – мучнистостью–стекловидностью, формой и размерами риса.

В мировых центрах по рису обнаружены сотни QTL нежелательного признака качества зерна – мучнистости. Были точно картированы или секвенированы только несколько из них, один из которых – *Chalk5*, фактор положительной регуляции, экспрессирующийся в эндосперме, расположенный на хромосоме 5 и являющийся первым секвенированным основным QTL, определяющим мучнистость зерновки.

Кроме того, были точно картированы QTL *qPGWC-7*, *qPGWC-8*, *qACE-9*. Восемь ассоциаций маркер–признак идентифицировано путем скрининга генотипов с праймерами, специфичными для признаков размера зерна риса. Выявлены специфические маркеры признаков длины, ширины, толщины, отношения длины зерновки к ширине, *GS3RGS1* и *RM505*, которые могут быть использованы в качестве маркеров выбора в селекции. С помощью DAP-seq множества образцов риса показано, что сверхэкспрессия *OsFIF3* ингибирует экспрессию *FLO2* и *SUT1*, тем самым увеличивает мучнистость зерна и снижает его размеры. Обнаружено три QTL для определения формы зерна (*qGW3*, *qGL7.2* и *qLWR7.1*) и четыре QTL для определения мучнистости зерна (*qWBR1.2*, *qBR2*, *qWCR3* и *qWCR11*) (Liu J. et al., 2024). Показано, что многочисленные гены, связанные с качеством зерна, влияют как на размер, так и на мучнистость риса.

Таким образом, степень изученности генома риса в мире высока. Наблюдается повышенное внимание к важнейшим физическим параметрам зерна риса в исследовательских мировых центрах по рису. Исследования представляют собой непрерывный процесс с четко поставленной целью выхода на максимально возможный уровень реализации высоких параметров качества продукции из риса.

Список литературы / References

- Алешин Е.П., Алешин Н.Е. Рис. Краснодар, 1997
[Alyoshin E.P., Alyoshin N.E. Rice. Krasnodar, 1997 (in Russian)]
- Гаркуша С.В., Туманьян Н.Г., Мухина Ж.М., Папулова Э.Ю. Фенотипирование сортов «Коллекции генетических ресурсов риса, овощных и бахчевых культур» по технологическим признакам зерна в связи с разработкой селекционной технологии создания сортов риса с высоким пищевым качеством зерна. *Труды Кубанского государственного аграрного университета*. 2022;56: 59-63. doi 10.21515/1999-1703-98-59-63
- [Garkusha S.V., Tumanyan N.G., Mukhina Zh.M., Papulova E.Yu. Phenotyping of varieties of “Collections of genetic resources of rice, vegetable and melon crops” according to the technological characteristics of grain in connection with the development of breeding technology for the creation of rice varieties with high nutritional quality of grain. *Trudy Kubanskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Proceedings of the Kuban State Agrarian University*. 2022;56:59-63. doi 10.21515/1999-1703-98-59-63 (in Russian)]
- Дмитриев А.А., Пушкова Е.Н., Мельникова Н.В. Секвенирование геномов растений: современные технологии и новые возможности для селекции. *Молекулярная биология*. 2022;56(4):531-545. doi 10.31857/S0026898422040048
- [Dmitriev A.A., Pushkova E.N., Melnikova N.V. Plant genome sequencing: modern technologies and novel opportunities for breeding. *Mol Biol*. 2022;56(4):495-507. doi 10.1134/s0026893322040045]
- Прозонин А.Ю., Салина Е.А., Афонников Д.А. GBS-DP: биоинформатический конвейер для обработки данных, полученных генотипированием путем секвенирования. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(7):737-745. doi 10.18699/VJGB-23-86
- [Pronozin A.Y., Salina E.A., Afonnikov D.A. GBS-DP: a bioinformatics pipeline for processing data coming from genotyping by sequencing. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2023;27(7):737-745. doi 10.18699/VJGB-23-86]
- Самсонова М.Г., Нуждин С.В., Самсонова А.А., Канапин А.А., Аюпова А.Ф., Хайтович Ф.Е., Болдырев С.В. Маркеры для маркерной селекции сои по хозяйственно-полезным признакам. Пат. на изобретение. RU 2740798 С1. Опубликовано. 21.01.2021

- [Samsonova M.G., Nuzhdin S.V., Samsonova A.A., Kanapin A.A., Ayupova A.F., Khajtovich F.E., Boldyrev S.V. Markers for Marker Selection of Soya According to Utility Signs. *Invention patent RU 2740798 C1*. Publ. 21.01.2021 (in Russian)]
- Хлесткина Е.К. Геномное редактирование риса при использовании технологии CRISPR/Cas. *Биотехнология и селекция растений*. 2019;2(1):49-54. doi 10.30901/2658-6266-2019-1-49-54 [Khlestkina E.K. Rice Genome editing using CRISPR/Cas system. *Biotechnologiya i Seleksiya Rastenij = Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(1):49-54. doi 10.30901/2658-6266-2019-1-49-54 (in Russian)]
- Addison M., Sarfo-Mensah P., Edusah S.E. Assessing Ghana's initiative of increasing domestic rice production through the development of rice value chain. *Glob Sci Res J*. 2015;3(4):230-237
- Alexandrov N., Tai Sh., Wang W., Mansueto L., Palis K., Fuentes R. SNP-Seek database of SNPs derived from 3000 rice genomes. *Nucleic Acids Res*. 2015;63(2):D1023-D1027. doi 10.1093/nar/gku1039
- Ali N., Li D., Eltahawy M., Abdulmajid D., Bux L., Liu E., Dang X., Hong D. Mining of favorable alleles for seed reserve utilization efficiency in *Oryza sativa* by means of association mapping. *BMC Genetics*. 2020;21(1):4. doi 10.1186/s12863-020-0811-3
- Baxla B., Thiagarajan K., Swaminathan M., Bellie A., Natarajan S., Govindan S.K. Advances in two-line hybrid rice breeding: leveraging thermosensitive genetic male sterility system in rice for improved global rice production. *Euphytica*. 2025;221:101. doi 10.1007/s10681-025-03550-3
- Chen L., Chen W., Li J., Wei Y., Qing D., Huang J., Yang X., ... Deng G., Dai G., Chen C., Liang T., Pan Y. Identifying heat adaptability QTLs and candidate genes for grain appearance quality at the flowering stage in rice. *Rice*. 2025;18(1):13. doi 10.1186/s12284-025-00770-y
- Cuevas R., Pede V., McKinley J., Velarde O., Demont M. Rice grain quality and consumer preferences: a case study of two rural towns in the Philippines. *PLoS One*. 2016;11(3):e0150345. doi 10.1371/journal.pone.0150345
- Du Y., Long Ch., Deng X., Zhang Zh., Liu J., Xu Y., Xu Y., Liu D., Zeng Y. Physiological basis of high nighttime temperature-induced chalkiness formation during early grain-filling stage in rice (*Oryza sativa* L.). *Agronomy*. 2023;13(6):1475. doi 10.3390/agronomy13061475
- Eltahawy M.S., Ali N., Zaid I.U., Li D., Abdulmajid D., Bux L., Wang H., Hong D. Association analysis between constructed SNPLDBs and GCA effects of 9 quality-related traits in parents of hybrid rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Genomics*. 2020;21(1):30. doi 10.1186/s12864-019-6428-0
- Furuta T., Ashikari M., Jena K.K., Doi K., Reuscher S. Adapting genotyping-by-sequencing for rice F₂ populations. *G3: Genes Genomes, Genetics*. 2017;7(3):881-893. doi 10.1534/g3.116.038190
- Gao F., Zeng L., Qiu L., Lu X., Ren J., Wu X., Su X., Gao Y., Ren G. QTL mapping of grain appearance quality traits and grain weight using a recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). *J Integr Agric*. 2016;15(8):1693-1702. doi 10.1016/S2095-3119(15)61259-X
- Gao J., Gao L., Chen W., Huang J., Qing D., Pan Y., Ma Ch., Wu H., Zhou W., Li J., Yang X., Dai G., Deng G. Genetic effects of grain quality enhancement in Indica hybrid rice: insights for molecular design breeding. *Rice*. 2024;17:39. doi 10.1186/s12284-024-00719-7
- Gong D., Zhang X., He F., Chen Y., Li R., Yao J., Zhang M., Zheng W., Yu G. Genetic improvements in rice grain quality: a review of elite genes and their applications in molecular breeding. *Agronomy*. 2023; 13(5):1375. doi 10.3390/agronomy13051375
- Goryunova S.V., Goryunov D.V., Chernova A.I., Martynova E.U., Dmitriev A.E., Boldyrev S.V., Ayupova A.F., ... Gorlova L.A., Garkusha S.V., Mukhina Z.M., Savenko E.G., Demurin Y.N. Genetic and phenotypic diversity of the sunflower collection of the Pustovoit All-Russia Research Institute of Oil Crops (VNIIMK). *Helia*. 2019;42(70):45-60. doi 10.1515/helia-2018-0021
- Guo T., Liu X., Wan X., Weng J., Liu S., Liu X., Chen M., ... Guo X., Lei C., Wang J., Jiang L., Wan J. Identification of a stable quantitative trait locus for percentage grains with white chalkiness in rice (*Oryza sativa*). *J Integr Plant Biol*. 2011;53(8):598-607. doi 10.1111/j.1744-7909.2011.01041.x
- Han Y., Xu M., Liu X., Yan Ch., Korban S.S., Chen X., Gu M. Genes coding for starch branching enzymes are major contributors to starch viscosity characteristics in waxy rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci*. 2004;166(2):357-364. doi 10.1016/j.plantsci.2003.09.023
- Heifetz E.M., Soller M. Targeted Recombinant Progeny: a design for ultra-high resolution mapping of Quantitative Trait Loci in crosses between inbred or pure lines. *BMC Genetics*. 2015;16:76. doi 10.1186/s12863-015-0206-z
- Hua K., Zhang J., Botella J.R., Ma Ch., Kong F., Liu B., Zhu J.-K. Perspectives on the application of genome-editing technologies in crop breeding. *Mol Plant*. 2019;12(8):1047-1059. doi 10.1016/j.molp.2019.06.009
- Jin S., Xu L., Yang Q., Zhang M., Wang Sh., Wang R., Tao T., Hong L., Guo Q., Song Sh., Leng Y., Cai X., Gao J. High-resolution quantitative trait locus mapping for rice grain quality traits using genotyping by sequencing. *Front Plant Sci*. 2023;13:860664. doi 10.3389/fpls.2022.860664
- Kim W.J., Yang B., Kim D.G., Kim S.H., Lee Y.J., Kim J., Baek S.H., Kang S.Y., Ahn J.W., Choi Y.J., Bae C.H., Iwar K., Kim S.H., Ryu J. Genotyping-by-sequencing analysis reveals associations between agronomic and oil traits in gamma ray-derived mutant rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plants*. 2024;13(11):1576. doi 10.3390/plants13111576
- Kishor D., Lee H.-Y., Hemasundar A., Kim J.-G., Lee S.-Y., Kang B.-Ch., Song K., You C.-R. Identification of an allelic variant of the *CsOr* gene controlling fruit endocarp color in cucumber (*Cucumis sativus* L.) using genotyping-by-sequencing (GBS) and whole-genome sequencing. *Front Plant Sci*. 2021;12:676884. doi 10.3389/fpls.2021.676884
- Koutroubas S., Mazzini F., Pons B., Ntanos D. Grain quality variation and relationships with morphophysiological traits in rice (*Oryza sativa* L.) genetic resources in Europe. *Field Crops Res*. 2004;86: 115-130. doi 10.1016/S0378-4290(03)00117-5
- Kumar A., Thomas J., Gill N., Dwiningsih Yh., Ruiz Ch., Famoso A., Pereira A. Molecular mapping and characterization of QTLs for grain quality traits in a RIL population of US rice under high nighttime temperature stress. *Sci Rep*. 2023;13(1):4880. doi 10.1038/s41598-023-31399-w
- Kumari A., Sharma D., Sharma P., Sil S., Wang Ch., Verma V., Patil A., ... Chandel G., Grover A., Jagadish S.V.K., Katiyar-Agarwal S., Agarwal M. Meta-QTL and haplo-pheno analysis reveal superior haplotype combinations associated with low grain chalkiness under high temperature in rice. *Front Plant Sci*. 2023;14:1133115. doi 10.3389/fpls.2023.1133115
- Li J., Yang H., Xu G., Deng K., Yu J., Xiang S., Zhou K., Zhang Q., Li R., Li M., Ling Y., Yang Zh., He G., Zhao F. QTL analysis of Z414, a chromosome segment substitution line with short, wide grains, and substitution mapping of *qGL11* in rice. *Rice*. 2022;15(1):25. doi 10.1186/s12284-022-00571-7
- Li Y., Fan C., Xing Y., Yun P., Luo L., Yan B., Peng B., Xie W., Wang G., Li X., Xiao J., Xu C., He Y. *Chalk5* encodes a vacuolar H(+)-translocating pyrophosphatase influencing grain chalkiness in rice. *Nat Genet*. 2014;46:398-404. doi 10.1038/ng.2923
- Liu C., Wang L., Lu W., Zhong J., Du H., Liu P., Du Q., Du L., Qing J. Construction of SNP-based high-density genetic map using genotyping by sequencing (GBS) and QTL analysis of growth traits in *Eucommia ulmoides* oliver. *Forests*. 2022;13(9):1479. doi 10.3390/f13091479

- Liu J., Zhang H., Wang Y., Liu E., Shi H., Gao G., Zhang Q., Zhang Q., Lou G., Jiang G., He Y. QTL analysis for rice quality-related traits and fine mapping of *qWCR3*. *Int J Mol Sci*. 2024;25(8):4389. doi 10.3390/ijms25084389
- Liu Q., Han R., Wu K., Zhang J., Ye Y., Wang S., Chen J., Pan Y., Li Q., Xu X., Zhou J., Tao D., Wu Y., Fu X. G-protein β subunits determine grain size through interaction with MADS-domain transcription factors in rice. *Nat Commun*. 2018;9:852. doi 10.1038/s41467-018-03047-9
- Lu Y., Zhu J.-K. Precise editing of a target base in the rice genome using a modified CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant*. 2017;10(3):523-525. doi 10.1016/j.molp.2016.11.013
- Mukhina Zh.M., Tumanyan N.G., Garkusha S.V., Papulova E.Yu., Chukhir N.P., Chukhir I.N., Gnenniy E.Yu., Esaulova L.V., Malyuchenko E.A., Vakhrusheva N.I. Improving coloured rice grain quality through accelerated breeding. *SABRAO J Breed Genet*. 2024; 56(1):89-100. doi 10.54910/sabrao2024.56.1.8
- Naidu B.S.L., Reddy V.L.V., Naik B.J., Naik E.S. Allele mining and allelic diversity of genes governing grain size related traits in rice (*Oryza sativa* L.). *Can J Biotechnol*. 2017;1:200. doi 10.24870/cjb.2017-a186
- Ngangkham U., Samantaray S., Yadav M., Kumar A., Chidambarathan P., Katara J.L. Effect of multiple allelic combinations of genes on regulating grain size in rice. *PLoS One*. 2018;13(1):e0190684. doi 10.1371/journal.pone.0190684
- Odoom D., Kugbe J., Dzomeku I., Berdjour A., Boateng D., Yaro R., Wireko P., Sam E., Ghanney Ph. Impact of production inputs and timing on crackness of rice in Northern Ghana. *Int J Agronomy*. 2021;4:1-14. doi 10.1155/2021/9982911
- Pan Y., Chen L., Zhao Y., Guo H., Li J., Rashid M.A.R., Lu Ch., ... Qing D., Gao L., Dai G., Li D., Deng G. Natural variation in *OsMKK3* contributes to grain size and chalkiness in rice. *Front Plant Sci*. 2021;12:784037. doi 10.3389/fpls.2021.784037
- Peng B., Wang L., Fan C., Jiang G., Luo L., Li Y., He Y. Comparative mapping of chalkiness components in rice using five populations across two environments. *BMC Genet*. 2014;15:49. doi 10.1186/1471-2156-15-49
- Piao R.H., Chen M.-J., Meng F.-M., Qi C.-Y., Koh H.-J., Gao M.-M., Song A.-Q., Jin Y.-M., Yan Y.-F. Identification and characterization of the chalkiness endosperm gene *CHALK-H* in rice (*Oryza sativa* L.). *J Integr Agric*. 2023;22(10):2921-2933. doi 10.1016/j.jia.2023.04.020
- Qiu X., Pang Y., Yuan Z., Xing D., Xu J., Dingkuhn M., Li Z., Ye G. Genome-wide association study of grain appearance and milling quality in a worldwide collection of indica rice germplasm. *PLoS One*. 2015;10(12):e0145577. doi 10.1371/journal.pone.0145577
- Quero G., Gutiérrez L., Monteverde E., Blanco P., Pérez de Vida F., Rosas J., Fernández S., Garaycochea S., McCouch S., Berberian N., Simondi S., Bonnacarrè V. Genome-wide association study using historical breeding populations discovers genomic regions involved in high-quality. *Plant Genome*. 2018;11(3):170076. doi 10.3835/plantgenome2017.08.0076
- Rahmati R., Nemati Z., Naghavi M., Pfanzelt S. Phylogeography and genetic structure of *Papaver bracteatum* populations in Iran based on genotyping-by-sequencing (GBS). *Sci Rep*. 2024;14(1):16309. doi 10.1038/s41598-024-67190-8
- Riangwong K., Saensuk Ch., Pitaloka M.K., Dumhai R., Ruanjichon V., Toojinda Th., Wanchana S., Arikrit S. Genetic diversity and population structure of a longan germplasm in Thailand revealed by genotyping-by-sequencing (GBS). *Horticulturae*. 2023;9(6):726. doi 10.3390/horticulturae9060726
- Shen L., Hua Y., Fu Y., Li J., Liu Q., Jiao X., Xin G., Wang J., Wang X., Yan C., Wang K. Rapid generation of genetic diversity by multiplex CRISPR/Cas9 genome editing in rice. *Sci China Life Sci*. 2017;60: 506-515. doi 10.1007/s11427-017-9008-8
- Shi H., Zhu Y., Yun P., Lou G., Wang L., Wang Y., Gao G., Zhang Q., Li X., He Y. Fine mapping of *qWCR4*, a rice chalkiness QTL affecting yield and quality. *Agronomy*. 2022;12(3):706. doi 10.3390/agronomy12030706
- Song Sh., Tian D., Li C., Tang B., Dong L., Xiao J., Bao Y., Zhao W., He H., Zhang Zh. Genome Variation Map: a data repository of genome variations in BIG Data Center. *Nucleic Acids Res*. 2018; 4(46)(D1):944-949. doi 10.1093/nar/gkx986
- Sreenivasulu N., Zhang C., Tiozon R.N. Jr., Liu Q. Post-genomics revolution in the design of premium quality rice in a high-yielding background to meet consumer demands in the 21st century. *Plant Commun*. 2022;3(3):100271. doi 10.1016/j.xplc.2021.100271
- Sun C., Hu Z., Zheng T., Lu K., Zhao Y., Wang W., Shi J., Wang C., Lu J., Zhang D., Li Z., Wei C. RPN: rice pan-genome browser for ~3000 rice genomes. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(2):597-605. doi 10.1093/nar/gkw958
- Susiyanti S., Rusmana R., Maryani Y., Sjaifuddin S., Krisdianto N., Syabana M. The physicochemical properties of several Indonesian rice varieties. *Biotropia*. 2020;27(1):41050. doi 10.11598/btb.2020.27.1.1030
- Tang X., Zhong W., Wang K., Gong X., Xia Y., Nong J., Xiao L., Xia S. Regulation of grain chalkiness and starch metabolism by FLO2 interaction factor 3, a bHLH transcription factor in *Oryza sativa*. *Int J Mol Sci*. 2023;24(16):12778. doi 10.3390/ijms241612778
- Tyrka M., Mokrzycka M., Bakera B., Tyrka D., Szeliga M., Stojalowski S., Matysik P., Rokicki M., Rakoczy-Trojanowska M., Krajewski P. Evaluation of genetic structure in European wheat cultivars and advanced breeding lines using high-density genotyping-by-sequencing approach. *BMC Genomics*. 2021;22(1):81. doi 10.1186/s12864-020-07351-x
- Wang H., Zhang J., Farkhanda N., Li J., Sun S., He G., Zhang T., Ling Y., Zhao F. Identification of rice QTL for important agronomic traits with long-kernel CSSL-Z741 and three SSSLs. *Rice Sci*. 2020; 27(5):414-423. doi 10.1016/j.rsci.2020.04.008
- Wang N., Chen H., Qian Y., Liang Z., Zheng G., Xiang J., Feng T., Li M., Zeng W., Bao Y., Liu E., Zhang C., Xu J., Shi Y. Genome-wide association study of rice grain shape and chalkiness in a worldwide collection of Xian accessions. *Plants*. 2023;12(3):419. doi 10.3390/plants12030419
- Wang Y., Wang J., Zhai L., Liang Ch., Chen K., Xu J. Identify QTLs and candidate genes underlying source-, sink-, and grain yield-related traits in rice by integrated analysis of bi-parental and natural populations. *PLoS One*. 2020;15:e0237774. doi 10.1371/journal.pone.0237774
- Wing R., Purugganan M., Zhang Q. The rice genome revolution: from an ancient grain to Green Super Rice. *Nat Rev Genet*. 2018;19:505-517. doi 10.1038/s41576-018-0024-z
- Wu M., Cai M., Zhai R., Ye J., Zhu G., Yu F., Ye Sh., Zhang X. A mitochondrion-associated PPR protein, WBG1, regulates grain chalkiness in rice. *Front Plant Sci*. 2023;14:1136849. doi 10.3389/fpls.2023.1136849
- Xu Q., Jiang J., Jing C., Hu C., Zhang M., Li X., Shen J., Hai M., Hai M., Zhang Y., Zhang Y., Wang D., Dang X. Genome-wide association mapping of quantitative trait loci for chalkiness-related traits in rice (*Oryza sativa* L.). *Front Genet*. 2024;15:1423648. doi 10.3389/fgenet.2024.1423648
- Yadav S., Sandhu N., Singh V., Catolos M., Kumar A. Genotyping-by-sequencing based QTL mapping for rice grain yield under reproductive stage drought stress tolerance. *Sci Rep*. 2019;9(1):14326. doi 10.1038/s41598-019-50880-z
- Yang W., Liang J., Hao Q., Luan X., Tan Q., Lin S., Zhu H., Liu G., Liu Z., Bu S., Wang S., Zhang G. Fine mapping of two grain chalkiness QTL sensitive to high temperature in rice. *Rice*. 2021a;14:33. doi 10.1186/s12284-021-00476-x
- Yang W., Xiong L., Liang J., Hao Q., Luan X., Tan Q., Lin S., Zhu H., Liu G., Liu Z., Bu S., Wang S., Zhang G. Substitution mapping of two closely linked QTLs on chromosome 8 controlling grain chalkiness in rice. *Rice*. 2021b;14:85. doi 10.1186/s12284-021-00526-4


- Yang W., Chen S., Hao Q., Zhu H., Tan Q., Lin S., Chen G., Li Z., Bu S., Liu Z., Liu G., Wang S., Zhang G. Pyramiding of low chalkiness QTLs is an effective way to reduce rice chalkiness. *Rice*. 2024; 17(1):4. doi 10.1038/s41598-019-50880-z
- Yang X., Lu J., Shi W., Chen Y., Yu J., Chen S., Zhao D., Huang L., Fan X., Zhang C., Zhang L., Liu Q., Li Q. *RG1* regulates grain size, rice quality and seed germination in the small and round grain mutant *srg5*. *BMC Plant Biol*. 2024;24(1):167. doi 10.1186/s12870-024-04864-5
- Yao X., Wu K., Yao Y., Bai Y., Ye J., Chi D. Construction of a high-density genetic map: genotyping by sequencing (GBS) to map purple seed coat color (*Psc*) in hulless barley. *Hereditas*. 2018;155:37. doi 10.1186/s41065-018-0072-6
- Yuyu C., Aike Z., Pao X., Xiaoxia W., Yongrun C., Beifang W., Yue Z., Liaqat S., Shihua C., Liyong C., Yingxin Zh. Effects of *GS3* and *GL3.1* for grain size editing by CRISPR/Cas9 in rice. *Rice Sci*. 2020; 27(5):405-413. doi 10.1016/j.rsci.2019.12.010
- Zhao D., Li Q., Zhang C., Zhang C., Yang Q., Pan L., Ren X., Lu J., Gu M., Liu Q. *GS9* acts as a transcriptional activator to regulate rice grain shape and appearance quality. *Nat Commun*. 2018;9(1):1240. doi 10.1038/s41467-018-03616-y
- Zhao D., Zhang C., Li Q., Liu Q. Genetic control of grain appearance quality in rice. *Biotechnol Adv*. 2022;60:108014. doi 10.1016/j.biotechadv.2022.108014
- Zhao H., Yao W., Ouyang Y., Yang W., Wang G., Lian X., Xing Y., Chen L., Xie W. RiceVarMap: a comprehensive database of rice genomic variations. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(D1):D1018-D1022. doi 10.1093/nar/gku894
- Zhao K., Wright M., Kimball J., Eizenga G., McClung A., Kovach M., Tyagi W., Ali M.L., Tung C.W., Reynolds A., Bustamante C.D., McCouch S.R. Genomic diversity and introgression in *O. sativa* reveal the impact of domestication and breeding on the rice genome. *PLoS One*. 2010;5(5):e107780. doi 10.1371/journal.pone.0010780
- Zhou L., Chen L., Jiang L., Zhang W., Liu L., Liu X., Zhao Z., Liu S., Zhang L., Wang J., Wan J. Fine mapping of the grain chalkiness QTL *qPGWC-7* in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*. 2009; 118(3):581-590. doi 10.1007/s00122-008-0922-0
- Zhu A., Zhang Y., Zhang Z., Wang B., Xue P., Cao Y., Chen Y., Li Z., Liu Q., Cheng S., Cao L. Genetic dissection of *qPCG1* for a quantitative trait locus for percentage of chalky grain in rice (*Oryza sativa* L.). *Front Plant Sci*. 2018;9:1173. doi 10.3389/fpls.2018.01173

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 10.10.2025. После доработки 14.01.2026. Принята к публикации 16.02.2026.

doi 10.18699/vjgb-26-64

Создание тритикале с фиолетовой окраской зерна

Н.В. Петраш ^{1, 2} , П.И. Стёпочкин ^{1, 2}¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия² 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 pnv11@bionet.nsc.ru

Аннотация. Зерна злаковых культур с фиолетовой окраской отличаются высокой антиоксидантной активностью благодаря содержанию антоцианов в оболочке и представляют интерес для производства полезных продуктов питания. Однако у тритикале пока не выведены формы с богатой антоцианами фиолетовой окраской зерна. Цель настоящей работы – получение с использованием маркер-вспомогательной селекции новых форм пшенично-ржаных амфиплоидов с фиолетовой окраской зерна и сравнительная оценка их по содержанию антоцианов и показателям продуктивности. Определение генотипа гибридов тритикале Садко (\times *Triticosecale* Wittmack) с фиолетовозерной линией полбы 27-3/17 (*T. dicoccum* (Schränk) Schuebl.) проводили с применением молекулярных ДНК-маркеров. У всех гибридов F₃, имеющих фиолетовую окраску зерна, установлено наличие двух комплементарно действующих доминантных генов, *Pp3* и *Pp-B1*, отвечающих за повышенное содержание антоцианов в зерне. В последующих поколениях растения пшенично-ржаных амфиплоидов имели фиолетовую окраску зерна. Общее содержание антоцианов в цельнозерновой муке гибридов варьировало от 36 до 529.3 мкг/г. Высокое содержание определено у образца 2-1-6-6 (529.3 мкг/г). На уровне контроля (полба – 382.6 мкг/г) были образцы 2-1-1-4е, 2-1-5-10а и 2-1-6-4б. Растения гибридов F₅₋₆ обладали типичным фенотипом гексаплоидных тритикале. По длине колоса и количеству колосков превышали показатели полбы. Число зерен колоса у гибридов было меньше, чем у контроля тритикале Садко, и достигло в среднем 28.0 и 34.4 шт. в 2024 и 2025 гг. соответственно. Масса 1000 зерен фиолетовозерных семей тритикале в 2025 г. была на уровне материнской формы Садко и составила в среднем 47.6 г. Средняя урожайность с единицы площади у гибридов (470 г/м²) в 2025 г. была выше, чем у полбы (306 г/м²), но ниже, чем у Садко (584 г/м²). Таким образом, получен селекционный материал фиолетовозерных форм тритикале, по ряду признаков схожий с материнской формой тритикале Садко, но отличающийся от отцовской формы полбы – донора фиолетовой окраски зерна.


Ключевые слова: тритикале; фиолетовая окраска зерна; маркер-вспомогательная селекция; антоцианы

Для цитирования: Петраш Н.В., Стёпочкин П.И. Создание тритикале с фиолетовой окраской зерна. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(4):636-644. doi 10.18699/vjgb-26-64

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ № 25-26-20153 и Министерства науки и инновационной политики Новосибирской области (№ 30-2025-000980 от 21.05.2025).

Благодарности. Размножение гибридов проводилось в Центре коллективного пользования репродукции растений ИЦиГ СО РАН при поддержке бюджетного проекта FWNR-2026-0033.

Development of purple-grain triticale

N.V. Petrash ^{1, 2} , P.I. Stepochkin ^{1, 2}¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia² 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 pnv11@bionet.nsc.ru

Abstract. Purple-colored grains of cereal crops are characterized by high antioxidant activity. Anthocyanins, polyphenolic compounds found in the pericarp of their grains, have beneficial effects on human health. However, triticale has not yet developed forms with anthocyanin-rich purple grain color. The aim of this work was to obtain new forms of wheat-rye amphiploids with purple grain color using marker-assisted breeding and to compare their anthocyanin content and productivity indicators. Molecular DNA markers were used to determine the genotype of hybrids produced by triticale Sadko (\times *Triticosecale* Wittmack) and a purple-colored emmer wheat line 27-3/17 (*T. dicoccum* (Schränk) Schuebl.). Purple-colored F₃ hybrids carried two complementary dominant genes *Pp3* and *Pp-B1* in a homozygous state responsible for the high content of anthocyanins in the grain. In subsequent generations, the wheat-rye amphiploids had a purple grain color. The total anthocyanin content in the whole grain flour of the hybrids ranged from 36 to 529.3 µg/g. The high content was recorded in sample 2-1-6-6 (529.3 µg/g). Samples 2-1-1-4e, 2-1-5-10a and 2-1-6-4b were at the control level (emmer wheat – 382.6 µg/g). The F₅₋₆ hybrid plants had a typical hexaploid triticale phenotype. The spike length and the number of spikelets exceeded those of emmer wheat. The number of spike grains in the hybrids was less than that in the Sadko triticale averaging at 28.0 and 34.4 in 2024 and 2025, respectively. 1,000 grain weight of purple-grained triticale families in 2025 was comparable to the Sadko maternal form and averaged 47.6 g. The yield per unit area of hybrid families (470 g/m²)

in 2025 was higher than that of emmer wheat (306 g/m²), but lower than that of Sadko (584 g/m²). Thus, the breeding material of purple-grained triticale forms was obtained, which in a number of ways is similar to the triticale Sadko maternal form, but differs from the paternal form of the purple grain donor emmer wheat.

Key words: triticale; purple grain color; marker-assisted selection; anthocyanin

For citation: Petrash N.V., Stepochkin P.I. Development of purple-grain triticale. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(4):636-644. doi 10.18699/vjgb-26-64

Введение

Искусственный аллополиплоид тритикале (\times *Triticosecale* Wittmack), созданный путем объединения геномов пшеницы (*Triticum* sp.) и ржи (*Secale* sp.), как вид существует менее 150 лет. Первые фертильные октаплоидные ($2n = 8x = 56$) растения получены в 1888 г. немецким исследователем Римпай (Muntzing, 1974). Они имели три удвоенных генома мягкой пшеницы (ВВА^uА^uDD) и один удвоенный геном ржи (RR). У первичных октаплоидных тритикале из-за их цитогенетической нестабильности часто наблюдаются нарушения в мейозе, вследствие чего в потомстве появляются анеуплоидные растения с меньшим числом хромосом (Silkova et al., 2021). Доля таких растений в популяции может достигать 70 % (Стёпочкин, Владимиров, 1978). В потомствах анеуплоидных растений часто возникают дивергентные формы гексаплоидных (6x) тритикале (Kalinka, Achrem, 2018). Они более продуктивны и цитогенетически стабильны, чем октаплоидные. Этим обстоятельством объясняется тот факт, что сорта тритикале в большинстве случаев являются гексаплоидными.

Наряду с высоким потенциалом урожайности и хорошим качеством зерна тритикале обладает устойчивостью ко многим заболеваниям и неблагоприятным условиям среды, что делает эту культуру перспективной в аграрном производстве. За последние десятилетия производство тритикале в мире постепенно увеличивалось и ежегодно составляло более 10 млн тонн (<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>). Крупнейшими производителями являются Польша, Беларусь, Германия, Россия и Франция (Hamid et al., 2024).

Тритикале широко используется на пищевые и кормовые цели, кроме того, в производстве биотоплива, спирта, а также в пивоварении (Cantale et al., 2016; Миронцева и др., 2018; Zhu, 2018; Gaviley et al., 2024; Latini et al., 2024). Зерно тритикале имеет более высокую биологическую ценность, чем пшеница и рожь. Благодаря высокой концентрации лизина, улучшенной усвояемости белка и сбалансированному содержанию минералов его используют в качестве оздоровительного питания в рационе людей и животных (Kamanova et al., 2023). Тритикале подходит также для производства высококачественной муки для хлебопекарной и кондитерской промышленности, в том числе для изготовления диетического хлеба и сухих завтраков (Leonova et al., 2022).

Несмотря на многие положительные свойства, тритикале по-прежнему востребовано недостаточно и потребляется в гораздо меньшем количестве, чем другие основные злаки. Это связано, в первую очередь, с морщинистостью зерна, цветом муки и специфическими вкусовыми

характеристиками. Селекционеры постоянно работают над улучшением показателей зерна тритикале и создают гладкозерные сорта с качеством муки, не уступающим пшеничной (Camerlengo, Kiszonas, 2023). Следует заметить, что генетическое разнообразие тритикале невелико, это подтверждается результатами исследований, полученными на основе молекулярных данных (Niedziela et al., 2016; Losert et al., 2017) и определяется генофондом исходных видов пшеницы и ржи. Поэтому важно расширять разнообразие генов тритикале с привлечением доноров новых признаков.

В современном мире у потребителя возникает стремление к более здоровому питанию, в связи с чем появляется необходимость поиска альтернативных решений в отношении зерновых культур, используемых в питании человека и животных. Злаки с голубой, фиолетовой и черной окраской зерна с повышенным содержанием антоцианов имеют улучшенные функциональные и питательные свойства и привлекают все большее внимание исследователей (Sharma S. et al., 2018; Юдина и др., 2021; Loskutov, Khlestkina, 2021). Антоцианы представляют собой группу водорастворимых полифенольных соединений, оказывающих положительное влияние на здоровье человека благодаря своим противовоспалительным, противодиабетическим, противораковым и антибактериальным свойствам (Zhu, 2018; Francavilla, Joye, 2020; Gard et al., 2022).

Известно, что фиолетовая окраска зерна обусловлена синтезом и накоплением антоцианов в перикарпе зерновки. Этот процесс запускается в результате комплементарного взаимодействия двух ключевых генов, *Pp3* и *Pp-1* (Khlestkina, 2013). Ген *Pp3* передан от *T. aethiopicum* Jakubz. в хромосому 2А пшеницы, а ген *Pp-1* локализован в коротких плечах 7-й гомеологической группы хромосом и контролирует окраску колиоптиле и других органов растений (Khlestkina, 2013; Shoeva et al., 2014; Khlestkina et al., 2015).

В настоящее время в нашей стране активно ведутся работы по созданию исходного селекционного материала с окрашенным зерном на пшенице (Хлесткина и др., 2017; Василова и др., 2021; Рубец и др., 2022; Shamanin et al., 2022; Гордеева и др., 2024; Чуманова и др., 2025), ячмене (Kukoeva et al., 2024) и тритикале (Петраш, Стёпочкин, 2023). В государственном реестре селекционных достижений зарегистрировано несколько сортов мягкой фиолетовозерной пшеницы: Надира, Памяти Коновалова, Эф 22 (<https://gossortrf.ru>).

Создание тритикале с повышенным содержанием антоцианов в зерне определит новый потенциал развития этой культуры как продукта для здорового, сбалансированного

и функционального питания человека и животных. На сегодняшний день не зарегистрировано сортов тритикале с фиолетовой окраской зерна. Донорами этого признака могут быть фиолетовозерные формы и линии пшеницы и полбы. Однако вследствие гибридизации фиолетовозерной мягкой пшеницы (геномная формула ВВААDD) с гексаплоидным тритикале (геномная формула ВВААRR) есть риск полной или частичной потери хромосом генома R в результате процесса диплоидизации в потомстве гибрида. В итоге могут возникнуть 6х формы с неполным набором хромосом ржи, что и наблюдается у гибридов тритикале с мягкой яровой пшеницей в ряде поколений (Badaev et al., 1985).

Скрещиванием фиолетовозерной мягкой пшеницы с рожью можно создать гаплоидные стерильные гибриды, которые необходимо обрабатывать колхицином для удвоения числа хромосом и получения фиолетовозерных октаплоидных пшенично-ржаных амфиплоидов. Их, в свою очередь, необходимо скрещивать с гексаплоидными формами тритикале, чтобы в дальнейшем в потомстве отбирать 6х амфиплоиды с фиолетовой окраской зерна. Пример успешного получения новых форм тритикале гексаплоидного уровня в скрещиваниях 28-хромосомной полбы (*T. dicoccum* (Schrank) Schuebl.) с тритикале (Silkova et al., 2023) инициировал работы по созданию фиолетовозерной тритикале в скрещивании с полученной ранее полбой 27-3/17, отличающейся высоким содержанием антоцианов в зерне (Стёпочкин и др., 2023).

Целью нашей работы стало получение с использованием маркер-вспомогательной селекции новых форм пшенично-ржаных амфиплоидов с фиолетовой окраской зерна и сравнительная оценка их по содержанию антоцианов и показателям продуктивности.

Материалы и методы

Растительный материал. В качестве растительного материала использовались гибриды F₂: (*Triticosecale* × *T. dicoccum*). Гибриды были получены с помощью метода эмбриокультуры *in vitro* (Петраш, Стёпочкин, 2023) от скрещивания гексаплоидной тритикале сорта Садко из мировой коллекции ВИР (к-3927) и фиолетовозерной полбы 27-3/17 (Стёпочкин, и др., 2023). Схема получения растительного материала представлена на рис. 1.

Выделение ДНК и молекулярный анализ. Суммарную ДНК выделяли из молодых листьев индивидуальных растений в соответствии с методикой, описанной J. Plaschke с коллегами (1995). Реакционная смесь для ПЦР содержала 100 нг матричной ДНК, реакционный буфер (100 мМ Трис-НСl, рН 8.5 (при 25 °С), 100 мМ KCl, 0.4 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 4 мМ MgCl₂, 0.06 ед. акт./мкл Таq ДНК-полимеразы, 0.2 % Tween 20, стабилизаторы HS-Таq ДНК-полимеразы) («Биолабмикс», Россия), 0.3 мкМ прямого и обратного праймеров («Биоссет», Россия). Для скрининга растений использовали внутригенный маркер Pp3-diagnostic (Шоева и др., 2021), разработанный к гену *Pp3* на хромосоме 2A, и микросателлитный маркер Xgwm0046, фланкирующий ген *Pp-B1* на хромосоме 7B. Процедуру ПЦР с маркерами

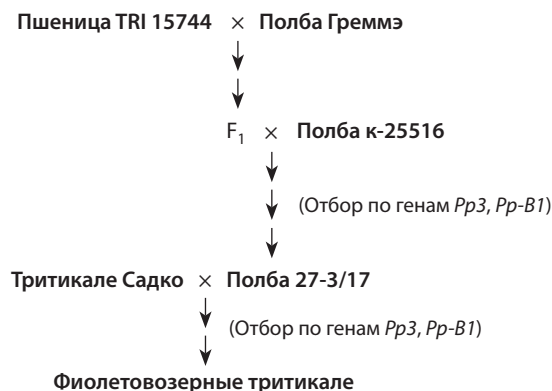


Рис. 1. Схема создания фиолетовозерных тритикале.

и разделение продуктов ПЦР в агарозном геле проводили согласно описанным протоколам (Шоева и др., 2021; Гордеева и др., 2023).

Определение общего содержания антоцианов. Содержание антоцианов определяли согласно принципам и методам, указанным в публикации (Sharma A. et al., 2023), с изменениями. Зрелое зерно исследуемых образцов измельчали на лабораторной мельнице «ЭМ-3А» (Россия). Антоцианы экстрагировали из цельнозерновой муки в 1 % HCl в метаноле в течение 12 ч при +4 °С. После центрифугирования в течение 25 мин при 12000 об./мин и +4 °С измеряли оптическую плотность экстракта на спектрофотометре SmartSpec™ Plus (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) при длине волны 530 и 700 нм. Анализ выполняли в трехкратной повторности для каждого образца. Вычисление содержания антоцианов проводили в пересчете на эквивалент самого распространенного в зерне антоцианидина цианидин-3-глюкозида по формуле:

$$C = (A/e) \times (V/1000) \times MW \times (1/Sample\ Wt) \times 10^6,$$

где *C* – общее содержание антоцианов, мкг цианидин-3-глюкозида/г муки; *A* – расчетный показатель абсорбции ($A_{530} - A_{700}$); *e* – коэффициент молярной экстинкции цианидин-3-глюкозида ($25.965\text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$); *V* – общий объем экстракта, мл; *MW* – молекулярная масса цианидин-3-глюкозида (449); *Sample Wt* – масса навески, мг.

Полевая оценка продуктивности растений. Изучение признаков продуктивности полученных фиолетовозерных образцов тритикале и их родителей проводили на опытном участке СибНИИРС – филиала ИЦиГ СО РАН в 2024 и 2025 гг. Растения выращивали на делянках шириной 100 см с расстоянием между рядками 20 см.

Погодные условия в годы проведения полевого опыта характеризовались избыточным увлажнением и высоким температурным режимом. К началу сентября 2024 г. сумма эффективных температур составила 1590.8 °С, а в 2025 г. – 1601 °С при средней многолетней 1428 °С. Уровень влагообеспеченности вегетационного периода 2024 г. был избыточным (гидротермический коэффициент (ГТК) в мае-августе составил 1.91), в августе выпало 2.3 нормы осадков, что повлекло развитие грибковых инфекций и прорастание зерна на корню. Вегетационный

период 2025 г. в среднем характеризовался достаточной влагообеспеченностью (ГТК в мае-августе равен 1.13), однако в июне и июле количество осадков было меньше среднего многолетнего, а в августе – больше.

Статистический анализ выполняли с использованием пакета программ Statistica 12 и Microsoft Excel 2016. Значения показателей признаков растений сравнивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В ранних поколениях гибридов тритикале и фиолетовозерной полбы отмечали высокую стерильность колоса и низкую всхожесть. Появлялись карликовые стерильные растения с колосом, похожим на колос полбы, но начиная с F₄ полностью стерильных растений уже не наблюдали, колос был типичным для гексаплоидных тритикале.

Анализ растений по молекулярным маркерам проводили на гибридах F₄ (рис. 2), все зерно в этом поколении было с фиолетовой окраской и при прорастивании имело окрашенный колеоптиле. По результатам ПЦР с маркером Pp3-diagnostic установлено, что тритикале и полба дают различные фрагменты амплификации с этим маркером. У всех гибридов в результате ПЦР синтезировался фрагмент длиной около 398 п. н., который совпадает с фрагментом полбы. Следовательно, гибриды несут доминантный ген *Pp3* на хромосоме 2A.

Анализ с микросателлитным маркером Xgwm0046, тесно сцепленным с геном *Pp-B1* (ответственным за окрашенный колеоптиле), выявил, что гибриды аналогично родительской полбе амплифицируют фрагмент длиной около 186 п. н., тогда как с ДНК тритикале синтезировался фрагмент большей длины. На основании молекулярного анализа установлено, что все изученные F₄ гибриды несут доминантные гены *Pp3* и *Pp-B1* в гомозиготном состоянии.

Из поколения F₄ по фертильности нами было отобрано четыре лучших растения (2-1-1, 2-1-3, 2-1-5 и 2-1-6), которые в дальнейшем изучались как отдельные семьи. В последующих вегетациях все растения были фиолетовозерными, но различались по морфологии. На рис. 3 представлены изображения колоса (в двух проекциях) и зерна

некоторых перспективных гибридов F₆ и их родителей. Полученные образцы имеют окрашенное зерно и остистый колос, по морфологии больше похожий на тритикале Садко. Следует заметить, что у гибридов, как и у материнского сорта Садко, шейка стебля имеет опушение. Этот признак контролируется доминантным геном *Hp*, локализованным в хромосоме 5R (Korzun et al., 1996), следовательно, отобранные нами формы тритикале несут хромосому 5 ржи либо ее фрагмент.

Потомство F₅₋₆ тестировали по признакам продуктивности в полевых условиях 2024–2025 гг. совместно с родительскими формами (см. таблицу). Структурный анализ выполняли на 10 типичных растениях каждой семьи, в качестве контроля использовали тритикале Садко. При выращивании в поле установлено, что гибриды, как и тритикале Садко, были устойчивы к полеганию, тогда как полба имела слабую соломину и полегла полностью. Гибридные формы тритикале и сорт Садко, в отличие от полбы, характеризовались легким обмолом колоса; семена вымачивались без чешуек; стержень колоса прочный.

Гибридные линии в годы изучения имели длину колоса и число колосков в колосе на уровне контроля Садко (более 9 см и 23 шт. соответственно), тогда как длина колоса полбы не превышала 8 см, а число колосков у нее составило 17–18 шт. По числу зерен главного колоса гибриды уступали контролю, достоверно ниже были значения семей 2-1-3 и 2-1-5 в 2025 г. (29.6 и 29.5 шт. против 45.7 шт. у Садко). При этом полба в оба года имела достоверно меньшее число зерен, чем Садко, что обусловлено меньшим количеством колосков в колосе. В свою очередь, пониженное число завязавшихся зерен у гибридных форм тритикале связано с частичной стерильностью. Вес зерна с колоса гибридных семей в годы изучения был на уровне контроля, но не превышал его и составил в среднем 0.85 г в 2024 г. и 1.69 г в 2025 г., лишь у образца 2-1-3 в 2024 г. масса зерна с колоса была достоверно ниже – 0.62 г.

Масса 1000 зерен является показателем крупности зерна; в годы изучения у полученных фиолетовозерных форм тритикале она была на уровне контрольного сорта и составила 29.8 и 47.6 г в 2024 и 2025 гг. при 33.8 и 50.2 г со-

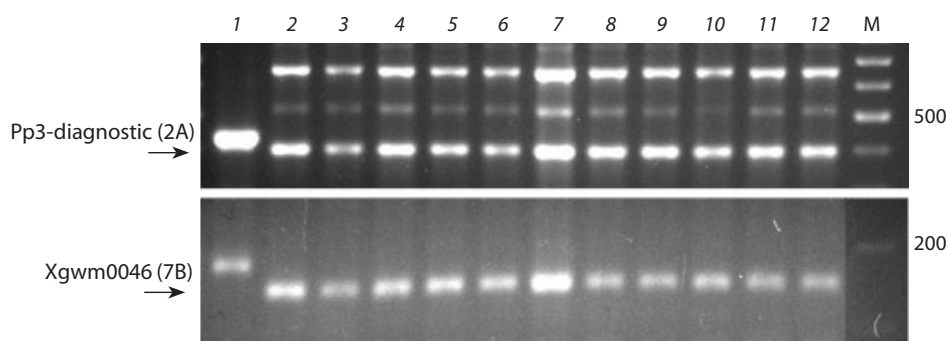


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов ПЦР гибридов F₄: *Triticosecale* × *T. dicoccum* и их родительских форм с ДНК маркерами Pp3-diagnostic и Xgwm0046.

1 – тритикале Садко; 2 – полба 27-3/17; 3–12 – гибриды F₄: Садко × 27-3/17; М – ДНК маркер Step 100. Стрелками указаны фрагменты ДНК, соответствующие доминантному аллелю гена *Pp3* на хромосоме 2A (≈398 п. н.) и маркера Xgwm0046, сцепленного с доминантным аллелем гена *Pp-B1* на хромосоме 7B (≈186 п. н.).



Рис. 3. Колосья и зерна фиолетовозерных гибридов F₆: Садко × 27-3/17 (*Triticosecale* × *T. dicoccum*) и их родителей.

Показатели продуктивности гибридов F₅₋₆ фиолетовозерных форм тритикале и их родителей в 2024–2025 гг.

Образец	Длина главного колоса, см		Число колосков главного колоса, шт.		Число зерен главного колоса, шт.		Вес зерен главного колоса, г		Масса 1000 зерен, г		Урожайность, г/м ²	
	2024 г.	2025 г.	2024 г.	2025 г.	2024 г.	2025 г.	2024 г.	2025 г.	2024 г.	2025 г.	2024 г.	2025 г.
2-1-1	9.67 ± 0.49	9.71 ± 0.67	24.4 ± 1.1	24.6 ± 1.4	27.7* ± 4.9	38.6 ± 6.7	0.85* ± 0.22	1.98 ± 0.43	30.1 ± 3.4	47.5 ± 5.9	216* ± 52	493 ± 49
2-1-3	9.56 ± 0.68	9.42 ± 0.78	23.6 ± 1.4	23.0 ± 1.9	21.6* ± 8.2	29.6* ± 4.6	0.62* ± 0.35	1.39 ± 0.42	29.2 ± 5.7	46.0 ± 0.8	163** ± 30	384* ± 86
2-1-5	9.66 ± 0.76	9.28 ± 0.42	23.2 ± 1.1	23.6 ± 1.4	32.5* ± 4.0	29.5* ± 3.8	0.99 ± 0.22	1.38* ± 0.25	29.5 ± 3.4	46.6 ± 6.5	244** ± 32	404* ± 35
2-1-6	9.29 ± 0.46	9.56 ± 0.34	24.2 ± 1.1	23.8 ± 0.9	30.2* ± 5.7	39.8 ± 3.5	0.95 ± 0.24	2.00 ± 0.23	30.5 ± 2.6	50.1 ± 3.0	281* ± 79	486 ± 94
Среднее значение	9.55 ± 0.17	9.49 ± 0.18	23.9 ± 0.6	23.8 ± 0.7	28.0* ± 4.7	34.4 ± 5.6	0.85* ± 0.16	1.69 ± 0.34	29.8 ± 0.6	47.6 ± 1.8	275** ± 44	470 ± 61
Тритикале Садко	10.19 ± 0.36	10.10 ± 0.34	24.6 ± 0.6	24.8 ± 0.9	44.8 ± 2.9	45.7 ± 2.9	1.53 ± 0.20	2.28 ± 0.12	33.8 ± 2.7	50.2 ± 3.3	473 ± 29	584 ± 40
Полба 27-3/17	6.79** ± 0.46	7.73** ± 0.39	17.0** ± 0.9	17.8** ± 0.9	29.9* ± 2.3	35.1* ± 2.0	1.00 ± 0.08	1.38** ± 0.05	33.7 ± 2.6	39.5* ± 2.6	235** ± 36	306** ± 29

Примечание. Среднее значение – среднее значение признака гибридных форм тритикале. Достоверные отличия от тритикале Садко. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

ответственно у Садко. По урожайности гибриды уступали контрольному сорту тритикале, особенно в 2024 г., когда их средняя урожайность составила 275 г/м² при 473 г/м² у Садко. В 2025 г. в вегетационный период складывались более благоприятные погодные условия и урожайность гибридов выросла до 470 г/м². Сорт Садко также показал более высокий результат, сформировав урожай в размере 584 г/м².

На основании данных оценки признаков продуктивности можно сделать вывод, что созданные нами формы тритикале с фиолетовым зерном имеют признаки, схожие по значению с гексаплоидной тритикале Садко. Однако у большинства гибридов все еще присутствует частичная стерильность колоса, возможно, это связано с нарушениями в мейозе. Как показали выполненные ранее цитологические исследования F₆ гибридов полбы с тритикале, аномалии в мейозе происходят на протяжении нескольких поколений (Silkova et al., 2023). Также известно, что у гибридов тритикале стабилизация геномов и нормализация процесса мейоза могут происходить и в более поздних поколениях (Kalinka, Achrem, 2018).

Для определения содержания антоцианов в зерне среди четырех семей в поколении F₆ было отобрано девять растений, выделившихся по озерненности колоса и показателям продуктивности. Все зерна имели антоциановую окраску от средней до интенсивной. Общее содержание антоцианов (СА) определяли в цельнозерновой муке полевого материала 2025 г. Сравнение проводили с показателями полбы 27-3/17 – донора фиолетовой окраски (рис. 4). Полученные данные показали, что гибриды различались по СА от 36.0 до 529.3 мкг/г. У контроля (полбы) значение составило 382.6 мкг/г. Достоверно более высокий показатель наблюдали у образца 2-1-6-6 – 529.3 мкг/г. На уровне полбы были значения: у 2-1-1-4е – 399.5 мкг/г, 2-1-5-10а – 429.9 и 2-1-6-4б – 395.4 мкг/г. Высокие показатели СА (более 200 мкг/г) также отмечены у образцов 2-1-1-4д, 2-1-3-5а и 2-1-5-7. Наименьшие значения СА (36 мкг/г) выявили в цельнозерновой муке образцов 3а и 3б из семьи 2-1-3. Белозерный материнский сорт тритикале Садко имел общее содержание антоцианов 4.1 мкг/г муки.

В зерне фиолетовозерной пшеницы, по оценкам разных авторов, общее содержание антоцианов находится в пределах от 16 до 477 мкг/г (Гордеева и др., 2024). В нашей работе получены формы тритикале с высоким содержанием антоцианов – 529 мкг/г, что превышает показатели донорной линии фиолетовозерной полбы. Как известно, для биосинтеза антоцианов в перикарпе зерновки необходимо комплементарное взаимодействие двух генов, *Pp-1* и *Pp-3*. Ген *Pp-3* является уникальным, он унаследован от эфиопской пшеницы (Хлесткина и др., 2014). Ген *Pp-1*, контролирующей окраску колеоптиле и других органов растений, широко распространен среди редких видов пшениц (Шоева и др., 2024) и сортов мягкой пшеницы (Гордеева и др., 2024).

Окраска органов растения также встречается у сортов тритикале. Например, сорт ярового тритикале Аморе имеет сильную антоциановую окраску колеоптиле (Скатова и др., 2018), сорта Венец, Уллубий, Богуслав – среднюю

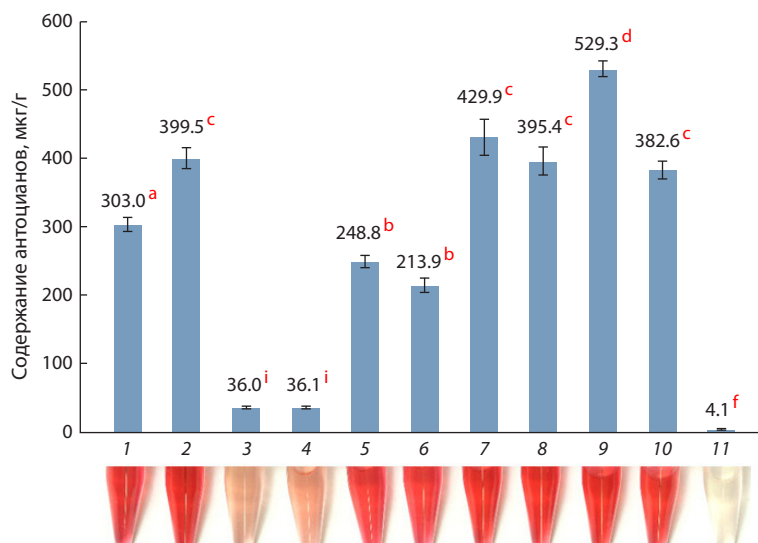


Рис. 4. Общее содержание антоцианов в пересчете на Су-3-Glu в метанольных экстрактах из цельнозерновой муки девяти гибридов фиолетовозерных тритикале и их родительских форм.

1 – F₆ 2-1-1-4д; 2 – F₆ 2-1-1-4е; 3 – F₆ 2-1-3-3а; 4 – F₆ 2-1-3-3б; 5 – F₆ 2-1-3-5а; 6 – F₆ 2-1-5-7; 7 – F₆ 2-1-5-10а; 8 – F₆ 2-1-6-4б; 9 – F₆ 2-1-6-6; 10 – полба 27-3/17; 11 – тритикале Садко. Символы а–ф свидетельствуют о статистически значимых различиях между сравниваемыми группами при $p < 0.05$.

окраску (<https://gossortrf.ru>). У используемого в нашей работе тритикале Садко в описании сорта указана антоциановая окраска ушек флагового листа (Гриб и др., 2011). Вероятно, у Садко присутствует один из аллелей гена *Pp-1*, который в сочетании с генами *Pp3*, и *Pp-B1* от полбы определяет большую выраженность признака окраски зерна у некоторых гибридов.

Получение константных форм или линий пшенично-рожанных амфиплоидов, создаваемых на основе гибридизации тритикале с полбой, – длительный процесс. Его сложность обусловлена продолжающимся формообразованием, связанным как с рекомбинацией генов двух видов, так и с геномными перестройками. Для ускорения решения этой проблемы на следующем этапе селекции важно применение метода удвоенных гаплоидов на основе лучших форм фиолетовозерных тритикале.

Заключение

Нами предпринята успешная попытка создания форм тритикале с фиолетовым зерном на основе скрещивания сорта тритикале Садко и полбы 27-3/17, донора генов *Pp3* и *Pp-B1*, отвечающих за окраску зерна. Полученные гибридные формы тритикале имеют фиолетовый цвет зерна, высокое общее содержание антоцианов, по показателям продуктивности и форме колоса приближающиеся к материнской форме тритикале. Дальнейшие исследования должны быть направлены на создание константных генетически стабильных линий фиолетовозерных тритикале, которые послужат исходным селекционным материалом и станут донорами для передачи другим сортам тритикале признака высокого содержания антоцианов в зерне. Предполагается, что зерно фиолетовозерных тритикале будет использоваться как дополнительный источник антиоксидантов в функциональном питании человека и животных.

Список литературы / References

- Василова Н.З., Асхадуллин Д.Ф., Асхадуллин Д., Багавиева Э.З., Тазутдинова М.Р., Хусаинова И.И. Фиолетовозерный сорт яровой мягкой пшеницы Надира. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2021;4(40):66-75. doi 10.24412/2309-348X-2021-4-66-75 [Vasilova N.Z., Askhadullin D.F., Askhadullin D., Bagavieva E.Z., Tazutdinova M.R., Khusainova I.I. Violet-green variety of spring soft wheat Nadira. *Zernobobovye i Krupyanye Kul'tury = Legumes Groat Crops*. 2021;4(40):66-75. doi 10.24412/2309-348X-2021-4-66-75 (in Russian)]
- Гордеева Е.И., Шоева О.Ю., Шаманин В.П., Хлесткина Е.К. Использование молекулярных маркеров в селекции мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с различной антоциановой окраской зерновок. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;9(2):86-99. doi 10.18699/LettersVJ-2023-9-11 [Gordeeva E.I., Shoeva O.Y., Shamanin V.P., Khlestkina E.K. The molecular markers applying in breeding of spring bread wheat (*Triticum aestivum* L.) lines with different anthocyanin coloration of the grains. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Letters to Vavilov J Genet Breed*. 2023;9(2):86-99. doi 10.18699/LettersVJ-2023-9-11 (in Russian)]
- Гордеева Е.И., Шаманин В.П., Хлесткина Е.К., Шоева О.Ю. Особенности селекции фиолетовозерной пшеницы на основе сортов с антоциановой окраской coleoptiles и стебля. *Сельскохозяйственная биология*. 2024;59(3):507-524. doi 10.15389/agrobiology.2024.3.507rus [Gordeeva E.I., Shamanin V.P., Khlestkina E.K., Shoeva O.Yu. On peculiarities of breeding purple-grained wheat based on varieties with anthocyanin pigmentation of coleoptiles and stems. *Sel'skokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2024;59(3):507-524. doi 10.15389/agrobiology.2024.3.507rus (in Russian)]
- Гриб С.И., Буштевич В.Н., Полякова Е.Л., Крылова Т.М., Павлова Л.Д., Бондарчук В.А., Филатова Т.Ф., Пилипенко Д.В. Тритикале «Садко». Патент на селекционное достижение № 307, Республика Беларусь, от 15.06.2011 [Grib S.I., Bushtevich V.N., Polyakova E.L., Krylova T.M., Pavlova L.D., Bondarchuk V.A., Filatova T.F., Pilipenko D.V. Triticale variety "Sadko". Patent for a Selection Achievement No. 307. Republic of Belarus, 15.06.2011 (in Russian)]

- Миронцева А.А., Цед Е.А., Волкова С.В. Обоснование применения биоактивированного зерна тритикале в спиртовом производстве. *Техника и технология пищевых производств*. 2018;48(1): 57-65. doi 10.21603/2074-9414-2018-1-57-65
[Mironitseva A., Tsed E., Volkova S. Justification of bioactivated grain triticale use in alcohol production. *Tekhnika i Tekhnologiya Pishchevykh Proizvodstv = Food Processing: Techniques and Technology*. 2018;48(1):57-65. doi 10.21603/2074-9414-2018-1-57-65 (in Russian)]
- Петраш Н.В., Стёпочкин П.И. Создание фиолетовозерных гибридов в отдаленных скрещиваниях тритикале, мягкой пшеницы и полбы методом эмбриокультуры *in vitro*. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;9(4):183-188. doi 10.18699/LettersVJ-2023-9-25
[Petrash N.V., Stepochkin P.I. Development of purple-grain hybrids in distant crosses of triticale, bread wheat and emmer using the embryo culture. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Lett Vavilov J Genet Breed*. 2023;9(4):183-188. doi 10.18699/LettersVJ-2023-9-25 (in Russian)]
- Рубец В.С., Ворончихина И.Н., Игонин В.Н., Сидоренко В.С., Ворончихин В.В. Характеристика фиолетовозерных сортов яровой мягкой пшеницы в условиях центрального района Нечерноземной зоны России. *Международный сельскохозяйственный журнал*. 2022;65(5):525-529. doi 10.55186/25876740_2022_65_5_525
[Rubets V.S., Voronchikhina I.N., Igonin V.N., Sidorenko V.S., Voronchikhin V.V. Characteristics of violet-green variety of spring soft wheat in the conditions of the central region of the Non-Chernozem zone of Russia. *Mezhdunarodnyi Sel'skokhoziaystvennyi Zhurnal*. 2022;5:525-529. doi 10.55186/25876740_2022_65_5_525 (in Russian)]
- Скатова С.Е., Васильев В.В., Тысленко А.М., Зуев Д.В. Тритикале яровое Аморе – новый сорт для адаптивного земледелия Нечерноземья. *Владимирский земледелец*. 2018;2(84):10-15
[Skatova S.E., Vasiliev V.V., Tyslenko A.M., Zuev D.V. Spring triticale 'Amore' is a new variety for adaptive agriculture in the Non Black soil zone. *Vladimirskij Zemledelets*. 2018;2(84):10-15 (in Russian)]
- Стёпочкин П.И., Владимиров Н.С. Характеристика линий C₁ озимых гомогеномных октоплоидных тритикале по количеству хромосом, озерненности и морозостойкости. *Генетика*. 1978;14(9): 1597-1603
[Stepochkin P.I., Vladimirov N.S. Chromosome number, seed set and winter hardiness characteristics of C₁ winter lines of homogenomic 8x triticale. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 1978;14(9):1597-1603 (in Russian)]
- Стёпочкин П.И., Гордеева Е.И., Хлесткина Е.К. Маркер-ориентированная селекция в создании гибридных линий *Triticum dicoccon* (Schrack) Schuebl. × *Triticum aethiopicum* Jakubz. с фиолетово-окрашенным зерном. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2023;184(2):139-148. doi 10.30901/2227-8834-2023-2-139-148
[Stepochkin P.I., Gordeeva E.I., Khlestkina E.K. Marker-assisted breeding of hybrid lines of *Triticum dicoccon* (Schrack) Schuebl. × *Triticum aethiopicum* Jakubz. with purple grain. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2023;184(2):139-148. doi 10.30901/2227-8834-2023-2-139-148 (in Russian)]
- Хлесткина Е.К., Шоева О.Ю., Гордеева Е.И. Гены биосинтеза флавоноидов пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014;18(4/1):784-796
[Khlestkina E.K., Shoeva O.Y., Gordeeva E.I. Flavonoid biosynthesis genes in wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2014;18(4/1):784-796 (in Russian)]
- Хлесткина Е.К., Усенко Н.И., Гордеева Е.И., Стабровская О.И., Шарфунова И.Б., Отмахова Ю.С. Маркер-контролируемое получение и производство форм пшеницы с повышенным уровнем биофлавоноидов: оценка продукции для обоснования значимости направления. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(5):545-553. doi 10.18699/VJ17.25-o
[Khlestkina E.K., Usenko N.I., Gordeeva E.I., Stabrovskaya O.I., Sharfunova I.B., Otmakhova Y.S. Evaluation of wheat products with high flavonoid content: justification of importance of marker-assisted development and production of flavonoid-rich wheat cultivars. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2017;21(5):545-553. doi 10.18699/VJ17.25-o (in Russian)]
- Чуманова Е.В., Ефремова Т.Т., Соболев К.В., Косяева Е.А. Получение гибридных линий *Triticum petropavlovskiy* Udacz. et Migusch. × *Triticum aestivum* L. с крупной окрашенной зерновкой и повышенным содержанием антиоксидантов. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;11(2):80-89. doi 10.18699/letvjgb-2025-11-12
[Chumanova E.V., Efremova T.T., Sobolev K.V., Kosyaeva E.A. Development and characterization of wheat hybrids *Triticum petropavlovskiy* Udacz. et Migusch. × *Triticum aestivum* L. with large colored grain and increased antioxidant content. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Lett Vavilov J Genet Breed*. 2025;11(2):80-89. doi 10.18699/letvjgb-2025-11-12 (in Russian)]
- Шоева О.Ю., Гордеева Е.И., Хлесткина Е.К. Внутривидовой ДНК-маркер для отбора пшеницы с повышенным содержанием антоцианов в перикарпе зерновки. Патент RU 2774444 C1, от 29 ноября 2021 г. Режим доступа: <https://patentimages.storage.googleapis.com/7f/6b/b4/734418d3890f53/RU2774444C1.pdf>
[Shoeva O.Yu., Gordeeva E.I., Khlestkina E.K. Intrageneric DNA Marker for Selecting Wheat with High Anthocyanin Content in the Pericarp of the Grain. Russian patent RU 2774444C1, 29.11.2021. <https://patentimages.storage.googleapis.com/7f/6b/b4/734418d3890f53/RU2774444C1.pdf> (in Russian)]
- Шоева О.Ю., Гордеева Е.И., Хлесткина Е.К., Гашимов М.Э., Куркиев К.У. Исследование редких видов пшениц как доноров для селекции на содержание антоцианов в зерне. *Сельскохозяйственная биология*. 2024;59(5):955-972. doi 10.15389/agrobiologia.2024.5.955rus
[Shoeva O.Yu., Gordeeva E.I., Khlestkina E.K., Gashimov M.E., Kurkiev K.U. Study of rare species of wheat as donors for breeding for functional nutrition. *Sel'skokhoziaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2024;59(5):955-972. doi 10.15389/agrobiologia.2024.5.955rus (in Russian)]
- Юдина Р.С., Гордеева Е.И., Шоева О.Ю., Тихонова М.А., Хлесткина Е.К. Антоцианы как компоненты функционального питания. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(2):178-189. doi 10.18699/VJ21.022
[Yudina R.S., Gordeeva E.I., Shoeva O.Yu., Tikhonova M.A., Khlestkina E.K. Anthocyanins as functional food components. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2021; 25(2):178-189. doi 10.18699/VJ21.022 (in Russian)]
- Badaev N.S., Badaeva E.D., Bolsheva N.L., Maximov N.G., Zelenin A.V. Cytogenetic analysis of forms produced by crossing hexaploid triticale with common wheat. *Theor Appl Genet*. 1985;70: 536-541. doi 10.1007/BF00305987
- Camerlengo F., Kizzonas A.M. Genetic factors influencing triticale quality for food. *J Cereal Sci*. 2023;113:103744. doi 10.1016/j.jcs.2023.103744
- Cantale C., Petrazzuolo F., Correnti A., Farneti A. Triticale for bioenergy production. *Agric Agric Sci Procedia*. 2016;8:609-616. doi 10.1016/j.aaspro.2016.02.083
- Francavilla A., Joye I.J. Anthocyanins in whole grain cereals and their potential effect on health. *Nutrients*. 2020;12(10):2922. doi 10.3390/nu12102922
- Gard M., Kaur S., Sharma A., Kumari A., Tiwari V., Sharma S., Kapoor P., Sheoran B., Goyal A., Krishania M. Rising demand for healthy foods-anthocyanin biofortified colored wheat is a new research trend. *Front Nutr*. 2022;9:878221. doi 10.3389/fnut.2022.878221
- Gaviley O.V., Katerynych O.O., Ionov I.A., Dekhtiarova O.O., Grifin D.K., Romanov M.N. Triticale: a general overview of its use in poultry production. *Encyclopedia*. 2024;4(1):395-414. doi 10.3390/encyclopedia4010027

- Hamid, Kathuria D., Gautam S., Suri S., Jaiswal A.K. Triticale. In: Singh J., Kaur S., Rasane P., Singh J. (Eds) *Cereals and Nutraceuticals*. Singapore: Springer, 2024;163-189. doi 10.1007/978-981-97-2542-7_8
- Kalinka A., Achrem M. Reorganization of wheat and rye genomes in octoploid triticale (\times *Triticosecale*). *Planta*. 2018;247(4):807-829. doi 10.1007/s00425-017-2827-0
- Kamanova S., Yermekov Y., Shah K., Mulati A., Liu X., Bulashev B., Toimbayeva D., Ospankulova G. Review on nutritional benefits of triticale. *Czech J Food Sci*. 2023;41(4):248-262. doi 10.17221/67/2023-CJFS
- Khlestkina E.K. Genes determining the coloration of different organs in wheat. *Russ J Genet Appl Res*. 2013;3(1):54-65. doi 10.1134/S2079-059713010085
- Khlestkina E.K., Shoeva O.Y., Gordeeva E.I. Flavonoid biosynthesis genes in wheat. *Russ J Genet Appl Res*. 2015;5(3):268-278
- Korzun V., Melz G., Börner A. RFLP mapping of the dwarfing (*Ddw1*) and hairy peduncle (*Hp*) genes on chromosome 5 of rye (*Secale cereale* L.). *Theor Appl Genet*. 1996;92:1073-1077. doi 10.1007/BF00224051
- Kukoeva T.V., Molobekova C.A., Totsky I.V., Vasiliev G.V., Pronozin A.Y., Afonnikov D.A., Khlestkina E.K., Shoeva O.Y. Enrichment of grain anthocyanin content through marker-assisted breeding for *Ant1*, *Ant2* or *HvMyc2* genes in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Agronomy*. 2024;14(6):1231. doi 10.3390/agronomy14061231
- Latini A., Cantale C., Gazza L., Nocente F., Migliore G., Maccioni O., Marconi O., Floridi S., De Francesco G., Ammar K., Galeffi P. Exploring the potential of triticale lines for bioethanol production. *Explor Foods Foodomics*. 2024;2:613-625. doi 10.37349/eff.2024.00054
- Leonova S., Badamshina E., Koshchina E., Kalugina O., Gareeva I., Leshchenko N. Triticale flour in bakery and rusk products. *Food Sci Technol Int*. 2022;28(6):524-534. doi 10.1177/10820132211023273
- Losert D., Maurer H.P., Marulanda J.J., Würschum T. Phenotypic and genotypic analyses of diversity and breeding progress in European triticale (\times *Triticosecale* Wittmack). *Plant Breed*. 2017;136(1):18-27. doi 10.1111/pbr.12433
- Loskutov I.G., Khlestkina E.K. Wheat, barley, and oat breeding for health benefit components in grain. *Plants*. 2021;10(1):86. doi 10.3390/plants10010086
- Muntzing A. Historical review of the development of triticale. In: *Triticale: Proceedings of an International Symposium*, El Batán, Mexico. 1974:13-30
- Niedziela A., Orłowska R., Machezyńska J., Bednarek P.T. The genetic diversity of triticale genotypes involved in Polish breeding programs. *Springerplus*. 2016;5(1):355. doi 10.1186/s40064-016-1997-8
- Plaschke J., Ganai M.W., Roeder 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
- Shamanin V.P., TekinCakmak Z.H., Gordeeva E.I., Karasu S., Pototskaya I., Chursin A.S., Pozherukova V.E., Ozulku G., Morgounov A.I., Sagdic O., Koksel H. Antioxidant capacity and profiles of phenolic acids in various genotypes of purple wheat. *Foods*. 2022;11(16):2515. doi 10.3390/foods11162515
- Sharma A., Yadav M., Tiwari A., Ali U., Krishania M., Bala M., Sharma P., Goudar G., Roy J.K., Navik U., Garg M. A comparative study of colored wheat lines across laboratories for validation of their phytochemicals and antioxidant activity. *J Cereal Sci*. 2023;112:103719. doi 10.1016/j.jcs.2023.103719
- Sharma S., Chunduri V., Kumar A., Kumar R., Khare P., Kondepudi K.K., Bishnoi M., Garg M. Anthocyanin bio-fortified colored wheat: nutritional and functional characterization. *PLoS One*. 2018;13(4):0194367. doi 10.1371/journal.pone.0194367
- Shoeva O.Y., Gordeeva E.I., Khlestkina E.K. The regulation of anthocyanin synthesis in the wheat pericarp. *Molecules*. 2014;19(12):20266-20279. doi 10.3390/molecules191220266
- Silkova O.G., Ivanova Y.N., Loginova D.B., Solovey L.A., Sycheva E.A., Dubovets N.I. Karyotype reorganization in wheat-rye hybrids obtained via unreduced gametes: is there a limit to the chromosome number in triticale? *Plants*. 2021;10(10):2052. doi 10.3390/plants10102052
- Silkova O.G., Ivanova Y.N., Stepochkin P.I. Creation and study of emmer (*Triticum dicoccum*) \times triticale hybrids. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2023;27(4):323-332. doi 10.18699/VJGB-23-39
- Zhu F. Triticale: nutritional composition and food uses. *Food Chem*. 2018;241:468-479. doi 10.1016/j.foodchem.2017.09.009

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 10.11.2025. После доработки 14.01.2026. Принята к публикации 15.01.2026.

doi 10.18699/vjgb-26-65

Получение голозерных гибридов *Triticum durum* с *Triticum dicoccum* с антоциановой окраской перикарпа зерновки

Е.И. Гордеева ¹ , А.Ю. Новосельская-Драгович ², О.Ю. Шоева ¹, Е.К. Хлесткина ^{1,3}¹ 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 elgordeeva@bionet.nsc.ru

Аннотация. Одно из перспективных направлений селекции – получение гибридов полбы с повышенным содержанием антоцианов в зерновке для производства функциональных продуктов питания. Проведено фенотипирование и дана предварительная оценка по наследованию глиадинкодирующих генов наиболее перспективных фиолетовозерных полбяных гибридов, полученных нами ранее после сложного трехступенчатого скрещивания фиолетовозерной твердой пшеницы (*T. durum* Desf.) с двумя разными формами яровой полбы (*T. dicoccum* Schrank): гибридным голозерным сортом Гремме и безостой красnozерной мутантной линией к-25516 (коллекции ВИР). Генотипирование гибридов по генам (*Gli*) запасных белков зерновки пшеницы – глиадином – позволило отобрать фиолетовозерную линию, целиком наследующую глиадинкодирующие гены от полбы двузернянки к-25516, и линию с наследованием этих генов от твердой пшеницы и полбы двузернянки к-25516. Для улучшения селекционного материала было проведено возвратное скрещивание фиолетовозерных пшенично-полбяных гибридов, содержащих доминантные аллели *Pp-B1* и *Pp3*, с показавшим наилучшую урожайность белозерным голозерным сортом Гремме. Произведен маркер-контролируемый отбор растений поколения F_{2-4} по генам *Pp* (*Purple pericarp*), регулирующим биосинтез антоцианов в перикарпе зерновки. При отборе фиолетовозерных растений в потомствах F_{2-3} использование микросателлитных маркеров, близко расположенных к генам антоциановой окраски, не показало надежного сцепления с целевыми генами, однако позволило проследить у гибридов сложное наследование генетического материала от разных родителей. Разработанные нами внутривидовые полиморфные ПЦР-маркеры позволили точно отобрать образцы растений, несущие в ДНК одновременно доминантные аллели двух комплементарно взаимодействующих генов, *Pp-B1* и *Pp3*. Растения отбирались по признаку легкой обмолачиваемости зерен в F_4 . Таким образом, за два года при использовании малых площадей тепличного комплекса при помощи маркер-контролируемой селекции в поколении F_4 получена коллекция, состоящая из 25 голозерных и полуголозерных яровых фиолетовозерных линий пшенично-полбяных гибридов, константных по признаку антоциановой окраски перикарпа зерновок и различающихся по глиадинкодирующим генам.


Ключевые слова: голозерная полба; фиолетовая окраска зерна; антоцианы; глиадины; маркер-контролируемая селекция; ПЦР-маркеры

Для цитирования: Гордеева Е.И., Новосельская-Драгович А.Ю., Шоева О.Ю., Хлесткина Е.К. Получение голозерных гибридов *Triticum durum* с *Triticum dicoccum* с антоциановой окраской перикарпа зерновки. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(4):645-657. doi 10.18699/vjgb-26-65

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 25-26-20157 (<https://grant.rscf.ru/site/user/bids?role=master>) и Министерства науки и инновационной политики Новосибирской области (соглашение от 21.04.2025 № 30-2025-001058).

Благодарности. Растения выращены в ЦПК репродукции растений ИЦИГ СО РАН в рамках бюджетного проекта FWNR-2026-0029. Авторы выражают признательность Г.В. Генераловой и О.В. Захаровой за техническую поддержку.

Development of naked *Triticum durum* × *Triticum dicoccum* hybrids with anthocyanin color of the grain pericarp

E.I. Gordeeva ¹ , A.Yu. Novoselskaya-Dragovich ², O.Yu. Shoeva ¹, E.K. Khlestkina ^{1,3}¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia² N.I. Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia³ Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia elgordeeva@bionet.nsc.ru

Abstract. The production of emmer hybrids with a high content of anthocyanins in the grains for the production of functional foods is a promising breeding direction. Phenotyping and preliminary assessment of the inheritance of gliadin-coding genes were performed for the most promising purple-grained emmer hybrids obtained previously after a complex three-stage crossing of purple-grained durum wheat (*T. durum* Desf.) with two different forms of spring emmers (*T. dicoccum* Schrank): the hybrid naked-grained variety Gremme and the red-grained awnless mutant line k25516. Genotyping hybrids for the storage protein genes in wheat grain, gliadins (*Gli*), enabled the selection of a purple-grained line that fully inherited gliadin-coding genes from emmer wheat k-25516, and a line inheriting these genes from durum wheat and emmer wheat k-25516. To improve the breeding material, backcrossing of three phenotypically and qualitatively different purple-grained hybrid lines with the parental variety Gremme, which demonstrated the highest yield, was conducted. During the *Pp* (*Purple pericarp*) genes selection of the plants in F_{2-3} progenies, the use of microsatellite markers located close to *Pp* genes did not demonstrate reliable linkage to the target genes. The intragenic polymorphic PCR markers made it possible to accurately select plants carrying dominant alleles of two complementarily interacting genes, *Pp-B1* and *Pp3* in F_{2-4} . Based on the ease of grain threshing, the plants were selected in F_4 . Thus, over two years, using small areas of the greenhouse and marker-controlled selection, a collection consisting of 25 naked and semi-naked spring purple-grained lines of wheat-emmer hybrids, constant in anthocyanin coloration and differing in gliadin-coding genes and other quality traits, was obtained.

Key words: naked emmer; purple grain; anthocyanins; gliadins; marker assisted breeding; PCR markers

For citation: Gordeeva E.I., Novoselskaya-Dragovich A.Yu., Shoeva O.Yu., Khlestkina E.K. Development of naked *Triticum durum* × *Triticum dicoccum* hybrids with anthocyanin color of the grain pericarp. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(4):645-657. doi 10.18699/vjgb-26-65

Введение

Фиолетовая окраска зерновки у злаков определяется антоцианами, относящимися к классу флавоноидных соединений. Многочисленными исследованиями показано, что антоцианы положительно влияют на здоровье человека, обладая антиоксидантными, противовоспалительными, гипогликемическими, антимуtagenными свойствами (Liu et al., 2021; Dwivedi et al., 2022; Mohammadi, 2024). Антоцианы зерновки пшеницы оказывают профилактическое действие в отношении опухолевых и нейродегенеративных заболеваний (Tikhonova et al., 2020, 2024; Geyik et al., 2023).

Селекционную привлекательность представляют программы по созданию злаков с фиолетовой окраской зерен для использования их в качестве источника для производства обогащенных высококачественных крупяных продуктов и макаронных изделий. Одним из перспективных кандидатов для такого питания является полба (эммер, двузернянка, *Triticum dicoccum* Schrank, геном ВВАА, $2n = 28$) – старинный пленчатый вид пшеницы, зерно которой традиционно использовалось в приготовлении каш. Полба была вытеснена более урожайной голозерной твердой пшеницей из-за трудности обмолота и низкой урожайности и как возделываемая культура сохранилась в ограниченных регионах Поволжья, Сибири и Северного Кавказа (Badaeva, 2015).

В настоящее время возрастающий интерес к полбе объясняется ее более высокими питательными свойствами, генетической изменчивостью и широкой экологической пластичностью (Гилев и др., 2018; Viradar et al., 2022). Она легко усваивается организмом и превосходит современные культурные твердую и мягкую пшеницу по содержанию растительного белка, ненасыщенных жирных кислот, клетчатки, железа, цинка, витаминов группы В, накапливая в зерновке больше антиоксидантов, что делает ее важным компонентом здорового питания (Захарова, Толстова, 2019; Şahin, Karakas, 2022; Cabas-Lühmann et al.,

2023; Темирбекова и др., 2024). Ее можно использовать в качестве источника в селекции пшеницы с повышенными питательными качествами. Ряд образцов полбы устойчив к возбудителям заболеваний, что делает возможным выращивать растения без применения каких-либо опасных для здоровья человека химикатов и синтетических удобрений (Зверев и др., 2016; Кузнецова и др., 2020; Viradar et al., 2022).

Одно из основных препятствий для практического использования полбы – это сложность отделения зерна от оболочек. Селекционеры в последние годы сосредоточили свои усилия на создании сортов, у которых зерновка легко отделяется от колосковой и цветковой оболочек, т.е. характеризуется более легким обмолотом. Эти новые формы двузернянки предложено классифицировать как подвид *Triticum dicoccon* (Schrank) Schübl. subsp. *nudicoccon* Kobyl. et Smekal. (Смекалова, Кобылянский, 2019).

Фиолетовозерные пшеницы были получены ранее методами классической гибридизации и отбора от тетраплоидного вида *T. aethiopicum* Jakubz. из Эфиопии (геном ВВАА, $2n = 28$) (Zeven, 1991). Признак фиолетовой антоциановой окраски перикарпа пшеницы хорошо изучен и контролируется комплементарно взаимодействующими регуляторными генами биосинтеза антоцианов *Pp-B1* – в хромосоме 7В и *Pp3* – в хромосоме 2А у тетраплоидных видов и генами *Pp-D1* – в хромосоме 7D и *Pp3* – в хромосоме 2А у гексаплоидных видов (Khlestkina et al., 2010; Tereshchenko et al., 2012). При гибридизации гексаплоидной пшеницы *T. aestivum* L. (геном ВВААDD, $2n = 42$) и последующем отборе гибридов с помощью молекулярных маркеров, тесно сцепленных с данными генами, можно легко контролировать участки ДНК, несущие доминантные аллели генов фиолетовой окраски перикарпа зерновки (Gordeeva et al., 2020). Нами разработаны диагностические внутригенные ДНК-маркеры ключевых регуляторных генов биосинтеза антоцианов в зерновках: *Pp1-diagnostic* и *Pp3-diagnostic* (Шоева и др., 2022; Гордеева и др., 2023). Эти

Таблица 1. Родословная образцов, используемых для гибридизации, и их характеристика

Образец	Образец/ родословная	Характеристика признаков	Источник происхождения (литературный источник)
1	<i>T. durum</i> образец Tri15744	Фиолетовозерная, раннеспелая, короткостебельная, остистые колосья, голозерная, твердая пшеница	Коллекция ИПК, Gatersleben
2	Сорт Греммэ = <i>T. dicoccum</i> сорт Белка *3/ <i>T. durum</i> сорт Светлана	Белозерный полбоид, раннеспелый, длинностебельный (среднерослый), остистые колосья, голозерный	Чистопольский ГСУ, Татарстан
3	к-25516 <i>T. dicoccum</i> Schrank Schuebl. convar. <i>serbicum</i> Zakharova	Краснозерная двузернянка, длинностебельная, средне-спелая, красно-рыжие стебель и колос, пленчатые зерна, безостый мутант, отобранный из полевой популяции	Коллекция ВИР, (Волго-Балканская полба)
4	27-15/8 F ₉ (Tri15744/Греммэ//к-25516)	Фиолетовозерный, раннеспелый, длинностебельный, безостые колосья, полупленчатый гибрид	ИЦиГ СО РАН (Стёпочкин и др., 2023)
5	27-3 F ₈ (Tri15744/Греммэ/*2 к-25516)	Фиолетовозерный, среднеспелый, длинностебельный, остистые колосья, полупленчатый гибрид	
6	31-16/6 F ₈ (Tri15744/Греммэ/*2 к-25516)	Фиолетовозерный, раннеспелый, короткостебельный, безостые колосья, полуголозерный гибрид	

маркеры были успешно применены в процессе создания новых фиолетовозерных форм пшеницы с повышенными функциональными свойствами (Гордеева и др., 2023).

Несмотря на достижения в селекции гексаплоидной пшеницы (Фисенко и др., 2020; Василова и др., 2021; Рубец и др., 2022; Шаманин и др., 2024), в стране отсутствуют тетраплоидные сорта твердой пшеницы с высоким содержанием антоцианов. Методом многоступенчатой гибридизации двух различных форм яровой полбы на основе тетраплоидной твердой пшеницы, накапливающей антоцианы в перикарпе зерновки, с помощью маркер-ориентированной селекции нами созданы фиолетовозерные полуголозерные гибриды (Стёпочкин и др., 2023). Однако основные недостатки новых гибридов включают неполную обмолачиваемость зерна из цветковых и колосковых чешуй, ломкость колосового стержня и низкую урожайность. Пленчатые зерна полбы трудно обмолачивать без повреждения внешних оболочек, содержащих основные запасы антоциана. Кроме того, этот недостаток резко снижает селекционную ценность таких образцов. Поэтому создание линий полбы, обладающих голозерностью и более легким обмолотом, без повреждения целостности зародыша и внешней оболочки зерна является актуальной задачей, позволяющей сохранить полезные свойства полбы с антоциановым перикарпом.

В 2012 г. в Госреестр (<http://reestr.gossort.com/reestr/sort/9052467>) включен выведенный в Татарстане яровой полбоид – сорт Греммэ, для которого характерна голозерность. Сорт получен от межвидового скрещивания полбы *T. dicoccum* Schrank сорт Белка с твердой пшеницей *T. durum* Desf. сорт Светлана с последующими возвратными скрещиваниями на полбу (Темирбекова и др., 2020) и может служить исходным материалом для создания голозерных гибридов полбы.

Цель настоящей работы – получение новых, более высокопродуктивных голозерных пшенично-полбяных гибридов, имеющих повышенное содержание антоцианов в перикарпе зерновки. Для этого были проведены выборочная оценка содержания белков клейковины у полученных

ранее пшенично-полбяных гибридов и их родителей и скрещивание выбранных перспективных образцов с голозерным сортом Греммэ и с последующим маркер-контролируемым отбором фиолетовозерных растений.

Материалы и методы

Растительный материал и схема скрещивания. В работе были использованы новые линии пшенично-полбяных гибридов, полученные от сложных насыщающих скрещиваний растений фиолетовозерной тетраплоидной пшеницы *T. durum* Tri15744 с полбоидом Греммэ и далее с краснозерной полбой *T. dicoccum* к-25516 в Институте цитологии и генетики СО РАН (Стёпочкин и др., 2023). Образцы пшеницы, используемые в гибридизации, и источники их происхождения представлены в табл. 1. Полная схема скрещивания приведена на рис. S1 Приложения¹.

Для получения полностью голозерных более урожайных растений на трех контрастных образцах из полученных нами ранее гибридов (№ 4, 5, 6, см. табл. 1) с наибольшим содержанием антоцианов в зерновках были проведены прямые и обратные беккроссы с голозерным полбоидом Греммэ, показавшим самую высокую продуктивность при выращивании в полевых условиях (Стёпочкин и др., 2023). Номера 4 и 6 были отобраны среди раннеспелых фиолетовозерных образцов после генотипирования генов запасных белков – глиадинов. Растения среднеспелого номера 5 показали самое большое суммарное содержание антоцианов в зерновках после полевого выращивания 2019 г. (Стёпочкин и др., 2023).

После беккроссирования в поколениях F₂ и F₃ проведено отбор фиолетовозерных гибридов, гомозиготных по ключевым генам биосинтеза антоцианов в перикарпе зерновок, с помощью фенотипических и молекулярных маркеров.

Генотипирование по генам запасных белков. Генотипирование гибридов в процессе получения селекционного материала проводили по генам (*Gli*) запасных белков

¹ Рис. S1–S5 Приложения см. по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx35.pdf>

зерна пшеницы – глиадином. Глиадинкодирующие гены (ГКГ) характеризуются множественным аллелизмом, позволяющим распознавать генотипы, и локализируются в двух из семи хромосом геномов А и В (локусы *Gli-A1*, *Gli-A2*, *Gli-B1*, *Gli-B2* на хромосомах 1А, 6А, 1В, 6В соответственно). Для выявления аллелей глиадинкодирующих генов применяли методику электрофореза глиадина отдельных зерновок в полиакриламидном геле (ПААГ) в кислом алюминий-лактатном буфере (рН 3.2) (Лабораторный анализ..., 2013).

В электрофоретическом спектре каждой зерновки, согласно каталогу (Melnikova et al., 2012), выявлены группы полипептидов, контролируемые разными аллелями глиадинкодирующих генов. Анализировали по 3–5 зерен с растения. Для каждой постановки анализировалось гомо- или гетерозиготное состояние аллелей по изучаемым генам, а также от каких родителей данные аллели унаследованы.

Посев, фенотипирование и генотипирование гибридного материала. Выращивание растений и гибридизацию осуществляли в гидропонной теплице ЦКП «Лаборатория искусственного выращивания растений» и опытных полях ИЦиГ СО РАН (55°02'N, 82°56'E). В поколениях F₂ и F₃ проводили отбор с использованием фенотипических маркеров антоциановой окраски вегетативных и генеративных частей растений и при помощи генотипирования ДНК растений с применением ПЦР-маркеров.

Темно-красная окраска колеоптиля использовалась в качестве визуального фенотипического маркера доминантного функционального гена *Pp-B1* (Khlestkina et al., 2008). Оценку окраски колеоптиля у замоченных в чашках Петри 4–5-дневных проростков выполняли перед посадкой в грунт. Фиолетовая окраска зерновок использовалась в качестве фенотипического маркера комплементарного взаимодействия одновременно двух ключевых доминантных генов, *Pp-B1* и *Pp3* (Tereshchenko et al., 2012). Визуальную

оценку окраски перикарпа у созревших зерен изучаемых растений проводили после сбора урожая.

Генотипирование ДНК и молекулярные маркеры. ДНК извлекали из молодых листьев растений по методике, описанной J. Plaschke с коллегами (1995). Для анализа выделенной ДНК гибридов и их родительских форм использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с внутривидными маркерами, разработанными к генам биосинтеза антоцианов *Pp-1* и *Pp3*, а также сцепленными с этими генами микросателлитными маркерами (табл. 2, рис. S2).

Для определения замещения участков хромосом и межсортового наследования хромосомных перестроек у гибридов применяли полиморфные SSR-маркеры (simple sequence repeats), выбранные из группы микросателлитных маркеров, сцепленных с геном *Pp3* на хромосоме 2А, – маркер *Xgwm0312* и с геном *Pp-B1* на хромосоме 7В – маркеры *Xgwm0046*, *Xgwm0400*, *Xgwm0537* (Gatersleben Wheat Marker) (Röder, 1998; Khlestkina et al., 2008; Гордеева и др., 2023). Соблюдали условия ПЦР, указанные в работе (Röder et al., 1998). Продукты ПЦР разделяли в 5 % HR (High resolution) агарозном геле высокого разрешения “HyAgarose™ HR Agarose” (ACTGene, Inc., Piscataway, NJ, США).

Для отбора растений тетраплоидной пшеницы, несущих доминантные аллели, вместе с микросателлитами, сцепленными с ключевыми генами *Pp*, в работе использовали аллель-специфические диагностические маркеры, амплифицирующие продукты ПЦР разной длины.

Разработанный нами ранее внутривидный аллель-специфичный ПЦР-маркер *Pp3-diagnostic* четко выявляет доминантные и рецессивные аллели гена *Pp3* у тетра- и гексаплоидных форм пшеницы, что позволяет отобрать доминантные аллели этого гена в гомозиготном состоянии (Шоева и др., 2022). Ранее в промоторе доминантного функционального аллеля гена *Pp3* было идентифициро-

Таблица 2. Используемые в работе молекулярные маркеры

Маркер	Локализация в хромосоме	Т отжига, °С	Структура прямого и обратного праймеров (литературный источник)	Размеры продуктов ПЦР, п. н.
<i>Pp3-diagnostic</i>	2А	Tdn 65–56	5'-TAGTGCCGTCTAACTGGTGA-3' 5'-ACGACGCCTAAGGAAACAC-3' (Шоева и др., 2022)	429/398
<i>Xgwm0312</i>	2А	60	5'-ATCGCATGATGCACGTAGAG-3' 5'-ACATGCATGCCTACCTAATGG-3' (Röder et al., 1998)	~200/230/300
<i>Pp1-diagnostic</i>	7В	Tdn 65–56	5'-ATGGGGAGGAGGGCGT-3' 5'-TGCCGAGCGTGCTGT-3' (Гордеева и др., 2023)	478/434
<i>Xgwm0046</i>	7В	60	5'-GCACGTGAATGGATTGGAC-3' 5'-TGACCCAATAGTGGTGTCA-3' (Röder et al., 1998)	~180/190
<i>Xgwm0400</i>	7В	60	5'-GTGCTGCCACCACTTGC-3' 5'-TGTAGGCACTGCTTGGGAG-3' (Röder et al., 1998)	~150/160/180
<i>Xgwm0537</i>	7В	60	5'-ACATAATGCTTCCTGTGCACC-3' 5'-GCCACTTTGTGTCGTTCT-3' (Röder et al., 1998)	~225/230

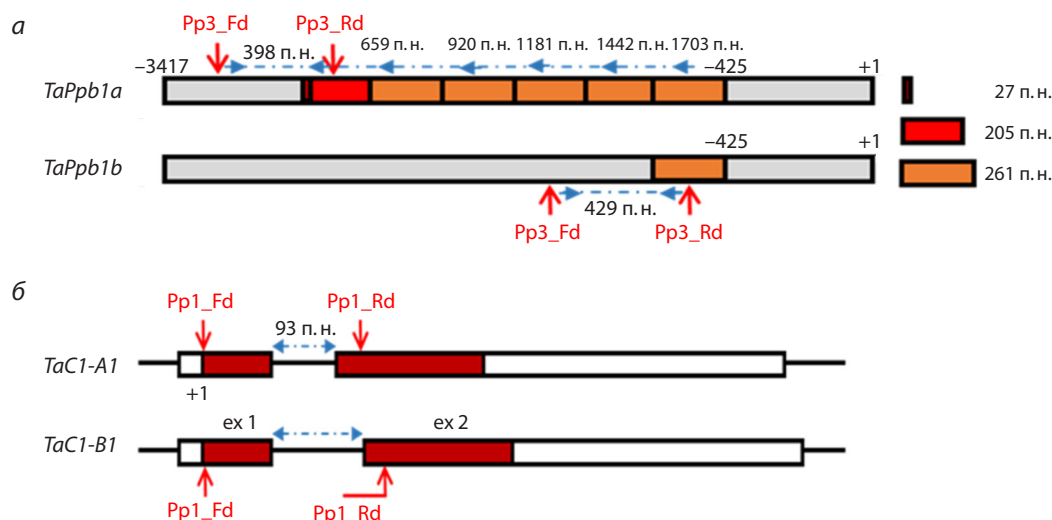


Рис. 1. Дизайн внутригенных ПЦР-маркеров для ДНК генов *Pp3* и *Pp1*.

а – в промоторной области функционального *TaPpb1a* (номер MG066455 в базе данных NCBI) и нефункционального *TaPpb1b* (номер MG066456 в базе данных NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) аллелей по гомологии с нуклеотидной последовательностью гена *Pp3* (номер в базе данных NCBI: KJ747954). Оранжевым и красным цветом показаны 261-нуклеотидные повторы его части; б – схема последовательностей нефункционального и функционального аллелей *Pp-A1* и *Pp-B1* (син. *TaC1-A1* и *TaC1-B1*; (Himi, Taketa, 2015)) на хромосомах 7А и 7В соответственно. Функциональный аллель *Pp-B1* имеет более протяженный участок единственного интрона между двумя экзонами, на 28 пар нуклеотидов превышающий соответствующий участок нефункционального аллеля *Pp-A1* (голубые стрелки). Красными стрелками указаны места связывания ПЦР-праймеров маркеров *Pp3-diagnostic* и *Pp1-diagnostic*.

вано шесть тандемных повторов по 261 нуклеотиду; в рецессивном нефункциональном аллеле у сортов белозерной и краснозерной пшеницы обнаружен только один такой повтор (Jiang et al., 2018).

С помощью программы PrimerQuest™Tool специфические олигонуклеотидные праймеры были созданы таким образом, что прямой праймер Pp3_Fd отжигается на область промотора до начала повторенных участков, отличающихся по длине и количеству между доминантными и рецессивными аллелями, а обратный праймер Pp3_Rd – на 261-нуклеотидный повтор. Благодаря наличию усеченных фрагментов в 27 и 205 нуклеотидов ПЦР-продукты, получаемые с помощью разработанных праймеров, отличаются по длине у доминантного и рецессивного аллелей и составляют 398 и 429 пар нуклеотидов соответственно (рис. 1, а).

Праймеры внутригенного ПЦР-маркера *Pp1-diagnostic* фланкируют с двух сторон вариабельный по длине ДНК единственный интрон гена *Pp-B1*, что позволяет одновременно выявлять как доминантный аллель гена *Pp-B1*, так и рецессивные нефункциональные аллели *pp-A1* и *pp-B1* (см. рис. 1, б). Этот маркер создан с применением известных нуклеотидных последовательностей аллелей гена *Rc* (*red coleoptile*, синоним гена *Pp*), выделенных из пшеницы сорта Chinese Spring и фиолетовозерной изогенной линии сорта Новосибирская 67 (Himi, Taketa, 2015).

Диагностические праймеры ПЦР-маркера *Pp1-diagnostic* были сконструированы таким образом, что прямой праймер Pp1_Fd отжигался с начала 1-го экзона как у функционального, так и у нефункционального аллеля, а обратный праймер Pp1_Rd – на расстоянии 161 нуклеоти-

дов от начала 2-го экзона. За счет разницы длины участков интрона ПЦР-продукты, получаемые с помощью разработанных нами праймеров, отличались по длине между нефункциональным и функциональным аллелями и составляли 472 и 434 нуклеотида соответственно.

Рецессивные аллели *pp-B1* на хромосоме 7В по длине маркерных продуктов ПЦР не отличались от нефункциональных аллелей *pp-A1*. При этом для проведения ПЦР-анализа использовали стандартную ДНК-полимеразу; для разделения продуктов ПЦР применяли 2 % агарозный гель (LE Agarose, Lonza Rockland, Inc., Rockland, ME, США), приготовленный на ТАЕ-буфере (40 мМ Трис-НСl pH 8.0, 20 мМ ацетат натрия, 1 мМ ЭДТА) с добавлением бромистого этидия.

Стандартом служил маркер длины фрагментов ДНК 100 bp (ООО «Лаборатория МЕДИГЕН», Россия). Электрофорез проводили в горизонтальной камере в течение 1–5 ч при напряжении 7 В/см. Визуализацию в УФ-свете и анализ изображений осуществляли с помощью системы документации гелей “Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System” (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, США).

Результаты

Отбор гибридных родительских растений по глиадинкодирующим генам

Первоначально были исследованы родительские линии: *T. durum*, образец Tri15744, сорт Гремме, а также *T. dicoccum* к-25516, определены аллели ГКГ по каждому из локусов. Спектры родительских образцов отличались между собой, т. е. контролировались разными аллель-

Таблица 3. Характеристика гибридных растений полбы с твердой пшеницей по наследованию глиадинов от родительских форм

Растение	<i>Gli-A1</i> (хромосома A1S)	<i>Gli-B1</i> (хромосома B1S)	<i>Gli-A2</i> (хромосома A6S)	<i>Gli-B2</i> (хромосома B6S)
Гибрид 27-15/3	к-25516	к-25516	Греммэ	к-25516
Гибрид 27-15/4				
Гибрид 27-15/8*			к-25516	
Гибрид 27-15/10			Греммэ	
Гибрид 31-16/6	Tri15744		к-25516	Tri15744
Гибрид 31-19/3	к-25516		Греммэ	к-25516
Гибрид 31-19/4				
Гибрид 31-19/5				

* Наследование аллелей всех четырех глиадинкодирующих локусов от полбы *T. dicoccum* к-25516.

ными вариантами глиадинкодирующих генов, и были гомогенны – каждый образец имел один спектр. При электрофоретическом анализе гибридного материала эти образцы использовались как эталоны, необходимые для точного определения принадлежности блока компонентов (аллельного варианта того или иного локуса) одному из трех родительских образцов.

Для генотипирования растений по ГКГ было отобрано по 10 растений из трех раннеспелых фиолетовозерных гибридных линий: линия 27-12, полуголозерная, все колосья обычные, безостые; линия 31-16, полуголозерная, колосья с рудиментарными остями вверху колоса; линия 31-19, полуголозерная, колосья с остистым верхом (Стёпочкин и др., 2023). От каждого растения анализировали по 3–5 зерен. Конечные результаты исследования представлены в табл. 3.

Мы не привели генетические формулы по глиадинам, так как твердая пшеница и полба имеют разные номенклатуры – разные каталоги блоков компонентов, в которых одними и теми же буквами обозначены разные блоки. Каталоги еще не сведены в единую систему, поэтому, чтобы быть абсолютно точными, по каждому локусу назван родитель, от которого унаследован тот или иной блок компонентов/аллельный вариант глиадинкодирующего локуса.

В первую очередь отбирались растения, наследующие глиадинкодирующие гены от полбы к-25516, а во вторую – от полбоида сорт Греммэ. Только одно гибридное растение, 27-15/8 (в табл. 3 выделено * № 4), унаследовало все четыре глиадинкодирующих локуса от безостой полбы *T. dicoccum* к-25516. Гибридное растение 31-16/6 (№ 6 в настоящей работе) унаследовало локусы *Gli-B1* и *Gli-A2* от безостой полбы, а локусы *Gli-A1* и *Gli-B2* – от тетраплоидной пшеницы *T. durum* Tri15744. Растения линии 31-19 унаследовали три локуса (*Gli-A1*, *Gli-B1* и *Gli-B2*) от безостой полбы и один (*Gli-A2*) – от полбоида сорта Греммэ.

Отбор по фенотипическим признакам

Помимо фиолетовой окраски перикарпа зерновок, у растений гибридных линий наблюдалось интенсивное окрашивание колеоптиля и стеблей (рис. 2).



Рис. 2. Фотография стеблей, колосков и зерновок родительских линий и раннеспелых гибридов, отобранных для возвратного скрещивания с сортом Греммэ.

1 – фиолетовозерная *T. durum* Tri15744; 2 – белозерный полбоид сорт Греммэ; 3 – краснозерная полба *T. dicoccum* к-25516; 4 – гибрид № 27-15/8 (родословная: Tri15744/Греммэ//*2 к-25516); 6 – гибрид № 31-16/6 (Tri15744/Греммэ//к-25516).

По фенотипическим признакам растения линии 27-15/8 (№ 4 на рис. 2) были похожи на полбу к-25516 (№ 3) с длинными при созревании красными стеблями и безостыми красными колосьями. Плоские колоски содержали две темно-фиолетовые полупленчатые труднообмолачиваемые зерновки.

Низкорослые растения линии 31-16/3 (№ 6 на рис. 2) по фенотипическим признакам имели рудиментарные ости вверху компактных булавовидных ломких колосьев и почти голозерные.

Высокорослые тонкостебельные растения линии 31-19 по фенотипическим признакам имели рудиментарные ости вверху компактных булавовидных ломких колосьев и почти голозерные. Отрицательный признак – полегаемость

и не самое высокое значение содержания антоцианов в зерновках (39.7 мкг/г) в сравнении с донором *T. durum* Tri15744 (68.4 мкг/г) (Стёпочкин и др., 2023) не позволили нам продолжить работу с растениями данной линии.

Более позднеспелые белоколосые растения линии 27-3 в полевых условиях 2019 г. показали самый высокий процент содержания антоцианов в зерновках (82.5 мкг/г) (Стёпочкин и др., 2023) и были также выбраны для бек-кроссирования с высокоурожайным голозерным сортом Греммэ.

Отбор по окраске колеоптиля

Предварительная фенотипическая (визуальная) оценка окраски колеоптиля у родительских растений показала, что проростки безостой полбы к-25516, как и тетраплоидной линии-донора *T. durum* Tri15744, обладали ярко выраженной антоциановой окраской колеоптиля, что соответствовало наличию в данных линиях доминантных аллелей гена *Pp-B1* (рис. S3). Белозерный сорт Греммэ имел слабоокрашенный колеоптиль, сходный с таковым у гексаплоидной пшеницы сорта Саратовская 29, связанной с присутствием доминантных аллелей гена *Pp-A1*, очень слабо влияющих на биосинтез антоцианов в зерновке (Gordeeva et al., 2015).

После прямого и обратного скрещивания пленчатых и полупленчатых пшенично-полбяных гибридов с остистым голозерным сортом Греммэ растения поколения F₁ самоопылялись. По 60 зерен от растений F₁ из каждой комбинации скрещивания замачивали для прорастания в чашках Петри. В поколении F₂ после скрещивания с

сортом Греммэ, несущим рецессивный аллель гена *Pp-B1* и, как следствие, не проявляющим яркую антоциановую окраску колеоптиля, первоначально была проведена визуальная оценка окраски проростков. После прорастания зерновок гибридов F₂ на 4–5-й дни для посадки в грунт отбраковали непроросшие зерна и проростки с бесцветным колеоптилем. Для посева отбирали только проростки с антоциановым цветом колеоптиля.

Отбор с помощью молекулярных маркеров

У тетраплоидной пшеницы *T. durum* Tri15744 биосинтез антоцианов в перикарпе контролируется комплементарно взаимодействующими генами *Pp3* на хромосоме 2A и *Pp-A1/B1* – на хромосоме 7A или 7B.

Первоначально было проведено тестирование SSR-маркеров на ДНК, выделенной из листьев родительских образцов фиолетовозерных пшенично-полбяных гибридов. Микросателлитные маркеры *Xgwm0046* и *Xgwm0537*, близко расположенные к целевому гену *Pp-B1* на хромосоме 7B, не показали различий между продуктами ПЦР образцов полбы к-25516 с окрашенным колеоптилем и сорта Греммэ с неокрашенным колеоптилем, а, следовательно, разными аллелями *Pp-B1* – доминантным и рецессивным (рис. 3, а, б). По результатам ПЦР-анализа с полиморфным маркером *Xgwm0400* отобранные нами для скрещивания с сортом Греммэ все три гибридные линии (№ 4, 5, 6 в табл. 1) наследовали доминантные аллели *Pp-B1* только от полбы к-25516 (см. рис. 3, в). Для генотипирования ДНК гибридов в поколении F₂ нами был отобран полиморфный маркер *Xgwm0400*. И далее для более точного отбора фио-

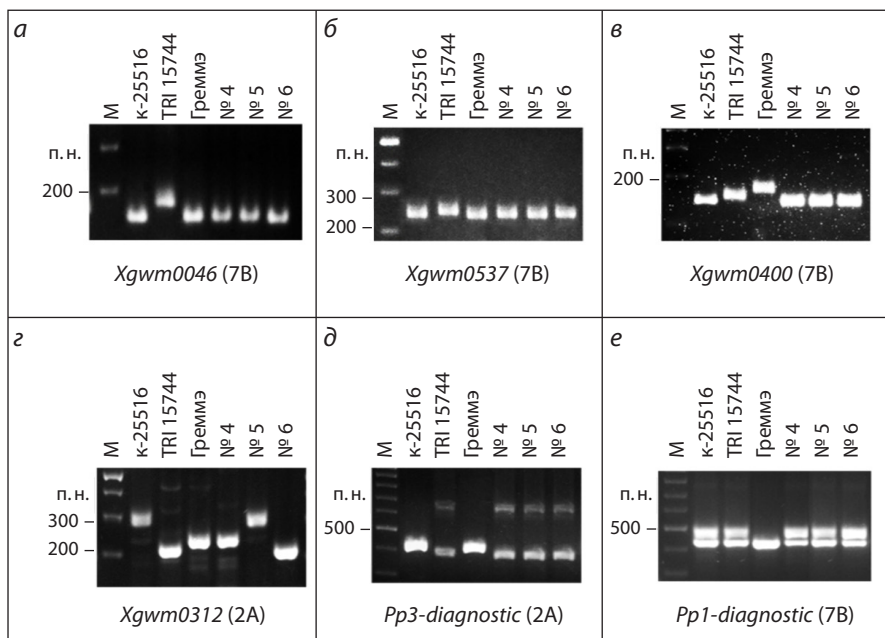


Рис. 3. Электрофореграммы продуктов ПЦР, полученных с помощью микросателлитных маркеров, сцепленных с генами *Pp-B1* и *Pp-3* на хромосоме 7B и 2A соответственно, на 5 % агарозном геле (а–с). Электрофореграммы продуктов ПЦР, полученных с помощью внутригенных ПЦР-маркеров, к генам *Pp-3* и *Pp-B1* на хромосоме 2A и 7B соответственно, на 2 % агарозном геле (д, е).

№ 4, 5, 6 – продукты ДНК-гибридов, выбранных для скрещивания с сортом Греммэ; М – маркер длины.

Таблица 4. Анализ ДНК растений в F₂ от скрещивания гибридов с сортом Греммэ

Образец, №	Прямое скрещивание		Обратное скрещивание	
	Количество образцов в анализе	Гомозиготные образцы (<i>Pp-B1*</i> + <i>Pp3</i>)	Количество образцов в анализе	Гомозиготные образцы (<i>Pp-B1*</i> + <i>Pp3</i>)
4	24	0	14	2
5	18	0	14	0
6	13	2	18	1 (стерильное)
Всего		2		3

* Маркером для выявления гомозиготных аллелей *Pp-B1* служил SSR-маркер *Xgwm400*.

Таблица 5. Анализ ДНК растений в F₃ от скрещивания гибридов с сортом Греммэ

Образец, №	Прямое скрещивание		Обратное скрещивание	
	Количество образцов в анализе	Гомозиготные образцы (<i>Pp-B1*</i> + <i>Pp3</i>)	Количество образцов в анализе	Гомозиготные образцы (<i>Pp-B1*</i> + <i>Pp3</i>)
4	42	6	47	5
5	53	5	28	5
6	63	11	20	3
Всего		22		13

* Маркером для выявления гомозиготных аллелей *Pp-B1* служил *Pp1-diagnostic*.

летовозерных гибридов в поколении F₃ был использован внутригенный ПЦР-маркер *Pp1-diagnostic* (см. рис. 3, е).

Тестирование микросателлитного маркера *Xgwm0312*, сцепленного с геном *Pp3* на хромосоме 2А генома тетраплоидной пшеницы, выявило значительный полиморфизм и несоответствие между продуктами ПЦР фиолетовозерных родительских образцов и линии-донора функционального гена *Pp3 T. durum* Tri15744 (см. рис. 3, з). Поэтому отбор гомозиготных фиолетовозерных образцов гибридов в поколениях F₂ и F₃ проводили с помощью разработанного нами ранее полиморфного внутригенного ПЦР-маркера *Pp3-diagnostic* (см. рис. 3, д).

После оценки цвета колеоптиля и зерен растений поколения F₂ в трех парах комбинаций прямого и обратного скрещивания среди 113 проанализированных с помощью молекулярного анализа растений нам удалось отобрать пять фиолетовозерных образцов, содержащих одновременно два доминантных аллеля генов *Pp-B1* и *Pp3* (табл. 4). Из них зерна одного растения оказались нежизнеспособными.

Из 24 созревших растений F₂ от скрещивания гибрида № 4 с белозерным сортом Греммэ не нашли ни одного темно-фиолетовозерного растения, несущего гомозиготные маркеры сразу по двум функциональным генам, *Pp-B1* и *Pp3*, где продукты ПЦР соответствовали только № 4. Из 14 растений F₂ от обратного скрещивания сорта Греммэ с гибридом полбы № 4 нашли два растения с темно-фиолетовыми зернами, несущими гомозиготные маркеры сразу по двум функциональным генам, *Pp-B1* и *Pp3*. Данные растения (7 и 14) (рис. S4) имели рыхлые колосья с 5 и 2 зернами, посеянными для дальнейшего размножения.

Таким образом, в поколении F₂ в трех парах комбинаций прямого и обратного скрещивания с помощью молекулярного анализа нам удалось отобрать только два жизнеспособных растения с темно-фиолетовыми зернами,

гомозиготными сразу по двум доминантным генам, *Pp-B1* и *Pp3*, от скрещивания белозерного сорта Греммэ с гибридом полбы № 4 и два растения от скрещивания гибридов полбы № 6 с сортом Греммэ (см. табл. 4).

Для посадки поколения F₃ и дальнейшего анализа отобрали темно-фиолетовые зерна от растений, представляющих собой три группы:

- 1) с гомозиготными доминантными аллелями *Pp3* и гетерозиготными по SSR-маркеру *Xgwm400*, сцепленному с геном *Pp-B1*;
- 2) с доминантными аллелями *Pp3*, находящимися в гетерозиготном состоянии и гомозиготными по маркеру *Xgwm400*;
- 3) высокопродуктивные растения, гетерозиготные как по аллелям *Pp3*, так и по маркеру *Xgwm400*.

Для контроля и дальнейшего изучения были отобраны и высажены семена белозерного растения с рецессивными аллелями *Pp3* и гомозиготным доминантным SSR-маркером *Xgwm400*, сцепленным с геном *Pp-B1*, а также семена белозерного растения с гомозиготными доминантными аллелями *Pp3* и гомозиготным рецессивным SSR-маркером *Xgwm400*. Фенотипический и молекулярный анализ растений был продолжен в поколении F₃ (табл. 5).

В первой комбинации скрещивания гибрида полбы № 4 с сортом Греммэ из 42 гибридов с помощью внутригенных молекулярных маркеров *Pp3-diagnostic*, *Pp1-diagnostic* и SSR-маркера *Xgwm0400*, сцепленного с геном *Pp-B1*, было отобрано шесть темно-фиолетовозерных растений, гомозиготных по гену *Pp3*, несущих маркер доминантного функционального аллеля *Pp-B1* (продукты ПЦР соответствовали № 4) (рис. S5). Было замечено, что одно растение с темно-фиолетовыми зернами имело рецессивные продукты ПЦР SSR-маркера *Xgwm400*, сцепленного с геном *Pp-B1*, от сорта Греммэ, и доминантные продукты ПЦР

внутригенного маркера *Pp1-diagnostic* (см. рис. S5). Этот факт свидетельствует о неполном сцеплении микросателлитного маркера с целевым геном и о существовании горячей рекомбинационной точки, находящейся между геном *Pp-B1* и SSR-маркером *Xgwm400*.

В обратной комбинации скрещивания сорта Гремме с линией № 4 в F₃ по результатам фенотипического и молекулярного анализа из 47 гибридных образцов было отобрано 5 темно-фиолетовозерных растений, гомозиготных по гену *Pp3*, несущих маркер доминантного аллеля *Pp-B1* (продукты ПЦР соответствовали № 4). В данной комбинации скрещивания отмечено одно белозерное растение с гомозиготными доминантными аллелями *Pp3* и гомозиготное по SSR-маркеру *Xgwm400*, сцепленному с геном *Pp-B1*, однако не имеющее продукт ПЦР-маркера *Pp1-diagnostic*, соответствующего доминантному аллелю *Pp-B1* (продукты ПЦР, как у № 4). Это свидетельствует о произошедшей рекомбинации на участке хромосомы 7В между геном *Pp-B1* и SSR-маркером *Xgwm400*.

Таким образом, с помощью молекулярного анализа в поколении F₃ суммарно было отобрано 35 образцов темно-фиолетовозерных растений, гомозиготных по генам *Pp3* и содержащих доминантный аллель *Pp-B1* (см. табл. 5). Зерна от 29 продуктивных растений были высажены в открытом грунте и дали начало новым фиолетовозерным линиям. В поколении F₄ у 4 из 29 отобранных нами линий среди растений отмечено расщепление по признаку фиолетовой/белой окраски зерновок (в трех линиях семейства наследования от № 5, в одной линии – от № 6), что свидетельствовало о гетерозиготном состоянии доминантного аллеля гена *Pp-B1* у родительских образцов в поколении F₃. Остальные 25 линий пшенично-полбяных гибридов были константными по признаку фиолетовой окраски зерновок, из которых семь линий имели жесткие колосковые чешуи и трудно обмолачивались. Полученные нами фиолетовозерные гибридные линии F₄, посеянные в открытом грунте, были изучены по морфологическим и хозяйственно ценным признакам. Данные исследования выходят за рамки настоящей работы.

Время, затраченное на работы по скрещиванию растений и отбору соответствующих гибридов, составило два года: три тепличных вегетации и две вегетации в открытом грунте.

Обсуждение

Обогащение генетического материала тетраплоидной пшеницы новыми уникальными характеристиками, связанными с накоплением антоцианов в зерновках и давно забытыми видами полбы с хозяйственно ценными свойствами, позволяет расширить производство и улучшить ассортимент полезных продуктов питания.

Глиадинкодирующие гены

В настоящей работе изучались пшенично-полбяные гибриды, полученные ранее после насыщающих скрещиваний, с целью увеличения генетического материала полбы совместно с признаком голозерности.

Генотипирование гибридов в процессе получения селекционного материала проводили по генам (*Gli*) запасных белков зерна – глиадинам. Глиадины контролируются четырьмя основными несцепленными локусами на хромосомах 1- и 6-й гомеологической группы: *Gli-A1*, *Gli-A2*, *Gli-B1*, *Gli-B2*, на хромосомах 1А, 6А, 1В, 6В соответственно (Виниченко, Салина, 2021; Metakovsky et al., 2019). Каждый локус представляет собой кластер тесно сцепленных генов. Гены одного локуса кодируют полипептидные компоненты разного молекулярного веса и заряда. Компоненты, контролируемые одним аллелем, наследуются сцепленно, как единый менделевский признак, образуя полипептидный блок. Структура блока стабильна и не зависит от внешних или внутренних факторов.

Для глиадинкодирующих локусов выявлен множественный аллелизм – каждый локус контролирует более 20 аллелей, что позволяет теоретически идентифицировать более 1 млн генотипов. Фактически каждый сорт, каждая линия имеют свой уникальный электрофоретический спектр, контролируемый разными аллелями четырех глиадинкодирующих локусов (Кудрявцев и др., 2014; Новосельская-Драгович, 2015). Это позволяет идентифицировать генотипы и проследить наследование родительских аллелей в ряду поколений гибридов, определяя их принадлежность к определенным образцам по каждому локусу.

Генотипирование по глиадинкодирующим генам, благодаря уникальности родительских генотипов, дает возможность отобрать гибридное потомство, наследующее генотип определенного родителя, с характерным для него набором аллелей глиадинкодирующих локусов. Анализ аллельного состава глиадинкодирующих локусов у гибридных растений позволил определить, от какого родителя наследуются гены каждого глиадинкодирующего локуса, т.е. определить степень гибридности линий в процессе их создания.

С целью получения широкого спектра голозерных фиолетовозерных гибридов для скрещивания с голозерным полбоидом Гремме были отобраны контрастные линии гибридов, различающиеся по содержанию глиадинкодирующих генов. Одна из выбранных нами, пленчатая безостая линия № 4, наследовала все четыре локуса *Gli* от безостой полбы *T. dicoccum* к-25516. Почти голозерная низкоурожайная линия № 6 унаследовала два локуса, *Gli-B1* и *Gli-A2*, от безостой полбы к-25516 и два, *Gli-A1* и *Gli-B2*, – от тетраплоидной пшеницы *T. durum* Tri15744.

Скрещивание и фенотипирование

Пирамидирование нескольких генов в одном генотипе растения – сложный процесс. Основной упор на данном этапе создания селекционного материала был сделан на получение растений с фиолетовой окраской зерновок.

Антоциановая пигментация у пшеницы регулируется двумя транскрипционными факторами. R2R3-Myb-подобный фактор, активирующий биосинтез антоцианов и в вегетативных органах (колеоптиле, стебле), и в перикарпе, кодируется функциональным аллелем гена *Pp-B1* (также известного как *Rc-1* или *Red coleoptile*) (Himi, Taketa, 2015).

Окраска колеоптиля проявляется, если хотя бы один из аллелей гена *Pp-B1* был доминантным (Khlestkina et al., 2008). Таким образом, для отбора растений, наследующих доминантные аллели *Pp-B1*, перед посевом в грунт использовали визуальный анализ проростков, из которых отбирали образцы только с окрашенным колеоптилем. Функциональный аллель гена *Pp3*, кодирующий второй регуляторный фактор Мус, имеет эндемичное происхождение от тетраплоидного вида *T. aethiopicum* (Zeven, 1991). Только при наличии в одном генотипе комплементарно взаимодействующих генов *Pp-B1* (или *Pp-D1*) и *Pp3* происходит биосинтез антоцианов в зерновках (Tereschenko et al., 2012). При несомненной пользе фенотипирования для селекции растений трудность заключается в том, что регуляторные гены *Pp* были доминантными, следовательно, способны проявлять окраску колеоптиля проростков и перикарпа зерновок как в гомозиготном, так и в гетерозиготном состоянии.

Молекулярные маркеры

Для отбора растений, гомозиготных одновременно по двум доминантным аллелям генов *Pp3* и *Pp-B1*, имеющих стабильное фиолетовое окрашивание зерновок, использовали молекулярные ПЦР-маркеры.

Тестирование SSR-маркеров на ДНК родительских образцов фиолетовозерных пшенично-полбяных гибридов не продемонстрировало 100 % соответствия наследования связи продуктов ПЦР микросателлитов с генами *Pp*. Так, полиморфный микросателлитный маркер *Xgwm0312*, сцепленный с геном *Pp3* на хромосоме 2A, показал несоответствие между продуктами ПЦР фиолетовозерных родительских образцов и линии-донора функционального гена *Pp3 T. durum* Tri15744 (рис. 3, з). Поэтому для молекулярного анализа при отборе гомозиготных фиолетовозерных образцов гибридов успешно подошел разработанный нами ранее для гексаплоидной мягкой пшеницы полиморфный внутригенный ПЦР-маркер *Pp3-diagnostic* (см. рис. 3, д и рис. S4–S5). Это позволило безошибочно отобрать образцы растений, гомозиготные по доминантным аллелям генов *Pp3* в поколениях F₂₋₃.

Тестирование с помощью полиморфного SSR-маркера *Xgwm0400* фиолетовозерных гибридных линий (№ 4, 5, 6), взятых нами для возвратных скрещиваний, выявило наследование участка хромосомы 7B и, следовательно, функциональных аллелей гена *Pp-B1* от ДНК красностебельной полбы к-25516 (№ 3, см. рис. 3, в). Этот маркер был применен для генотипирования ДНК гибридов в поколении F₂. Однако, несмотря на близость данного маркера к изучаемому гену *Pp-B1*, надо учитывать случаи неполного сцепления, связанные с наличием горячей точки разрыва, находящейся между ними.

В отличие от SSR-маркеров *Xgwm0044* и *Xgwm0111* на хромосоме 7D, демонстрировавших надежное сцепление с локусом эквивалентного гена *Pp-D1* при селекции гексаплоидных фиолетовозерных пшениц (Gordeeva et al., 2020), вероятность сцепления маркера *Xgwm0400* с локусом гена *Pp-B1* была крайне низкой. Данный факт согласуется с работой E. Khlestkina с коллегами (2008), в

которой на инбредных рекомбинантных линиях выявлен короткий участок хромосомы 7B с целевым локусом *Rc-B1* (= *Pp-B1*), не имевшим в своем составе ни одного из близлежащих картированных SSR-маркеров.

Горячая точка разрыва между микросателлитным маркером *Xgwm0312* и локусом гена *Pp3* на хромосоме 2A в гибридных линиях, наследующих интрогрессию от дикого тетраплоидного вида *T. timopheevii* Zhuk., показана O.Y. Tereshchenko с коллегами (2012). Что, по-видимому, объясняется более широким спектром разнообразия генетического материала тетраплоидных пшениц, в отличие от окультуренных гексаплоидных сородичей. Поэтому для отбора гомозиготных фиолетовозерных образцов гибридов в поколении F₃ был использован разработанный нами ранее для гексаплоидной мягкой пшеницы полиморфный внутригенный маркер *Pp1-diagnostic* (см. рис. 3, е и рис. S5).

Поскольку рецессивные аллели *pp-B1* на хромосоме 7B по длине маркерных продуктов ПЦР не отличались от нефункциональных аллелей *pp-A1*, только после проверочного фенотипирования зерен от поколения F₄ были окончательно отобраны семейства растений, давшие начало новым фиолетовозерным линиям, гомозиготным одновременно по двум функциональным аллелям генов, *Pp3* и *Pp-B1*, со стабильными фиолетовоокрашенными антоцианами зерновками.

По литературным данным известно, что фиолетовозерные тетраплоидные твердые пшеницы *T. durum* Desf. выведены в Италии как нишевый продукт путем скрещивания коммерческого сорта твердой пшеницы Primadur (Blondur//2587-8-6/Leeds) и эфиопского сорта твердой пшеницы T1303 (P1352395) с фиолетовыми зернами (Fisco et al., 2014, 2018). Итальянскими учеными недавно также были разработаны молекулярные аллель-специфичные маркеры локусов генов *Pp-B1* и *Pp-A3* (*Pp3*) для маркер-ассоциированной селекции фиолетовозерной твердой пшеницы (Esposito et al., 2024). Маркеры были сконструированы на основе сравнительного анализа первичной ДНК генотипов фиолетовозерной пшеницы T1303 и местных желтозерных сортов твердой пшеницы Primadur и Svevo.

Аналогично результатам исследований, полученным на мягкой пшенице (Jiang et al., 2018), в промоторной области функционального доминантного аллеля *TdPpb1* (*Pp3*) на хромосоме 2A у фиолетовозерного T1303 обнаружено шесть tandemных повторов длиной 261 п. н., в то время как у Svevo был только один повтор. Размер продуктов ПЦР на ДНК, полученных от фиолетовозерной пшеницы, имел длину 3446 п. н., у желтозерных сортов – 2141 п. н.

Нефункциональный аллель *TdPpm1b* (*Pp-B1*) в геноме сортов Primadur и Svevo показал наличие большого участка инсерции размером примерно 1.6 тыс. п. о. на расстоянии 56 пар оснований от АТG, которая нарушила работу первого экзона. S. Esposito с коллегами (2024) подобрали праймеры, охватывающие эту инсерцию. Размер продуктов ПЦР, полученных на ДНК функциональных аллелей (*TdPpm1a*), у фиолетовозерных генотипов был длиной около 500 п. н., на ДНК нефункциональных алле-

лей (*TdPpm1b*) у местных желтозерных сортов и линий – 1800 п. н.

Разработанные нами внутригенные аллельспецифические маркеры *Pp1-diagnostic* и *Pp3-diagnostic* имеют более широкое применение и пригодны для диагностики как гексаплоидных, так и тетраплоидных видов пшениц. Праймеры, предложенные в статьях W. Jiang с коллегами (2018) и S. Esposito с коллегами (2024), амплифицируют продукты ПЦР большой длины, требующие для синтеза особую высокоэффективную полимеразу. Для наших маркеров подходит стандартная ДНК-полимераза.

Разработанные нами праймеры внутригенного ПЦР-маркера *Pp1-diagnostic* от начала первого экзона АТГ охватывают более длинный варибельный по длине участок ДНК гена *Pp-1*. В то же время длинные ампликоны маркера *Pp1-diagnostic*, связанные с наличием длинной инсерции в белозерном сорте Гремме, нами не диагностировались. Интересно было бы протестировать по наличию данной вставки культурные сорта твердой пшеницы сибирской селекции.

Использование в работе тепличного комплекса в межсезонье позволило ускорить селекцию и получить гибриды поколения F₄ за два года (три тепличные и две полевые вегетации). Недостатком выращивания растений в теплице было наличие малых площадей для посева зерен. Это отразилось в двукратном молекулярном анализе и проведении отбора нужных гибридных растений в поколениях F₂₋₄.

Заключение

В настоящей работе после генотипирования по генам запасных белков зерновки, созданных ранее фиолетовозерных труднообмолачиваемых и малопродуктивных полбяных гибридов, и возвратного скрещивания с голозерным сортом Гремме получен набор трех семейств яровых голозерных и полуголозерных пшенично-полбяных фиолетовозерных растений, различающихся по глиадинкодирующим генам и другим качественным признакам.

Методом маркер-контролируемой селекции в поколении F₄ окончательно получено 25 линий пшенично-полбяных гибридов, различающихся по морфологическим признакам и константных по признаку фиолетовой антоциановой окраски зерновок, который проявляется при наличии гомозиготных функциональных аллелей генов *Pp-V1* и *Pp3* совместно в одном генотипе. Присутствие только одного функционального аллеля или гетерозиготность приводят к сегрегации по цвету зерна с дальнейшей потерей антоцианового пигмента.

Разработанные нами ранее на основе генома мягкой пшеницы внутригенные ПЦР-маркеры для генов *Pp-V1* и *Pp3* показали высокую эффективность. На небольших площадях выращивания применение *Pp3-diagnostic* позволило сразу точно определить гомозиготные генотипы тетраплоидных растений пшеницы, а применение *Pp1-diagnostic* потребовало последующей проверки окраски зерновок у потомков для отбора константных по цвету образцов. Данные маркеры являются полезным инструментом для дальнейших селекционных программ.

Список литературы / References

- Василова Н.З., Асхадуллин Д.Ф., Асхадуллин Д., Багавиева Э.З., Тазутдинова М.Р., Хусаинова И.И. Фиолетовозерный сорт яровой мягкой пшеницы Надира. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2021;4(40):66-75. doi 10.24412/2309-348X-2021-4-66-75 [Vasilova N.Z., Askhadullin D.F., Askhadullin D., Bagavieva E.Z., Tazutdinova M.R., Khusainova I.I. Violet-green variety of spring soft wheat Nadira. *Zernobobovye i Krupyanye Kultury = Legumes and Groat Crops*. 2021;4(40):66-75. doi 10.24412/2309-348X-2021-4-66-75 (in Russian)]
- Виниченко Н.А., Салина Е.А. Глиадины: структура и токсичные эпитопы. *Письма в Вавилонский журнал генетики и селекции*. 2021;7(4):163-171. doi 10.18699/LettersVJ2021-7-21 [Vinichenko N.A., Salina E.A. Gliadins: structure and toxic epitopes. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Lett Vavilov J Genet Breed*. 2021;7(4):163-171. doi 10.18699/LettersVJ2021-7-21 (in Russian)]
- Гилев С.Д., Цымбаленко И.Н., Копылов А.Н., Филиппова Е.А., Козлова Т.А. Полба – перспективная культура для органического земледелия. *Зерновое хозяйство России*. 2018;4:6-11. doi 10.31367/2079-8725-2018-58-4-6-11 [Gilev S.D., Tsymbalenko I.N., Kopylov A.N., Filippova E.A., Kozlova T.A. Emmer wheat is a promising grain crop for organic agriculture. *Zernovoye Khozyajstvo Rossii = Grain Economy of Russia*. 2018;4:6-11. doi 10.31367/2079-8725-2018-58-4-6-11 (in Russian)]
- Гордеева Е.И., Шоева О.Ю., Шаманин В.П., Хлесткина Е.К. Использование молекулярных маркеров в селекции мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с различной антоциановой окраской зерновок. *Письма в Вавилонский журнал генетики и селекции*. 2023;9(2):86-99. doi 10.18699/LettersVJ-2023-9-11 [Gordeeva E.I., Shoeva O.Y., Shamanin V.P., Khlestkina E.K. The molecular markers applying in breeding of spring bread wheat (*Triticum aestivum* L.) lines with different anthocyanin coloration of the grains. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Lett Vavilov J Genet Breed*. 2023;9(2):86-99. doi 10.18699/LettersVJ-2023-9-11 (in Russian)]
- Захарова И.И., Толстова Е.Г. Особенности контроля качества при производстве блюд из полбы. *Концепт*. 2019;4:238-246. doi 10.24411/2304-120X-2019-14028 [Zakharova I.I., Tolstova E.G. Features of quality control in the production of spelt dishes. *Kontsept = The Concept*. 2019;4:238-246. doi 10.24411/2304-120X-2019-14028 (in Russian)]
- Зверев С.В., Панкратьева И.А., Политуха О.В., Чиркова Л.В., Витол И.С., Стариченков А.А. Исследование свойств полбы. *Хлебопродукты*. 2016;1:66-67 [Zverev S.V., Pankratieva I.A., Politukha O.V., Chirkova L.V., Vitol I.S., Starichenkov A.A. Study of emmer properties. *Khleboproduktu = Grain Products*. 2016;1:66-67 (in Russian)]
- Кудрявцев А.М., Дедова Л.В., Мельник В.А., Шишкина А.А., Упельник В.П., Новосельская-Драгович А.Ю. Генетическое разнообразие современных российских сортов яровой и озимой твердой пшеницы по глиадинкодирующим локусам. *Генетика*. 2014;50(5):554-559. doi 10.7868/S0016675814050099 [Kudryavtsev A.M., Dedova L.V., Melnik V.A., Shishkina A.A., Upel'nik V.P., Novoselskaya-Dragovich A.Yu. Genetic diversity of modern Russian durum wheat cultivars at the gliadin-coding loci. *Russ J Genet*. 2014;50(5):483-488. doi 10.1134/S1022795414050093]
- Кузнецова Е.А., Учасов Д.С., Шаяпова Л.В., Кузнецова Е.А. Исследование состава и свойств зерна *Triticum dicoccum* (Schränk). *Все о мясе*. 2020;(S5):188-190. doi 10.21323/2071-2499-2020-5S-188-190 [Kuznetsova E.A., Uchasov D.S., Shayapova L.V., Kuznetsova E.A. Study of the composition and properties of *Triticum dicoccum* (Schränk) grain. *Vsyo o Myase*. 2020;(S5):188-190. doi 10.21323/2071-2499-2020-5S-188-190 (in Russian)]
- Лабораторный анализ белков семян пшеницы. Методическое пособие. М.: ООО Ваш формат, 2013

- [Laboratory Analysis of Wheat Seed Proteins: Instruction Manual. Moscow: Vash Format Publ., 2013 (in Russian)]
- Новосельская-Драгович А.Ю. Генетика и геномика пшеницы: запасные белки, экологическая пластичность и иммунитет. *Генетика*. 2015;51(5):568-583. doi 10.7868/S0016675815050045
- [Novoselskaya-Dragovich A.Y. Genetics and genomics of wheat: storage proteins, ecological plasticity, and immunity. *Russ J Genet*. 2015;51(5):476-490. doi 10.1134/S102279541505004X]
- Рубец В.С., Ворончихина И.Н., Игонин В.Н., Сидоренко В.С., Ворончихин В.В. Характеристика фиолетовозерных сортов яровой мягкой пшеницы в условиях центрального района Нечерноземной зоны России. *Международный сельскохозяйственный журнал*. 2022;5:525-529. doi 10.55186/25876740_2022_65_5_525
- [Rubets V.S., Voronchikhina I.N., Igonin V.N., Sidorenko V.S., Voronchikhin V.V. Characteristics of violet-green variety of spring soft wheat in the conditions of the central region of the Non-Chernozem Zone of Russia. *Mezhdunarodnyi Sel'skokhozyaistvennyi Zhurnal*. 2022;5:525-529. doi 10.55186/25876740_2022_65_5_525 (in Russian)]
- Смекалова Т.Н., Кобылянский В.Д. Новый подвид пшеницы *Triticum dicoccon* (Schrank) Schuebl. subsp. *nudicoccon* Kobyl. et Smekal. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2019;180(4):148-151. doi 10.30901/2227-8834-2019-4-148-151
- [Smekalova T.N., Kobylansky V.D. A new subspecies of wheat: *Triticum dicoccon* (Schrank) Schuebl. subsp. *nudicoccon* Kobyl. et Smekal. *Trudy po Prikladnoi Botanike, Genetike i Selekcii = Proc Appl Bot Genet Breed*. 2019;180(4):148-151. doi 10.30901/2227-8834-2019-4-148-151 (in Russian)]
- Стёпочкин П.И., Гордеева Е.И., Хлесткина Е.К. Маркер-ориентированная селекция в создании гибридных линий *Triticum dicoccon* (Schrank) Schuebl. × *Triticum aethiopicum* Jakubz. с фиолетовоокрашенным зерном. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2023;184(2):139-148. doi 10.30901/2227-8834-2023-2-1-10
- [Stepochkin P.I., Gordeeva E.I., Khlestkina E.K. Marker-assisted breeding of hybrid lines of *Triticum dicoccon* (Schrank) Schuebl. × *Triticum aethiopicum* Jakubz. with purple grain. *Trudy po Prikladnoi Botanike, Genetike i Selekcii = Proc Appl Bot Genet Breed*. 2023;184(2):139-148. doi 10.30901/2227-8834-2023-2-1-10 (in Russian)]
- Темирбекова С.К., Бегулов М.Ш., Афанасьева Ю.В., Куликов И.М., Ионова Н.Э. Адаптивный потенциал полбы голозерной в условиях второго, третьего и седьмого регионов Российской Федерации. *Вестник российской сельскохозяйственной науки*. 2020;1:34-38. doi 10.30850/vrsn/2020/1/34-38
- [Temirbekova S.K., Begeulov M.Sh., Afanas'eva Yu.V., Kulikov I.M., Ionova N.E. Adaptive capacity of einkorn huskless in the second, third and seventh Russian Federation regions. *Vestnik Rossijskoi Sel'skokhozyaistvennoi Nauki = Vestn Russ Agric Sci*. 2020;1:34-38. doi 10.30850/vrsn/2020/1/34-38 (in Russian)]
- Темирбекова С.К., Бегулов М.Ш., Байда И.Д., Зверев С.В., Политуха О.В. Технологические свойства зерна новых сортов древних видов пшеницы. *Аграрная наука*. 2024;11:157-163. doi 10.32634/0869-8155-2024-388-11-157-163
- [Temirbekova S.K., Begeulov M.Sh., Baida I.D., Zverev S.V., Politukha O.V. Technological properties of grain of new varieties of ancient wheat species. *Agrarnaya Nauka = Agrarian Science*. 2024;11:157-163. doi 10.32634/0869-8155-2024-388-11-157-163 (in Russian)]
- Фисенко А.В., Калмыкова Л.П., Кузнецова Н.Л., Кузьмина Н.П., Ермоленко О.И., Упельник В.П. Селекция фиолетовозерной мягкой пшеницы и ее технологические свойства. *Аграрная Россия*. 2020;10:43-48. doi 10.30906/1999-5636-2020-10-43-48
- [Fisenko A.V., Kalmykova L.P., Kuznetsova N.L., Kuzmina N.P., Ermolenko O.I., Upelnik V.P. Selection of purple-grain common wheat and its technological properties. *Agrarnaya Rossiya*. 2020;10:43-48. doi 10.30906/1999-5636-2020-10-43-48 (in Russian)]
- Шаманин В.П., Потоцкая И.В., Чурсин А.С., Шепелев С.С., Нардин Д.С., Пожерукова В.Е., Кёксель Х., Моргунов А.И. Селекция яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с функциональными свойствами зерна для экологически безопасного выращивания в Западной Сибири. *Сельскохозяйственная биология*. 2024;59(3):492-506. doi 10.15389/agrobiology.2024.3.492rus
- [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. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2024;59(3):492-506. doi 10.15389/agrobiology.2024.3.492eng]
- Шоева О.Ю., Гордеева Е.И., Хлесткина Е.К. Внутривидный ДНК-маркер для отбора пшеницы с повышенным содержанием антоцианов в перикарпе зерновки. *Патент RU2774444C1*. 2022
- [Shoeva O.Yu., Gordeeva E.I., Khlestkina E.K. Intragenic DNA marker for the selection of wheat with a high content of anthocyanins in the grain pericarp. *Patent RU2774444C1*. 2022 (in Russian)]
- Badaeva E.D., Keilwagen J., Knüpfer 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*. 2015;10(5):e0128556. doi 10.1371/journal.pone.0128556
- Biradar S.S., Yashavanthakumar K.J., Navathe S., Reddy U.G., Bavisakar V.S., Gopalareddy K., Lamani K., Desai S.A. Dicocum wheat: current status and future perspectives. In: *New Horizons in Wheat and Barley Research*. Singapore: Springer, 2022;531-563. doi 10.1007/978-981-16-4449-8_21
- Cabas-Lühmann P., Arriagada O., Matus I., Marcotuli I., Gadaleta A., Schwember A.R. Comparison of durum with ancient tetraploid wheats from an agronomical, chemical, nutritional, and genetic standpoints: a review. *Euphytica*. 2023;219(6):61. doi 10.1007/s10681-023-03188-z
- Dwivedi S.L., Mattoo A.K., Garg M., Dutt S., Singh B., Ortiz R. Developing germplasm and promoting consumption of anthocyanin-rich grains for health benefits. *Front Sustain Food Syst*. 2022;6:867897. doi 10.3389/fsufs.2022.867897
- Espósito S., Palombieri S., Vitale P., Angione G., D'Attilia C., Taranto F., Sestili F., De Vita P. Identification and development of functional markers for purple grain genes in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Theor Appl Genet*. 2024;137:256. doi 10.1007/s00122-024-04755-1
- Ficco D.B., Mastrangelo A.M., Trono D., Borrelli G.M., De Vita P., Fares C., Beleggia R., Platani C., Papa R. The colours of durum wheat: a review. *Crop Pasture Sci*. 2014;65(1):1-15. doi 10.1071/CP13293
- Ficco D.B.M., Borrelli G.M., Giovanniello V., Platani C., De Vita P. Production of anthocyanin-enriched flours of durum and soft pigmented wheats by air-classification, as a potential ingredient for functional bread. *J Cereal Sci*. 2018;79:118-126. doi 10.1016/j.jcs.2017.09.007
- Geyik Ö.G., Tekin-Cakmak Z.H., Shamanin V.P., Karasu S., Pototskaya I.V., Shepelev S.S., Chursin A.S., Morgounov A.I., Yaman M., Sagdic O., Köksel H. Effects of phenolic compounds of colored wheats on colorectal cancer cell lines. *Qual Assur Saf Crops Food*. 2023;15(4):21-31. doi 10.15586/qas.v15i4.1354
- Gordeeva E.I., Shoeva O.Y., Khlestkina E.K. Marker-assisted development of bread wheat near-isogenic lines carrying various combinations of purple pericarp (*Pp*) alleles. *Euphytica*. 2015;203(2):469-476. doi 10.1007/s10681-014-1317-8
- Gordeeva E., Shamanin V., Shoeva O., Kukoeva T., Morgounov A., Khlestkina E. The strategy for marker-assisted breeding of anthocyanin-rich spring bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars in Western Siberia. *Agronomy*. 2020;10(10):1603. doi 10.3390/agronomy10101603
- Himi E., Taketa S. Isolation of candidate genes for the barley *Ant1* and wheat *Rc* genes controlling anthocyanin pigmentation in different









- vegetative tissues. *Mol Genet Genomics*. 2015;290(4):1287-1298. doi 10.1007/s00438-015-0991-0
- Jiang W., Liu T., Nan W., Jeewani D.C., Niu Y., Li C., Wang Y., Shi X., Wang C., Wang J., Li Y., Gao X., Wang Z. Two transcription factors *TaPpm1* and *TaPpb1* co-regulate anthocyanin biosynthesis in purple pericarps of wheat. *J Exp Bot*. 2018;69(10):2555-2567. doi 10.1093/jxb/ery101
- Khlestkina E.K., Röder M.S., Salina E.A. Relationship between homeologous regulatory and structural genes in allopolyploid genome – a case study in bread wheat. *BMC Plant Biol*. 2008;8(1):88. doi 10.1186/1471-2229-8-88
- Khlestkina E.K., Röder M.S., Borner A. Mapping genes controlling anthocyanin pigmentation on the glume and pericarp in tetraploid wheat (*Triticum durum* L.). *Euphytica*. 2010;171(1):65-69. doi 10.1007/s10681-009-9994-4
- Liu J., Zhou H., Song L., Yang Z., Qiu M., Wang J., Shi S. Anthocyanins: promising natural products with diverse pharmacological activities. *Molecules*. 2021;26(13):3807. doi 10.3390/molecules26133807
- Melnikova N.V., Kudryavtseva A.V., Kudryavtsev A.M. Catalogue of alleles of gliadin coding loci in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Biochimie*. 2012;94(2):551-557. doi 10.1016/j.biochi.2011.09.004
- Metakovsky E., Melnik V.A., Pascual L., Wrigley C.W. Gliadin genotypes worldwide for spring wheats (*Triticum aestivum* L.) 2. Strong differentiation of polymorphism between countries and regions of origin. *J Cereal Sci*. 2019;87(6):311-317. doi 10.1016/j.jcs.2019.04.015
- Mohammadi N., Farrell M., O'Sullivan L., Langan A., Franchin M., Azevedo L., Granato D. Effectiveness of anthocyanin-containing foods and nutraceuticals in mitigating oxidative stress, inflammation, and cardiovascular health-related biomarkers: a systematic review of animal and human interventions. *Food Funct*. 2024;15(7):3274-3299. doi 10.1039/D3FO04579J
- Plaschke J., Ganal M.W., Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor Appl Genet*. 1995;91:1001-1007. doi 10.1007/BF00223912
- Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganal M.W. A microsatellite map of wheat. *Genetics*. 1998;149:2007-2023. doi 10.1093/genetics/149.4.2007
- Şahin Y., Karakas F.P. Chemical composition of einkorn (*Triticum monococcum* ssp. *monococcum*), emmer (*Triticum dicoccum*), and spelt (*Triticum spelta*). In: Ancient Wheats. Cham: Springer, 2022; 119-145. doi 10.1007/978-3-031-07285-7_6
- Tereshchenko O.Y., Gordeeva E.I., Arbusova V.S., Börner A., Khlestkina E. The D genome carries a gene determining purple grain colour in wheat. *Cereal Res Commun*. 2012;40(3):334-341. doi 10.1556/CRC.40.2012.3.2
- Tikhonova M., Shoeva O., Tenditnik M., Ovsyukova M., Akopyan A., Dubrovina N., Amstislavskaya T.G., Khlestkina E. Evaluating the effects of grain of isogenic wheat lines differing in the content of anthocyanins in mouse models of neurodegenerative disorders. *Nutrients*. 2020;12:3877. doi 10.3390/nu12123877
- Tikhonova M.A., Shoeva O.Y., Tenditnik M.V., Akopyan A.A., Litvinova E.A., Popova N.A., Amstislavskaya T.G., Khlestkina E.K. Antitumor effects of an anthocyanin-rich grain diet in a mouse model of lewis lung carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2024;25:5727. doi 10.3390/ijms25115727
- Zeven A.C. Wheats with purple and blue grains: a review. *Euphytica*. 1991;56(3):243-258. doi 10.1007/bf00042371

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 20.10.2025. После доработки 20.02.2026. Принята к публикации 20.02.2026.

doi 10.18699/vjgb-26-66

Генетическая характеристика и метаанализ населения Северного Причерноморья I тысячелетия н. э. по данным древней ДНК


Э.Д. Айтуганова , А.С. Коньков ¹, Т.В. Андреева ^{1, 2, 3}, Е.В. Рождественских ¹,
А.Д. Манахов ^{1, 2}, Е.И. Рогаев ^{1, 4}

¹ Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

³ Центр генетики и генетических технологий, кафедра генетики биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴ Медицинская школа Чан Массачусетского университета, департамент психиатрии, Шрусбери, США

 ajtuganova.ed@talantiuspeh.ru; evivrecc@gmail.com

Аннотация. За последние два десятилетия внедрение полногеномного анализа древней ДНК привело к прорыву в археогенетических исследованиях, существенно расширив наше понимание генетической истории человечества. На этом фоне особую актуальность приобретает изучение Северного Причерноморья I тысячелетия нашей эры (1–1000 гг.), региона, который в течение всего периода оставался зоной интенсивного культурного обмена и миграций. Несмотря на его историческую значимость, объем доступных данных древней ДНК по этому периоду пока остается ограниченным. В настоящей работе систематизированы и проанализированы опубликованные результаты полногеномного секвенирования 48 древних образцов, относящихся к различным археологическим культурам региона: позднекифской, сарматской, аланской, болгарской, салтово-маяцкой и черняховской. Систематизация данных и применение методов популяционно-генетического анализа позволили проследить генетическую преемственность на памятниках позднекифской, а также отдельно – аланской культуры по отношению к предшествующему населению. Удалось обнаружить межкультурные связи алан, болгар и носителей салтово-маяцкой культуры, в генетической структуре которых отмечается влияние кавказского и восточноевропейского компонентов. С другой стороны, зафиксированы эпизоды масштабных миграций и полной смены населения, наиболее ярко выраженные в сарматской экспансии I–IV вв. н.э., следы которой генетически прослеживаются от Урала до Карпат. По единичным образцам выявлена генетическая преемственность между представителями черняховской культуры и ранними славянскими группами. Полученные результаты демонстрируют мозаичность генетического ландшафта региона, формировавшегося под воздействием многоволновых миграций и межкультурных контактов. Статья освещает современное состояние исследований, показывает основные достижения и намечает перспективы дальнейшего изучения в области археогенетики Северного Причерноморья в I тысячелетии н.э.

Ключевые слова: археогенетика; древняя ДНК; геном; Северное Причерноморье; сарматы; черняховская культура; аланы; болгары; салтово-маяцкая культура

Для цитирования: Айтуганова Э.Д., Коньков А.С., Андреева Т.В., Рождественских Е.В., Манахов А.Д., Рогаев Е.И. Генетическая характеристика и метаанализ населения Северного Причерноморья I тысячелетия н.э. по данным древней ДНК. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(4):658-668. doi 10.18699/vjgb-26-66

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке государственной программы федеральной территории «Сириус» «Научно-технологическое развитие федеральной территории «Сириус», Соглашение № 18-03 от 10.09.2024, код проекта GEN-BFT-2407.

Genetic characterization and meta-analysis of the population of the Northern Black Sea region in the 1st millennium CE based on ancient DNA data


E.D. Aituganova , A.S. Kon'kov ¹, T.V. Andreeva ^{1, 2, 3}, E.V. Rozhdestvenskikh ¹,
A.D. Manakhov ^{1, 2}, E.I. Rogayev ^{1, 4}

¹ Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Krasnodar region, Russia

² Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ Centre of Genetics and Genetic Technologies, Department of Genetics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁴ Department of Psychiatry, UMass Chan Medical School, Shrewsbury, MA, USA

 ajtuganova.ed@talantiuspeh.ru; evivrecc@gmail.com

Abstract. Over the past two decades, the introduction of whole-genome sequencing analysis of ancient DNA has led to a breakthrough in archaeogenetic research, significantly expanding our understanding of human genetic history. In this context the Northern Black Sea region during first millennium CE (1–1,000 CE) is of particular relevance, as it remained a hub of intense cultural exchange and migration. Despite its historical importance, ancient genomic data from this period remains scarce, and a comprehensive synthesis of existing findings is lacking. This study presents a systematic review and meta-analysis of published whole-genome sequencing data from 48 ancient samples associated with key archaeological cultures of the region: Late Scythian, Sarmatian, Alan, Bulgar, Saltovo-Mayaki and Chernyakhov. Through the systematization of data, we trace genetic continuity at Late Scythian and Alanian sites relative to preceding populations. Episodes of large-scale migration and population replacement have been documented, most clearly evident in the Sarmatian expansion of the 1st–4th centuries CE, with genetic traces extending from the Urals to the Carpathians. Based on limited evidence, genetic continuity has been identified between representatives of the Chernyakhov culture and early Slavic groups. Through our meta-analysis, we further detect intercultural connections between the Alans, Bulgars, and bearers of the Saltovo-Mayaki culture, whose genetic structure reveals the influence of Caucasian and East Eurasian components. Collectively, these findings underscore the complex genetic landscape of the region, shaped by successive migration waves and multifaceted intercultural contacts. We conclude by outlining key unresolved questions and future directions for archaeogenetic research in the Northern Black Sea region during the first millennium CE.

Key words: archaeogenetics; ancient DNA; genome; Northern Black Sea region; Sarmatians; Chernyakhov culture; Alans; Bulgars; Saltovo-Mayaki culture

For citation: Aituganova E.D., Kon'kov A.S., Andreeva T.V., Rozhdestvenskikh E.V., Manakhov A.D., Rogaev E.I. Genetic characterization and meta-analysis of the population of the Northern Black Sea region in the 1st millennium CE based on ancient DNA data. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(4):658-668. doi 10.18699/vjgb-26-66

Введение

Северное Причерноморье – часть Понто-Каспийской степи – веками было местом высокой мобильности населения, что обусловило сложную демографическую и этнокультурную историю.

Население прибрежных районов Северного Причерноморья этого периода составляли эллинизированные группы, основавшие в VII–V вв. до н.э. многочисленные полисы: Ольвию, Херсонес, Пантикапей, Фанагорию и др. (Кошеленко и др., 1984). В первые века нашей эры эти центры сохраняли устойчивую античную культурную зону, поддерживавшую тесные контакты как с метрополией, так и с местным населением – скифами, таврами, меотами, синдами и гетами (Алексеева, 1991), и в течение всего I тысячелетия они входили в сферу влияния Рима, Византии, а позднее Хазарского каганата (Плетнева, 2003; Афанасьев и др., 2015а).

Одновременно с этим степные пространства региона стали коридором для последовательных миграционных волн кочевых племенных объединений. Уже в начале I тысячелетия н.э. на смену группам европейских скифов приходят представители сарматской культуры, установив господство в регионе и распространив свое влияние от Дона до Дуная (Mordvintseva, 2013; Koryakova, 2018; Kovács, 2023). Позднее, в I–III вв. н.э., аланы заняли доминирующее положение в Приазовье и Предкавказье (Первалов, 2014). В конце II–начале III в. н.э. происходит экспансия германских племен в регион с северо-запада Европы. Данные группы оставили яркий след на культурно-политическом строе населения Северного Причерноморья, внося вклад в формирование черняховской культуры (III–V вв. н.э.) (Казанский, 2011; Матвеев, 2017; Онищук, 2018).

Существенный перелом в демографической истории региона связан с вторжением гуннов в IV–V вв. н.э., положившим начало эпохе Великого переселения народов

и сопровождавшимся масштабными перемещениями населения (Шушунова, Ярцев, 2024). В V–VII вв. на смену гуннам пришли кочевые объединения оногуров, кутригуров, савиров, а затем и авар (Бубенок, 2014). В середине VII в. в регионе складывается Великая Булгария, которую вскоре сменил Хазарский каганат (Плетнева, 2003; Афанасьев и др., 2015а; Казанский, 2020). С конца VII–VIII вв. Хазарский каганат стал доминирующей силой в регионе, контролируя степи от Дона до Кавказа, восточный Крым и Таманский полуостров. На этих подконтрольных Хазарскому каганату территориях формируется также салтовомаяцкая культура (Плетнева, 2003; Березина и др., 2012; Решетова, 2012; Афанасьев и др., 2015а). Параллельно в более северных лесостепных районах региона начинается расселение славянских племен (Седов, 1979).

Сложность и многослойность историко-культурных процессов Северного Причерноморья на протяжении длительного времени привлекали внимание исследователей. В последние годы реконструкция истории населения региона все больше основывается на анализе данных древней ДНК с применением комплекса методов популяционной генетики. В рамках аутосомного анализа для визуализации структуры генетического разнообразия используется метод главных компонент (Patterson et al., 2006; McVean, 2009), а метод ADMIXTURE применяют для определения вероятных предковых компонентов (Alexander et al., 2009). Используются модели происхождения популяций, основанные на методах f -статистик, измеряющих ковариацию частот аллелей, тем самым позволяя оценить генетические расстояния, выявлять смешанное происхождение и направление потоков генов (Patterson et al., 2012).

На основе этих принципов разработаны инструменты *qpAdm* и *qpWave*, широко используемые для проверки демографических гипотез и количественной оценки примесных долей (Haak et al., 2015; Harney et al., 2021). Анализ IBD определяет участки генома, унаследованные от общих

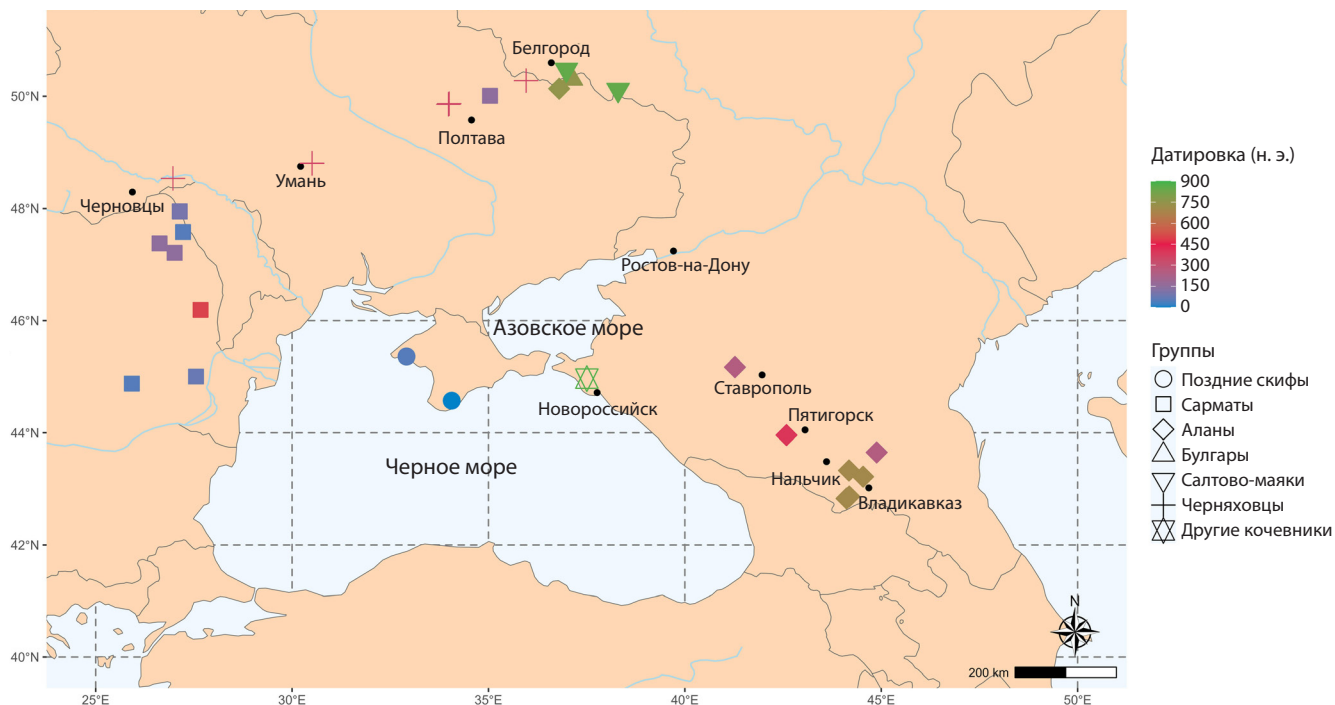


Рис. 1. Географическое расположение археологических памятников 48 древних индивидов, использованных в настоящей работе.

Образцы из археологических памятников обозначены соответствующими знаками согласно археологической культуре. Цветовая шкала отражает датировку образцов, основанную на археологической хронологии или радиоуглеродном анализе (шаг – 150 лет, от 0 до 900 г. н.э.). Масштаб 200 км.

предков, что дает возможность оценивать генеалогические связи между отдельными индивидами (Ringbauer et al., 2024). Анализ гаплогрупп митохондриальной ДНК (мтДНК) и Y-хромосомы позволяет детально реконструировать и исследовать материнские и отцовские линии.

Несмотря на активный рост числа археогенетических исследований, данные по Северному Причерноморью остаются фрагментарными и неравномерно представленными как в хронологическом, так и в культурном отношении. В связи с этим особую актуальность приобретают систематизация, сопоставление и метаанализ опубликованных данных. Это позволит выявить закономерности генетической динамики, оценить устойчивость предлагаемых моделей происхождения и миграций, а также обозначить ограничения текущего состояния исследований и перспективы на будущее.

Настоящая работа представляет собой систематический обзор и метаанализ опубликованных полногеномных данных древней ДНК из региона Северного Причерноморья в I тыс. н.э. (рис. 1).

Материалы и методы

Отбор источников был основан на их рецензируемости и наличии достоверных данных об археологическом, географическом происхождении и датировке образцов. Нами использованы археогенетические описания и геномные данные из статей и/или базы AADR v62.0 (Mallick et al., 2024) с последующим скачиванием геномов с ресурса ENA (ENA Browser, 2025).

Анализ главных компонент (PCA) проводили с применением функции smartpca пакета EIGENSOFT (Patterson et al., 2006). Генотипы исследованных образцов проецировали на пространство более чем 1300 представителей 80 современных европейских и кавказских популяций из панели Human Origin, включающей около 600 тыс. SNP (Lazaridis et al., 2016). Для оценки долей предкового происхождения в структуре генома применяли программный пакет ADMIXTURE v1.3 (Alexander et al., 2009) с использованием той же панели Human Origin.

Из набора данных удалялись все транзисционные варианты, которые могут являться постмортальными модификациями, а также локусы с высокой долей пропущенных данных (--geno 0.999). Для обеспечения независимости маркеров из анализа исключали сцепленные SNP с помощью команды PLINK --indep-pairwise 50/10/0.1. Для оценки оптимального числа кластеров K проводили 12 независимых расчетов в режиме перекрестной проверки; и за окончательное значение K принималось то, при котором достигалось минимальное значение ошибки. Перед выполнением анализа исключались образцы, в которых было определено менее 10 тыс. маркеров панели Human Origin.

Результаты

Нами проанализировано 48 опубликованных древних геномов из этого региона, которые были отнесены к группам на основе происхождения, географии, периода времени и археологической культуры (см. рис. 1 и таблицу).

Список опубликованных полногеномных данных по древним индивидам Северного Причерноморья (СП)

Исследование древней ДНК	Количество геномов древних людей СП	Культура	Датировка	Географическое положение
Andreeva et al., 2025	2	Позднескифское время	I в. до н.э.–II в. н.э.	Прибрежная зона
	1	Аланы	II–IV вв. н.э.	Предкавказье
Saag et al., 2025	1	Сарматское время	I–III вв. н.э.	Лесостепная зона
	11	Черняховская	II–V вв. н.э.	
	6	Аланы	VII–IX вв. н.э.	
	3	Булгары	VII–IX вв. н.э.	
Schütz et al., 2025	9	Сарматское время	I–VI вв. н.э.	Нижнее Подунавье
Sharko et al., 2024*	1	Аланы	III в. н.э.	Предкавказье
Maróti et al., 2022	2	Кочевники	VIII–X вв. н.э.	
Järve et al., 2019	3	Черняховская	III–VI вв. н.э.	Лесостепная зона
Damgaard et al., 2018	6	Аланы	IV–IX вв. н.э.	Предкавказье
	3	Салтово-маяцкая	VII–X вв. н.э.	Лесостепная зона

* Для исследуемого образца метаанализ не проводили в связи с низким качеством геномных данных.

Обзорная часть

В данном разделе представлен систематический обзор опубликованных археогенетических исследований, сгруппированных по археологическим культурам.

Позднескифское население. Полногеномные данные по позднескифскому населению представлены лишь в одном опубликованном исследовании (Andreeva et al., 2025), включающем два индивида I в. до н.э.–II в. н.э. из наиболее показательных памятников позднескифского времени – Неаполя Скифского и Беляусского городища. Археологические данные по Беляусу указывают на трансформацию памятника из греческого поселения в центр позднескифской культуры, вероятно, сопровождавшуюся сменой населения (Дашевская, 2014).

Результаты анализа главных компонент демонстрируют различия в генетических профилях индивидов из этих памятников. Один из них, AS10, сходен с другими скифскими образцами с территории Крыма, относящимися как к позднескифскому (I в. до н.э.–I в. н.э.), так и к более раннему периоду (VI–III вв. до н.э.), демонстрируя вероятную преемственность местного населения (Andreeva et al., 2025). По результатам *qpAdm*-моделирования, его генетический профиль, в отличие от других скифских групп, включает высокую долю (около 40 %) анатолийского компонента, что предполагает связь крымских скифов с древним населением Анатолии. Второй индивид, AS1, на PCA располагается в кластере с классическими скифами Северного Причерноморья IV–III вв. до н.э., и его генетический профиль содержит заметную долю древнесибирского компонента (Andreeva et al., 2025).

В совокупности эти археогенетические данные указывают на выраженную генетическую гетерогенность позднескифского населения Северного Причерноморья, что и подчеркивают Т.В. Андреева с коллегами (2025). Однако ограниченность выборки и единичность исследования этого периода не позволяют делать обобщения на уровне археологической культуры. Примечательно, что в ра-

боте этих исследователей впервые для позднескифского населения этого времени выполнено предсказание фенотипических признаков на основе маркеров системы HirisPlex-S. Результаты указывают на вероятный коричневый (шатен) цвет волос, промежуточный цвет кожи и карие глаза (Andreeva et al., 2025). Несмотря на то что геномное покрытие позволило определить фенотипические характеристики лишь для одного индивида, эти данные создают основу для последующего описания внешнего облика всей группы.

Сарматское время. В лесостепной зоне Северного Донца исследован один индивид сарматского времени (I–III вв. н.э.) из могильника «Любовка». Захоронение находилось в культурном слое более раннего скифского поселения, но было отнесено к сарматскому периоду на основании найденных артефактов и датировано I–III вв. н.э. По результатам PCA и ADMIXTURE этот индивид оказался сходен с населением Кавказа (VII–IX вв. н.э.), более поздними группами алан и степных булгар салтово-маяцкой культуры (Saag et al., 2025).

Интересные данные получены при исследовании геномов индивидов сарматского периода (I–IV вв. н.э.) с территории Нижнего Подунавья (Румынии) (Schütz et al., 2025). Анализ *f4*, PCA и ADMIXTURE показал их выраженное генетическое сходство со степными сарматами Урала и Центральной Азии, а также по результатам *qpAdm*-моделирования выявлена высокая доля степного компонента. Примечательно, что сарматы с территории Румынии и Карпатского бассейна демонстрируют крайне низкую долю общих предков с предшествующим им населением скифского времени с той же территории.

Анализ хромосомных сегментов общего происхождения (IBD) подтверждает эту картину: были обнаружены протяженные общие хромосомные участки у носителей сарматской культуры европейской и азиатской частей Причерноморско-Каспийской степи. В частности, между индивидами с территории Карпатского бассейна (POG-10,

мужчина, I в. н. э.) и с территории Ростовской области (DA139, женщина, VIII в. до н. э.–I в. н. э.) выявлены общие сегменты IBD длиной 64 сМ. В свою очередь, индивид DA139 имел общие IBD длиной 88 сМ с сарматом с территории Оренбургской области (chy001, женщина, I–III вв. н. э.) (Schütz et al., 2025). Данные свидетельствуют о недавних общих предках этих индивидов и активных миграционных процессах между восточными и западными регионами сарматского мира в первых веках I тыс. нашей эры.

Аланы. Изученное к настоящему времени аланское население Северного Причерноморья представлено двумя основными группами, различающимися как географически, так и культурно-археологически (см. таблицу). Первая группа включает восемь аланов Предкавказья – население горных и предгорных районов Северного Кавказа. Вторая группа представлена шестью аланами лесостепной зоны, обитавшими в междуречье Северского Донца и Дона и археологически относимыми к салтово-маяцкой культуре (VII–IX вв. н. э.).

Наиболее ранние археогенетические данные получены с Предкавказья (Северная Осетия – Алания) с использованием выборки из шести индивидов (Damgaard et al., 2018). Авторы этой работы обсуждали вопросы происхождения алан и их предполагаемую ираноязычность. В результате было показано отсутствие значимого сарматского вклада в генофонд алан V в. Предкавказья. Статистический анализ выявил, что северокавказские аланы формируют кладу с населением железного века из Армении, демонстрируя значительные генетические различия между сарматами и аланами. P.V. Damgaard с коллегами предполагают, что аланы, вероятно, унаследовали иранский язык от степных сарматов, но генетическая структура их популяции к V–VI вв. н. э. уже практически не отличалась от местного кавказского населения.

В работе (Sharko et al., 2024) секвенирован геном одного аланского индивида из курганного могильника «Братские 1-е курганы» (Чеченская Республика) и были сделаны другие выводы. Согласно результатам PCA, этот индивид демонстрирует генетическое сходство с аланами, исследованными в более ранней работе. Предкавказья (Damgaard et al., 2018). Результаты анализа ADMIXTURE, f_3 - и f_4 -статистики показали, что его геном по структуре близок к геномам представителей кобанской культуры, при этом, в отличие от высокогорных кавказских групп бронзового века (майкопской и куро-аракской культур), демонстрирует наличие степного компонента. В этой работе в некоторых образцах были обнаружены признаки контаминации, в связи с чем полученные данные требуют осторожности в интерпретациях и последующих подтверждений на других образцах и выборках.

Генетический профиль одного аланского индивида с памятника «Солнечнодольск-4» (Ставропольский край) (радиоуглеродный возраст 132–329 кал. г. н. э.) включает степные компоненты популяций бронзового века, а в ходе сравнительного анализа он оказался сходен с профилями представителей сарматского и кобанского населения того же памятника (Andreeva et al., 2025), что также может

указывать на преемственность населения в этом регионе при смене археологических культур.

Выраженная генетическая гетерогенность зафиксирована при исследовании шести алан, носителей салтово-маяцкой культуры, из лесостепной зоны Северного Донца в археологическом комплексе «Верхний Салтов» (VII–IX вв. н. э.) (Saag et al., 2025). Четыре индивида из этого памятника демонстрируют максимальное генетическое сходство с популяциями Северного Кавказа, что согласуется с описанными выше работами. Еще два индивида проявляют наибольшее генетическое сходство с популяциями Центральной Азии (Saag et al., 2025).

В совокупности имеющиеся данные указывают на сложную и неоднородную генетическую структуру аланского населения, включающую степные, северокавказские и центральноазиатские генетические компоненты. Противоречивость некоторых результатов подчеркивает необходимость расширения выборок и дальнейших исследований аланских групп.

Булгары. В настоящее время в генетических исследованиях булгарское население Причерноморья в I тыс. н. э. представлено только тремя индивидами из памятника «Бочков» в бассейне Северского Донца (Saag et al., 2025). В генетическом профиле этих булгар была обнаружена примесь населения Кавказа и Центральной Азии. Высокая степень генетического сходства между аланами и булгарами, являющимися носителями одной салтово-маяцкой культуры, но имеющими различия в погребальных обрядах (катакомбные и ямные захоронения соответственно), позволяет сделать вывод о том, что обе группы могли происходить из единой генетически однородной группы. Этот вывод согласуется с археологическими интерпретациями, согласно которым как катакомбные, так и ямные погребения салтово-маяцкой культуры лесостепной зоны связаны с миграциями алан с территории Северного Кавказа (Березина и др., 2012; Афанасьев и др., 2015б; Коробов, 2019; Малашев, Кривошеев, 2024).

Согласно результатам *qpAdm*-моделирования, сарматские, аланские и булгарские группы лесостепной зоны, демонстрирующие генетические связи с Кавказом, могут быть смоделированы на основе предшествующей группы элитных скифских кочевников Северского Донца (Saag et al., 2025).

Три образца представителей салтово-маяцкой культуры, связанной с одной из групп населения Хазарского каганата, изучены в более ранней работе (Damgaard et al., 2018). Эти индивиды, хотя и отличаются гетерогенностью, также сближаются в пространстве главных компонент с кавказскими аланами и другими образцами с Северного Кавказа. В более позднем исследовании по результатам теста f_4 они оказались родственны аланам лесостепной зоны (Saag et al., 2025).

Черняховская культура. Археогенетические исследования населения черняховской культуры охватывают образцы из лесостепной зоны региона, датируемые III–V вв. н. э. В 2018 г. были представлены геномы трех черняховцев (Järve et al., 2019), а позднее выборка пополнилась еще 11 образцами (Saag et al., 2025).

Результаты анализа главных компонент и *qpAdm* свидетельствуют о выделении среди представителей черняховской культуры как минимум трех генетических групп. Одна из них включает индивидов с преобладанием восточно- и центральноевропейских компонентов, вторая – носителей генетического профиля, схожего с континентальными южноевропейскими популяциями (близкими к фракийцам). Один представитель черняховской культуры имеет выраженный южный компонент и группируется на PCA с современными киприотами (Järve et al., 2019; Saag et al., 2025).

Тесты *f₄* показывают, что первая восточно- и центральноевропейские группы образуют клады с предшествующими иллирийско-фракийскими популяциями правобережья Днепра. Результаты *qpAdm* указывают, что эта группа может быть смоделирована на основе предковых групп ямной культуры, трипольской культуры и незначительной доли восточноазиатских популяций. Две другие группы черняховцев демонстрируют большую долю трипольского генетического наследия (до 70 %) (Saag et al., 2025).

Получены данные, указывающие на вероятные связи носителей черняховской культуры с раннеславянскими группами. Согласно данным *qpAdm*-моделирования, средневековые группы периода Золотой Орды, включая вероятных славян и кочевников из бассейна Северского Донца, формируются на 100 % из генетического пула первой группы черняховской культуры, что позволяет предположить прямую преемственность между позднеантичным населением черняховской культуры и ранними славянами (Saag et al., 2025). Также были получены данные, указывающие на генетическую преемственность по материнской линии между представителем черняховской культуры III в. н.э. (Одесская область) и индивидом славянского происхождения из средневекового захоронения «Минино II» XII–XIII вв. н.э. (Вологодская область). У индивидов обнаружено полное совпадение митохондриальной последовательности (Рождественских и др., 2025).

Геномные данные по единичным представителям культур Северного Причерноморья. Генетические профили двух индивидов VIII–IX вв. н.э. из погребений кочевников неясной культурной атрибуции памятника «Андреевская щель» (Анапа), согласно моделированию *qpAdm*, содержат доминирующий вклад населения Армении среднего бронзового века (76–96 %) (Maróti et al., 2022).

В рамках обзора удалось систематизировать археогенетические данные единичных исследований и небольших выборок. Тем не менее на ограниченном материале уже четко прослеживаются генетические связи как внутри отдельных культур (как в случае сарматов), так и между культурами – алан, булгар и носителей салтово-маяцкой культуры.

Метаанализ

Для получения общей картины популяционно-генетической структуры Северного Причерноморья I тыс. н.э. мы провели метаанализ опубликованных ранее и представленных выше полногеномных данных с использованием

методов PCA и ADMIXTURE. Результаты анализа представлены на рис. 2.

В проекции двух первых главных компонент, сформированной на основе современных популяций Западной Евразии и Кавказа, наиболее ранние образцы I тыс. н.э. (позднескифские и сарматские индивиды) занимают промежуточное положение между европейскими и кавказскими группами. Сарматы формируют отдельный генетический кластер, что соответствует опубликованному археогенетическим данным (Saag et al., 2025; Schütz et al., 2025). Исключением являются лишь два образца, один из которых располагается с аланами, булгарами и носителями салтово-маяцкой культуры, а другой, самый поздний из этой выборки (V–VI вв. н.э.), – с современными южноевропейскими популяциями.

Представители черняховской культуры не формируют единого кластера, однако преимущественно расположены вблизи современных центральноевропейских и балканских популяций, а один черняховский индивид располагается в кластере позднескифских и сарматских образцов (см. рис. 2, а).

Аланы и булгары – представители салтово-маяцкой культуры – демонстрируют выраженную внутрigrупповую гетерогенность. Значительная часть этих образцов группируется в пределах кавказских популяций. Три образца – алан Предкавказья DA161, а также алан UKR135 и булгар UKR147 лесостепной зоны – располагаются вблизи образцов центральноазиатских популяций. Еще три – аланы UKR134, UKR144 и булгар UKR137 лесостепной зоны – заметно смещены на PCA-плоте в сторону восточных популяций. Следует отметить, что самый ранний исследованный алан Предкавказья (AB105; II–IV вв. н.э.) попадает в кластер позднескифских и сарматских образцов, что соответствует гипотезе о выделении алан из сарматских групп. Однако у всех более поздних представителей аланского населения усиливается сходство с популяциями Кавказа, а не со степными сарматскими группами.

Схожие результаты получены и при анализе методом ADMIXTURE (см. рис. 2, б). Генетические профили представителей каждой из исследованных культур (поздних скифов/сарматов, алан, булгар и черняховцев) имеют четко различаемые отличия. В генетических профилях наиболее ранних степных групп (скифов и сарматов) так же, как и у раннего алана, присутствует в небольшом количестве компонент западноевропейских охотников-собирателей, который полностью отсутствует у более поздних представителей алан и других носителей салтово-маяцкой культуры, однако представлен в значительном количестве у черняховцев, что свидетельствует о различных путях происхождения всех этих групп, населявших Северное Причерноморье в I тыс. н.э., и отсутствие прямой преемственности между ними. Генетический профиль алан и булгар фиксирует вклад кавказских охотников-собирателей и древнеиранских неолитических фермеров, что указывает на связь этих групп с древним населением Кавказа. Несколько булгарских и аланских индивидов имеют выраженный азиатский компонент, объясняющий их смещение на графике PCA в направлении к восточным по-

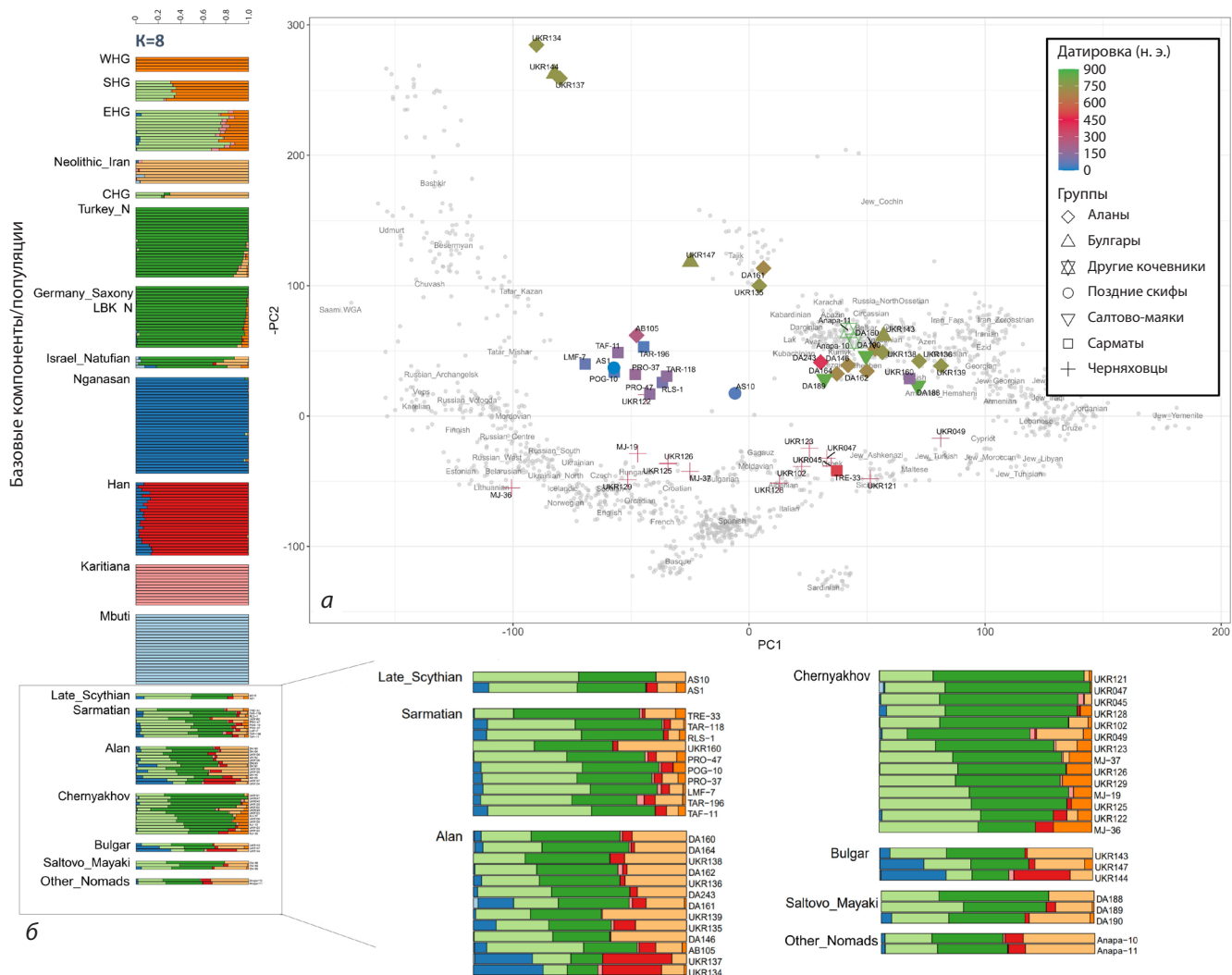


Рис. 2. Результаты метаанализа для индивидов Северного Причерноморья. *a* – анализ методом главных компонент (PCA); *б* – анализ популяционной структуры (ADMIXTURE) с *K* = 8 базовыми максимизированными компонентами (популяциями).
Обозначения компонент (популяций): WHG – западные охотники-собиратели (Western Hunter-Gatherer; 9107–5986 гг. до н.э.); SHG – скандинавские охотники-собиратели (Scandinavian Hunter-Gatherer; 5967–5484 гг. до н.э.); EHG – восточные охотники-собиратели (Eastern Hunter-Gatherer; 9649–5535 гг. до н.э.); Neolithic_Iran – иранские неолитические фермеры (8295–7976 гг. до н.э.); CHG – кавказские охотники-собиратели (Caucasus Hunter-Gatherer; 11961–7599 гг. до н.э.); Turkey_N – неолитические европейские фермеры (Turkey Neolithic; 9656–5835 гг. до н.э.); Germany_Saxony_LBK_N – индивиды культуры линейно-ленточной керамики (5400–4900 гг. до н.э.); Israel_Natufian – индивиды натуйфской культуры (12000–9500 гг. до н.э.); Nganasan – современная популяция нганасан (Сибирь); Han – современная популяция хань (Китай); Karitiana – современная популяция каритиана (Бразилия); Mbuti – современная популяция мбути (Центральная Африка).

пуляциям, и предполагает участие в формировании этих групп и отдельных представителей населения Северного Причерноморья мигрантов из Восточной Евразии.

Носители черняховской культуры отличаются значительным разнообразием генетических профилей при характерном для всех преобладании анатолийского неолитического компонента в сочетании с западными и восточными охотниками-собирающими, что в целом отражает их преимущественно европейский генетический профиль.

Анализ митохондриальной ДНК и Y-хромосомы. Дополнительно для выявления вероятных путей миграций древнего населения Северного Причерноморья, относящихся к разным хронологическим периодам, мы

собрали все доступные данные по митохондриальной ДНК и Y-хромосомам для анализа мужских и женских линий. Всего в анализы вошли данные 324 индивидов Северного Причерноморья в разные хронологические периоды (рис. 3, см. Приложение)¹.

У поздних скифов преобладают западноевразийские митохондриальные линии (Juras et al., 2017); у сарматов к ним добавляется восточная гаплогруппа F, потенциально указывающая на центральноазиатский вклад по материнской линии (Comas et al., 2004). Наблюдается значительное генетическое разнообразие алан и булгар, включающее

¹ Приложение см. по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx36.pdf>

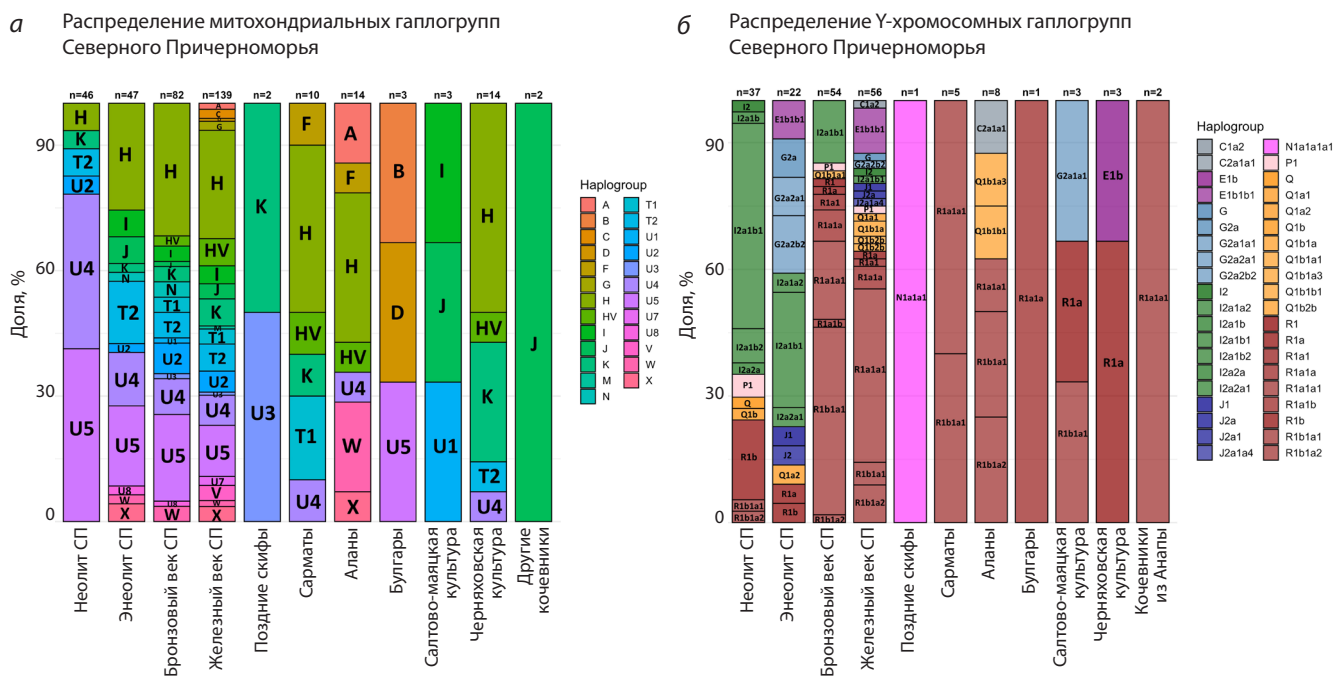


Рис. 3. Результаты распределения митохондриальных (а) и Y-хромосомных гаплогрупп (б) в Северном Причерноморье (СП).

* На рисунке представлены сокращенные гаплогруппы с целью оптимальной визуализации.

наличие восточноевразийских митохондриальных гаплогрупп (Comas et al., 2004; Derenko et al., 2010, 2012): субклады А и F у алан и В и D – у болгар. Это подтверждает вклад центрально- и восточноазиатских компонентов в их генетический профиль. У представителей черняховской культуры доминируют гаплогруппы Н, К, T2, HV, U4, характерные для западноевразийских популяций.

Следует отметить, что, в отличие от данных по ауто-сомным маркерам и митохондриальным гаплогруппам, количество доступных данных для анализа Y-хромосомы по индивидам Северного Причерноморья и сопредельным регионам остается ограниченным.

Начиная с бронзового века в Причерноморье наблюдается резкое увеличение доли гаплогрупп R1a и R1b, что предположительно коррелирует с индоевропейской экспансией и формированием основных направлений индоевропейских языков (Allentoft et al., 2015; Haak et al., 2015). Особый интерес представляет позднескифский образец из Крыма с Y-хромосомной гаплогруппой N1a1a1a1a2a (N-Z1934) – линией, отсутствующей в более ранних комплексах Северного Причерноморья и широко распространенной среди современных финно-угорских популяций (Post et al., 2019). Данная Y-хромосомная линия в настоящее время встречается только среди русских Центрального и Волго-Пермского региона (YTree, 2025).

Аланы характеризуются более гетерогенным Y-хромосомным составом. Наряду с гаплотипами R1b-Z2106, R1b-L23, R1b-M269 и R1b-Z2105, выявленными у скифских групп раннего железного века Северного Причерноморья, у них присутствуют гаплотипы: Q1b-BZ5214, встречающийся у современных чеченцев, и C2a-Y11606, обнаруженный у современных популяций Монголии и

Китая, а также древних элитных групп хунну и аваров (YTree, 2025) (см. Приложение).

Булгары и носители салтово-маяцкой культуры представлены гаплогруппой R1a-M417, которая была ранее зафиксирована в Северном Причерноморье. У одного индивида салтово-маяцкой культуры обнаружено полное совпадение субклады R1b-M269 с аланским образцом и несколькими индивидами бронзового века Молдовы и Северного Кавказа, а также с ранними и поздними скифами. У другого индивида найдена линия G2a-Z6653, совпадающая с образцом позднеантичного времени из Грузии (YTree, 2025).

Черняховская культура представлена гаплогруппами R1a-Z93, R1a-Z645 и E1b-V13, ранее выявленными у скифских групп Северного Причерноморья, населения позднего бронзового века Молдовы, а также у фракийских и, вероятно, отдельных античных греческих групп (Saag et al., 2025; YTree, 2025).

Обсуждение

Северное Причерноморье, несмотря на ключевую роль в трансевразийских миграционных процессах I тысячелетия нашей эры, с точки зрения археогенетики к настоящему времени охарактеризовано крайне неполно и фрагментарно. Если в отношении некоторых групп, таких как сарматы, аланы горной и лесостепной зоны, булгары и отчасти население черняховской культуры, есть возможность дать первичное описание их генетических характеристик, то для ряда археологических культур, проживавших на этой территории, пока отсутствуют какие-либо данные.

Небольшие размеры выборок и ограниченное число полногеномных образцов, охватывающих различные хро-

нологические этапы и археологические культуры, существенно затрудняют реконструкцию демографических процессов и снижают надежность обобщающих выводов. Тем не менее систематический обзор и метаанализ имеющихся данных позволили выявить основные особенности генетической структуры населения Северного Причерноморья в I тыс. н.э.

Смена археологической культуры не всегда сопровождалась полной сменой населения, что указывает на локальную генетическую преемственность. Это ярко демонстрируют данные с памятника «Солнечнодольск-4» (Предкавказье), где аланский индивид генетически близок к сарматам и носителям кобанской культуры того же памятника (Andreeva et al., 2025). Аналогично позднескифский индивид из Беляусского городища имеет генетический профиль, схожий с более ранним скифским населением того же региона (Andreeva et al., 2025).

Параллельно фиксируются эпизоды дальних миграций: были обнаружены генетические связи между сарматами Карпатского бассейна и Южного Урала, что служит прямым доказательством масштабных миграций через Северное Причерноморье в первые века н.э. (Schütz et al., 2025).

В результате проведенного нами метаанализа выявлены генетические связи между отдельными представителями сарматов, алан, болгар и носителей салтово-маяцкой культуры. Среди них наибольшее сходство друг с другом демонстрируют группы лесостепной зоны и кавказские аланы, что может указывать на их общее происхождение или длительные контакты. При этом в структуре изученных групп удалось зафиксировать основные направления генетических влияний – кавказское и восточноевропейское, что согласуется с полученными нами данными по анализу однородительских маркеров (митохондриальной ДНК и Y-хромосоме).

Индивиды черняховской культуры характеризуются генетическим разнообразием. Кроме того, по результатам исследования памятников «Шишаки» и «Минино II» прослеживаются генетические связи с более поздними славянскими группами (Рождественских и др., 2025; Saag et al., 2025). Эти результаты создают предпосылки для дальнейшего более глубокого генетического анализа процессов формирования славянских групп в Восточной Европе.

Наконец, продемонстрировано, что сарматы, пришедшие на территорию Причерноморья, не были генетически близки к местным скифам (Andreeva et al., 2025). Это позволяет предположить, что скифское население полностью сменили сарматы.

Следует отметить, что в результате проведенного нами анализа с использованием ранее опубликованных геномных данных мы не выявили следов метисации между различными этническими и культурными группами, населявшими Северное Причерноморье в I тыс. н.э.

Заключение

Проведенные систематический обзор и метаанализ археогенетических данных по населению Северного Причерноморья I тыс. н.э. позволяют рассматривать этот регион не как последовательность сменяющих друг друга культур, а

как длительно функционирующее контактное пространство. Полученные данные создали хороший фундамент для последующего расширения выборок и углубления исследований. Перспективным направлением является получение полногеномных данных по ключевым популяциям Северного Причерноморья, геномные данные для которых до сих пор отсутствуют, – это население Боспорского царства, кочевые объединения раннего Средневековья (готы, гунны и др.), раннеславянские группы, а также население Булгарии и Хазарского каганата.

Исследование связей между генетическими признаками населения этого региона, передачей культурных традиций и распространением языков особенно важно для уточнения демографической истории региона в последующие исторические периоды (Средние века) и требует комплексного междисциплинарного подхода с участием генетиков, археологов, антропологов и лингвистов.

Список литературы / References

- Алексеева Е.М. Греческая колонизация Северо-Западного Кавказа. М., 1991
[Alekseeva E.M. Greek Colonization of the Northwestern Caucasus. Moscow, 1991 (in Russian)]
- Афанасьев Г.Е., Вень Ш., Тун С., Ван Л., Вэй Л., Добровольская (Козловская) М.В., Коробов Д.С., Решетова (Калугина) И.К., Ли Х. Хазарские конфедераты в бассейне Дона. В: Естественнонаучные методы исследования и парадигма современной археологии. М.: ИА РАН, 2015а;146-154
[Afanasyev G.E., Ven' Sh., Tun S., Van L., Vei L., Dobrovolskaya M.V., Korobov D.S., Reshetova I.K., Li Kh. Khazar Confederates in the Don region. In: Natural Scientific Methods and the Paradigm of Modern Archaeology. Moscow: IA RAN, 2015a;146-154 (in Russian)]
- Афанасьев Г.Е., Добровольская (Козловская) М.В., Коробов Д.С., Решетова (Калугина) И.К. Новые археологические, антропологические и генетические аспекты в изучении донских алан. *Краткие сообщения института археологии*. 2015б;(237):64-79
[Afanasyev G.E., Dobrovolskaya M.V., Korobov D.S., Reshetova I.K. New archaeological, anthropological and genetic aspects in the study of the Alans from the Don region. *Kratkiye Soobshcheniya Instituta Arkheologii = Brief Communications of the Institute of Archaeology*. 2015b;(237):64-79 (in Russian)]
- Березина Н.Я., Бужилова А.П., Решетова И.К. Новые краниологические материалы к вопросу об антропологическом субстрате средневековых алан. *Вестник МГУ. Серия XXIII. Антропология*. 2012;(4):18-36
[Berezina N.Y., Buzhilova A.P., Reshetova I.K. New craniological materials revisited anthropological background of medieval Alans. *Vestnik MGU. Seriya XXIII. Antropologiya = Lomonosov J Anthropol.* 2012;(4):18-36 (in Russian)]
- Бубенок О.Б. К вопросу о количестве племен кочевников Северного Причерноморья в конце V–первой половине VII вв. Дриновский сборник (*Дриновський збірник*). Харьков; София. 2014, Т. IX;29-35
[Bubenok O.B. To the Question about the Quantity of Tribes of the Nomads of North Black Sea Region in the late 5–first half of 7 century AD. *Drinovs'kij Zbirnik*. Kharkiv;Sofiya. 2014, V. IX;29-35]
- Дашевская О.Д. Некрополь Беляуса. Симферополь, 2014
[Dashevskaya O.D. The Belyaus Necropolis. Simferopol, 2014 (in Russian)]
- Казанский М.М. Радагайс и конец черняховской культуры (Radagaïis et la fin de la civilisation de Černjahov). *OIUM*. Київ; Луцьк. Т. 1. 2011;22-32
[Kazanski M.M. Radagais and the End of the Chernyakhov Culture (Radagaïis et la fin de la civilisation de Černjahov). *OIUM*. Kyiv; Lutsk. Vol. 1. 2011;1:22-32 (in Russian)]

- Казанский М.М. Древности степных кочевников постгуннского времени (середина V–середина VI в.) в Восточной Европе. *Материалы по археологии, истории и этнографии Таврии*. 2020;25:90-167
- [Kazanski M.M. the antiquities of the steppe nomads of the Post-Hunnic period (mid-fifth to mid-sixth century in Eastern Europe. *Materialy po Arkheologii, Istorii i Etnografii Tavrii* = *Materials in Archaeology, History and Ethnography of Tauria*. 2020;25:90-167 (in Russian)]
- Коробов Д.С. Аланы Северного Кавказа: этнос, археология, палеогенетика. СПб., 2019
- [Korobov D.S. The Alans of the North Caucasus: Ethnos, Archaeology, Paleogenetics. Saint Petersburg, 2019 (in Russian)]
- Кошеленко Г.А., Кругликова И.Т., Долгоруков В.С. Античные государства Северного Причерноморья. М., 1984
- [Koshelenko G.A., Kruglikova I.T., Dolgorukov V.S. Ancient States of the Northern Black Sea Region. Moscow, 1984 (in Russian)]
- Малашев В.Ю., Кривошеев М.В. К атрибуции некоторых групп катакомбных памятников юга Восточной Европы второй половины III–начала V века. *Нижневолжский археологический вестник*. 2024;23(3):52-78. doi 10.15688/nav.jvolsu.2024.3.4
- [Malashev V.Yu., Krivosheev M.V. Revisiting the issue of attribution of some catacomb monuments groups from the south of Eastern Europe in the late 3rd–early 5th centuries. *Nizhnevolzhskii Arheologicheskii Vestnik* = *Lower Volga Archaeological Bulletin*. 2024;23(3):52-78. doi 10.15688/nav.jvolsu.2024.3.4 (in Russian)]
- Матвеев С.В. Варваризированные римляне или романизированные варвары в среде черняховской общности Пруто-Днестровского междуречья. В: Восточная Европа в древности и средневековье. Античные и средневековые общности. М., 2017;147-151
- [Matveev S.V. Barbarized Romans or Romanized Barbarians in the Chernyakhov Community of the Prut-Dniester Interfluvium. In: Eastern Europe in Antiquity and the Middle Ages: Ancient and Medieval Communities. Moscow, 2017;147-151 (in Russian)]
- Онищук Я.И. Взаимосвязи населения вельбарской, сарматской и черняховской культур на территории Западного Подолья во второй четверти I тыс. н. э. *Журнал Белорусского государственного университета*. История. 2018;3:120-129
- [Onishchuk Ja.I. Relationship of the populations of the Velbar, Sarmatian, and Chernyakhov cultures in the territory of Western Podolia in the second quarter of the 1st millennium AD. *Zhurnal Belorusskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Istorija* = *Journal of the Belarusian State University. History*. 2018;3:120-129 (in Russian)]
- Перевалов С.М. Аланы: мираж кочевой империи. *Вестник Владикавказского научного центра*. 2014;14(2):2-9
- [Perevalov S.M. Alans: a Mirage of Nomadic Empire. *Vestnik Vladikavkazskogo Nauchnogo Tsentra* = *Vestnik of Vladikavkaz Scientific Centre*. 2014;14(2):2-9 (in Russian)]
- Плетнева С.А. Кочевники южнорусских степей в эпоху средневековья (IV–XIII века). Воронеж, 2003
- [Pletneva S.A. Nomads of the South Russian Steppes in the Middle Ages (4th–13th Centuries). Voronezh, 2003 (in Russian)]
- Решетова И.К. Новые антропологические материалы салтовомаяцкой культуры из могильника Верхний Салтов-IV. *Российская археология*. 2012;(3):129-136
- [Reshetova I.K. New anthropological materials of the Saltov-Mayaki culture from the Verkhny Saltov-IV burial ground. *Rossiyskaya Archeologiya* = *Russian Archaeology*. 2012;(3):129-136 (in Russian)]
- Рождественских Е.В., Андреева Т.В., Мalyarchuk А.Б., Адрианова И.Ю., Ходырева Д.С., Евтеев А.А., Бужилова А.П., Рogaев Е.И. Митогеномный анализ представителя черняховской культуры в Среднем Поднестровье и его генетическая связь со славянами в контексте палеоантропологических данных. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(5):722-731. doi 10.18699/vjgb-25-79
- [Rozhdestvenskikh E.V., Andreeva T.V., Malyarchuk A.B., Adrianova I.Yu., Khodyreva D.S., Evteev A.A., Buzhilova A.P., Rogaev E.I. Mitogenomic analysis of a representative of the Chernyakhov culture in the Middle Dniester and their genetic relationship with the Slavs in the context of paleoanthropological data. *Vavilovskii Zhurnal Genetikii Selektii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(5):722-731. doi 10.18699/vjgb-25-79]
- Седов В.В. Происхождение и ранняя история славян. М., 1979
- [Sedov V.V. The Origin and Early History of the Slavs. Moscow, 1979 (in Russian)]
- Шушунова Е.В., Ярцев С.В. Культ предков античного населения Северного Причерноморья в I в. до н. э.–IV в. н. э. и особенности его дальнейшего развития на пути трансформации от язычества к христианству. Симферополь: Ариал, 2024
- [Shushunova E.V., Yartsev S.V. The Ancestor Cult of the Ancient Population of the Northern Black Sea Region in the 1st Century BC – 4th Century AD and Features of its Further Development in the Way of Transformation from Paganism to Christianity. Simferopol, 2024 (in Russian)]
- Alexander D.H., Novembre J., Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res*. 2009;19(9):1655-1664. doi 10.1101/gr.094052.109
- Allentoft M.E., Sikora M., Sjögren K.-G., Rasmussen S., Rasmussen M., Stenderup J., Damgaard P.B., ... Sicheritz-Pontén T., Brunak S., Nielsen R., Kristiansen K., Willerslev E. Population genomics of Bronze Age Eurasia. *Nature*. 2015;522(7555):167-172. doi 10.1038/nature14507
- Allentoft M.E., Sikora M., Refoyo-Martinez A., Irving-Pease E.K., Fischer A., Barrie W., Ingason A., ... Delaneau O., Werge T., Racimo F., Kristiansen K., Willerslev E. Population genomics of post-glacial western Eurasia. *Nature*. 2024;625(7994):301-311. doi 10.1038/s41586-023-06865-0
- Andreeva T.V., Soshkina A.D., Gusev F.E., Malyarchuk A.B., Dotsenko G.S., Dudko N.A., Plotnikova M.Yu., ... Kantorovich A.R., Maslov V.E., Barinov D.G., Dobrovolskaya M.V., Rogaev E.I. Genetic history of Scythia. *Sci Adv*. 2025;11(30):eads8179. doi 10.1126/sciadv.ads8179
- Comas D., Plaza S., Wells R.S., Yuldaseva N., Lao O., Calafell F., Bertranpetit J. Admixture, migrations, and dispersals in Central Asia: evidence from maternal DNA lineages. *Eur J Hum Genet*. 2004; 12(6):495-504. doi 10.1038/sj.ejhg.5201160
- Damgaard P.B., Marchi N., Rasmussen S., Peyrot M., Renaud G., Korneliusen T., Moreno-Mayar J.V., ... Nielsen R., Sikora M., Heyer E., Kristiansen K., Willerslev E. 137 ancient human genomes from across the Eurasian steppes. *Nature*. 2018;557(7705):369-374. doi 10.1038/s41586-018-0094-2
- Derenko M., Malyarchuk B., Grzybowski T., Denisova G., Rogalla U., Perkova M., Dambueva I., Zakharov I. Origin and post-glacial dispersal of mitochondrial DNA haplogroups C and D in northern Asia. *PLoS One*. 2010;5(12):e15214. doi 10.1371/journal.pone.0015214
- Derenko M., Malyarchuk B., Denisova G., Perkova M., Rogalla U., Grzybowski T., Khusnutdinova E., Dambueva I., Zakharov I. Complete mitochondrial DNA analysis of eastern Eurasian haplogroups rarely found in populations of Northern Asia and Eastern Europe. *PLoS One*. 2012;7(2):e32179. doi 10.1371/journal.pone.0032179
- ENA Browser, 2025. Available online: <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>
- Gelabert P., Schmidt R.W., Fernandes D.M., Karsten J.K., Harper T.K., Madden G.D., Ledogar S.H., Sokhatsky M., Oota H., Kennett D.J., Pinhasi R. Genomes from Verteba cave suggest diversity within the Trypillians in Ukraine. *Sci Rep*. 2022;12(1):7242. doi 10.1038/s41598-022-11117-8
- Haak W., Lazaridis I., Patterson N., Rohland N., Mallick S., Llamas B., Brandt G., ... Brown D., Anthony D., Cooper A., Alt K.W., Reich D. Massive migration from the steppe was a source for Indo-European languages in Europe. *Nature*. 2015;522(7555):207-211. doi 10.1038/nature14317
- Harney É., Patterson N., Reich D., Wakeley J. Assessing the performance of qpAdm: a statistical tool for studying population admixture. *Genetics*. 2021;217(4):iyaa045. doi 10.1093/genetics/iyaa045

- Järve M., Saag L., Scheib C.L., Pathak A.K., Montinaro F., Pagani L., Flores R., ... Metspalu M., Savelev N., Kriiska A., Kivisild T., Villemans R. Shifts in the genetic landscape of the Western Eurasian Steppe associated with the beginning and end of the Scythian dominance. *Curr Biol.* 2019;29(14):2430-2441.e10. doi 10.1016/j.cub.2019.06.019
- Jones E.R., Zarina G., Moiseyev V., Lightfoot E., Nigst P.R., Manica A., Pinhasi R., Bradley D.G. The Neolithic transition in the Baltic was not driven by admixture with early European farmers. *Curr Biol.* 2017;27(4):576-582. doi 10.1016/j.cub.2016.12.060
- Juras A., Krzewińska M., Nikitin A.G., Ehler E., Chyleński M., Łukasik S., Krenz-Niedbala M., Sinika V., Piontek J., Ivanova S., Dabert M., Götherström A. Diverse origin of mitochondrial lineages in Iron Age Black Sea Scythians. *Sci Rep.* 2017;7(1):43950. doi 10.1038/srep43950
- Koryakova L. Europe to Asia. In: The Oxford Handbook of the European Iron Age. Oxford University Press, 2018;575-618. doi 10.1093/oxfordhb/9780199696826.013.29
- Kovács P. Fontes Sarmatarum in Hungaria Habitantium – A Magyarországi Szarmatákra Vonatkozó Antik Források. Budapest: Magyar-sággkutató Intézet, 2023
- Krzewińska M., Kılınc G.M., Juras A., Koptekin D., Chyleński M., Nikitin A.G., Shcherbakov N., ... Dalén L., Sinika V., Jakobsson M., Storå J., Götherström A. Ancient genomes suggest the eastern Pontic-Caspian steppe as the source of western Iron Age nomads. *Sci Adv.* 2018;4(10):eaat4457. doi 10.1126/sciadv.aat4457
- Lazaridis I., Nadel D., Rollefson G., Merrett D.C., Rohland N., Mallick S., Fernandes D., ... Yengo L., Hovhannisyann N.A., Patterson N., Pinhasi R., Reich D. Genomic insights into the origin of farming in the ancient Near East. *Nature.* 2016;536(7617):419-424. doi 10.1038/nature19310
- Lazaridis I., Alpaslan-Roodenberg S., Acar A., Açikkol A., Agelarakis A., Aghikyan L., Akyüz U., ... Çavuşoğlu R., Rohland N., Pinhasi R., Reich D., Davtyan R. The genetic history of the Southern Arc: a bridge between West Asia and Europe. *Science.* 2022;377(6609):eabm4247. doi 10.1126/science.abm4247
- Mallick S., Micco A., Mah M., Ringbauer H., Lazaridis I., Olalde I., Patterson N., Reich D. The Allen Ancient DNA Resource (AADR) a curated compendium of ancient human genomes. *Sci Data.* 2024; 11(1):182. doi 10.1038/s41597-024-03031-7
- Maróti Z., Neparáczi E., Schütz O., Maár K., Varga G.I.B., Kovács B., Kálmár T., ... Gulyás B., Kovacsóczy B.N., Gál S.S., Tomka P., Török T. The genetic origin of Huns, Avars, and conquering Hungarians. *Curr Biol.* 2022;32(13):2858-2870.e7. doi 10.1016/j.cub.2022.04.093
- Mathieson I., Alpaslan-Roodenberg S., Posth C., Szécsényi-Nagy A., Rohland N., Mallick S., Olalde I., ... Boric D., Bonsall C., Krause J., Pinhasi R., Reich D. The genomic history of southeastern Europe. *Nature.* 2018;555(7695):197-203. doi 10.1038/nature25778
- Mattila T.M., Svensson E.M., Juras A., Günther T., Kashuba N., Ala-Hulkko T., Chyleński M., ... Netea M.G., Nikitin A.G., Persson P., Malmström H., Jakobsson M. Genetic continuity, isolation, and gene flow in Stone Age Central and Eastern Europe. *Commun Biol.* 2023; 6(1):793. doi 10.1038/s42003-023-05131-3
- McVean G. A genealogical interpretation of principal components analysis. *PLoS Genet.* 2009;5(10):e1000686. doi 10.1371/journal.pgen.1000686
- Mordvintseva V. The Sarmatians: the creation of archaeological evidence. *Oxford J. Archaeol.* 2013;32(2):203-219. doi 10.1111/oja.12010
- Nikitin A.G., Lazaridis I., Patterson N., Ivanova S., Videiko M., Der-gachev V., Kotova N., ... Workman J.N., Zalzalá F., Mallick S., Rohland N., Reich D. A genomic history of the North Pontic Region from the Neolithic to the Bronze Age. *Nature.* 2025;639(8053):124-131. doi 10.1038/s41586-024-08372-2
- Patterson N., Price A.L., Reich D. Population structure and eigenanalysis. *PLoS Genet.* 2006;2(12):e190. doi 10.1371/journal.pgen.0020190
- Patterson N., Moorjani P., Luo Y., Mallick S., Rohland N., Zhan Y., Genschoreck T., Webster T., Reich D. Ancient admixture in human history. *Genetics.* 2012;192(3):1065-1093. doi 10.1534/genetics.112.145037
- Patterson N., Isakov M., Booth T., Büster L., Fischer C.E., Olalde I., Ringbauer H., ... Lillie M., Rohland N., Pinhasi R., Armit I., Reich D. Large-scale migration into Britain during the Middle to Late Bronze Age. *Nature.* 2021;601(7894):588-594. doi 10.1038/s41586-021-04287-4
- Penske S., Rohrlach A.B., Childebayeva A., Gnecci-Ruscione G., Schmid C., Spyrou M.A., Neumann G.U., ... Ringbauer H., Stockhammer P.W., Hansen S., Krause J., Haak W. Early contact between late farming and pastoralist societies in southeastern Europe. *Nature.* 2023;620(7973):358-365. doi 10.1038/s41586-023-06334-8
- Post H., Németh E., Klima L., Flores R., Fehér T., Türk A., Székely G., ... Khusnutdinova E.K., Metspalu E., Villems R., Tambets K., Rootsi S. Y-chromosomal connection between Hungarians and geographically distant populations of the Ural Mountain region and West Siberia. *Sci Rep.* 2019;9(1):7786. doi 10.1038/s41598-019-44272-6
- Posth C., Yu H., Ghalichi A., Rougier H., Crevecoeur I., Huang Y., Ringbauer H., ... Terberger T., Caramelli D., Altena E., Haak W., Krause J. Palaeogenomics of Upper Palaeolithic to Neolithic European hunter-gatherers. *Nature.* 2023;615(7950):117-126. doi 10.1038/s41586-023-05726-0
- Ringbauer H., Huang Y., Akbari A., Mallick S., Olalde I., Patterson N., Reich D. Accurate detection of identity-by-descent segments in human ancient DNA. *Nat Genet.* 2024;56(1):143-151. doi 10.1038/s41588-023-01582-w
- Saag L., Utevska O., Zadnikov S., Shramko I., Gorbenko K., Bandrivskiy M., Pavliv D., ... Barrington C., Gilardet A., Macleod R., Skoglund P., Thomas M.G. North Pontic crossroads: mobility in Ukraine from the Bronze Age to the early modern period. *Sci Adv.* 2025;11(2):eadr0695. doi 10.1126/sciadv.adr0695
- Schütz O., Maróti Z., Tihanyi B., Kiss A.P., Nyerki E., Gînguță A., Kiss P., ... Soficaru A.D., Spekter O., Varga S., Neparáczi E., Török T. Unveiling the origins and genetic makeup of the “forgotten people”: a study of the Sarmatian-period population in the Carpathian Basin. *Cell.* 2025;188(15):4074-4090.e11. doi 10.1016/j.cell.2025.05.009
- Sharko F.S., Boulygina E.S., Tsygankova S.V., Slobodova N.V., Rastorguev S.M., Krasivskaya A.A., Belinsky A.B., ... Shvedchikova T.Yu., Dobrovolskaya M.V., Reshetova I.K., Korobov D.S., Nedoluzhko A.V. Koban culture genome-wide and archeological data open the bridge between Bronze and Iron Ages in the North Caucasus. *Eur J Hum Genet.* 2024;32(11):1483-1491. doi 10.1038/s41431-023-01524-4
- Wang C.C., Reinhold S., Kalmykov A., Wissgott A., Brandt G., Jeong C., Cheronet O., ... Belinskij A.B., Reich D., Hansen S., Krause J., Haak W. Ancient human genome-wide data from a 3000-year interval in the Caucasus corresponds with eco-geographic regions. *Nat Commun.* 2019;10(1):590. doi 10.1038/s41467-018-08220-8
- YTree, 2025. Available online: <https://www.yfull.com/tree/>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 23.12.2025. После доработки 29.12.2025. Принята к публикации 29.12.2025.

doi 10.18699/vjgb-26-67


Отбор и анализ DNase I-гиперчувствительных сайтов для пренатального определения трисомии 21 у плода

А.М. Мазур , А.С. Старшин , Н.В. Богущ², Е.Б. Прохорчук ^{1, 3}

¹ Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

² Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Пироговский Университет), Москва, Россия

³ Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

 mazur.am@gmail.com

Аннотация. В данной работе представлен новый подход к неинвазивной пренатальной диагностике хромосомных аномалий, основанный на анализе эпигенетических особенностей циркулирующей внеклеточной ДНК (вкДНК). Ключевая идея метода заключается в использовании фундаментальных различий в организации хроматина между материнскими и фетальными клетками. В частности, мы сосредоточились на участках генома, которые в материнских клетках крови находятся в открытом состоянии (DHS), но остаются закрытыми в тканях плода. Эти эпигенетические различия создают уникальные паттерны вкДНК, позволяющие выделить фетальную ДНК из общего пула материнской вкДНК. Работа включает в себя несколько основных шагов: проведение полногеномного скрининга для выявления дифференциально доступных участков хроматина, отбор наиболее информативных маркеров при помощи алгоритма машинного обучения, таргетное секвенирование отобранных эпигенетических маркеров с применением молекулярных баркодов и построение модели на основе LASSO-регрессии с последующей ее валидацией. Особое внимание уделено диагностике трисомии хромосомы 21 (синдрома Дауна), как наиболее клинически значимого хромосомного нарушения. Разработанный алгоритм демонстрирует высокую точность при анализе отобранных эпигенетических маркеров. Важное преимущество метода – его технологическая гибкость: отобранные маркеры можно анализировать как с помощью NGS, так и более доступными методами, включая цифровую ПЦР. Перспективы дальнейшего развития метода включают расширение диагностической панели для выявления других частых анеуплоидий (трисомии хромосом 13, 18), а также микроделеционных синдромов. Предлагаемый подход открывает новые возможности для создания экономически эффективных тест-систем, которые могут быть внедрены в широкую клиническую практику, обеспечивая высокую точность диагностики при снижении стоимости анализа.

Ключевые слова: хроматин; внеклеточная ДНК; анеуплоидия; трисомия; НИПТ

Для цитирования: Мазур А.М., Старшин А.С., Богущ Н.В., Прохорчук Е.Б. Отбор и анализ DNase I-гиперчувствительных сайтов для пренатального определения трисомии 21 у плода. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(4): 669-675. doi 10.18699/vjgb-26-67

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта государственной программы Федерального округа «Сириус» «Научно-технологическое развитие Федерального округа «Сириус» (соглашение № 21-03 от 27.09.2024) (раздел Алгоритм анализа данных полногеномного секвенирования) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Selection and evaluation of DNase I hypersensitive sites for prenatal screening of trisomy 21 in the fetus

А.М. Mazur , А.С. Starshin , N.V. Bogush², E.B. Prokhortchouk ^{1, 3}

¹ Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Krasnodar region, Russia

 mazur.am@gmail.com

Abstract. This study introduces a novel approach for noninvasive prenatal testing (NIPT) of chromosomal abnormalities, based on analysis of epigenetic features in circulating cell-free DNA (cfDNA). The core innovation of our method leverages fundamental differences in chromatin organization between maternal and fetal cells. Specifically, we focused on genomic regions that exhibit open chromatin configuration in maternal blood cells but remain tightly packed in fetal tissues (DNase I hypersensitive sites or DHSs). These epigenetic differences create distinct cfDNA fragmentation signatures that allow selective identification of fetal DNA within the maternal cfDNA pool. The study workflow comprised several key steps: performing genome-wide screening to identify differentially accessible chromatin regions, selecting the most informative markers using a machine learning algorithm, and targeted sequencing of the selected epigenetic markers using molecular barcodes. Subsequently, a LASSO regression model was constructed and validated. As a proof of concept, the study demonstrates the method's efficacy in identifying trisomy 21 (Down syndrome), though the underlying principles can be readily adapted to other abnormalities. Complementing its robust performance, the technique offers practical advantages in terms of platform

compatibility – the same epigenetic markers can be assessed using either next-generation sequencing or simpler, more cost-efficient methods like digital PCR. With further refinement, the approach could be extended to screen for additional aneuploidies (trisomies 13 and 18) and microdeletion syndromes. Therefore, this approach offers new opportunities for developing cost-effective testing systems suitable for widespread routine clinical implementation, combining high diagnostic accuracy with reduced analysis costs.

Key words: chromatin; cell free DNA; aneuploidy; trisomy; NIPT

For citation: Mazur A.M., Starshin A.S., Bogush N.V., Prokhortchouk E.B. Selection and evaluation of DNase I hypersensitive sites for prenatal screening of trisomy 21 in the fetus. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(4): 669-675. doi 10.18699/vjgb-26-67

Введение

Неинвазивный пренатальный тест (НИПТ), использующий технологию секвенирования нового поколения (NGS), считается революционным методом диагностики хромосомных нарушений у плода, основанным исключительно на анализе материнской крови (Fan et al., 2008). До возникновения NGS проведение подобного анализа было невозможно ввиду отсутствия эффективных способов выявления крошечных фрагментов фетальной ДНК среди огромного количества собственной ДНК матери (Dhallan et al., 2007). Благодаря высокой производительности и чувствительности NGS стало возможным выделение и точное определение небольших количеств внеклеточной ДНК (вкДНК) плода прямо из кровотока матери (Albergy et al., 2021). Это сделало НИПТ быстрым, безопасным и удобным способом оценки рисков анеуплоидий, таких как синдром Дауна, Эдвардса и Патау (Gil et al., 2017). Таким образом, именно геномная революция, связанная с появлением методов NGS, открыла путь к широкому применению НИПТ в современной медицинской практике (Satam et al., 2023).

Однако, несмотря на впечатляющие возможности NGS, эффективность НИПТ по-прежнему зависит от выбора оптимальных биологических маркеров, позволяющих различать материнскую и фетальную ДНК (Hui, Bianchi, 2020). В этом контексте особый интерес представляют эпигенетические различия, в частности профили доступности хроматина.

DNase I-гиперчувствительные сайты (DHS) представляют собой геномные участки с открытой структурой хроматина, обладающие повышенной доступностью для фермента DNase I. Такие участки часто ассоциируются с регуляторными элементами генов и демонстрируют клеточно-специфичные профили экспрессии (Thurman et al., 2012).

На предыдущем этапе данного исследования использование кластеров DHS существенно ограничивало количество доступных кандидатных регионов, снижая чувствительность и специфичность тест-системы. Для преодоления этого ограничения мы перешли от анализа кластеров к изучению индивидуальных DHS. Такой подход значительно расширил набор кандидатных регионов, позволив проводить более точную фильтрацию и в итоге получить достаточное количество высококачественных локусов для надежной диагностики.

Наше исследование сосредоточено на разработке усовершенствованного подхода к НИПТ, основанного на анализе отдельных DHS – участков генома с характерной

для плода и матери структурой хроматина. Предлагаемый подход должен обеспечить высокую точность детекции фетальной ДНК за счет учета эпигенетических особенностей DHS и снижение стоимости анализа благодаря их целенаправленному анализу.

Материал и методы

Когорта исследования. 1012 образцов крови беременных женщин были собраны в период с апреля 2014 г. по апрель 2015 г. Пациентки были направлены из 47 медицинских учреждений Российской Федерации или обратились самостоятельно. Средний возраст участниц составил 35 лет; самой младшей было 20 лет, самой старшей – 51 год. Срок беременности на момент забора крови составлял от 10 до 24 недель, в среднем 14 недель. Средняя концентрация внеклеточной ДНК плода (вкДНК плода) составила 11 % (Pantiuhk et al., 2016). От всех женщин было получено информированное согласие на использование их образцов в научных целях. Исследование одобрено комиссией ученого совета медико-биологического факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (протокол № 4 от 26 декабря 2022 г.).

Подбор праймеров. Для подбора праймеров использовали программу primer3 (Untergasser et al., 2012) со следующими параметрами: PRIMER_OPT_SIZE = 21, PRIMER_MIN_SIZE = 18, PRIMER_MAX_SIZE = 24, PRIMER_MAX_NS_ACCEPTED = 1, PRIMER_PRODUCT_SIZE_RANGE = 100–140.

Обогащение по отобраным районам и приготовление библиотек. Таргетное секвенирование методом обогащения одноцепочечными праймерами с дуплексными уникальными молекулярными идентификаторами (single-end duplex UMI) проводили в соответствии с протоколом (Peng et al., 2019).

Секвенирование библиотек выполняли по технологии SBS Illumina одноконцевыми чтениями длиной не менее 80 оснований.

Построение и оценка модели. На первом этапе подготовили исходные данные, разделив образцы на две категории: с трисомией и без нее. Образцы с общим числом молекул <15000 отфильтровали.

Затем было проведено 100 независимых испытаний с использованием пакетов R `rsample` и `caret` (Kuhn, 2008). В каждом испытании случайным образом, но с сохранением исходного соотношения классов (стратификацией) данные разделялись на обучающую (60 % образцов), валидационную (20 % образцов) и тестовую (20 % образцов) части.

Для компенсации дисбаланса классов в обучающих наборах применялось взвешивание наблюдений. Веса классов рассчитывали отдельно для каждого обучающего набора по формулам:

$w_t = N_major / N_minor$ – для образцов минорного класса (трисомия),

$w_n = 1$ – для образцов мажорного класса (норма),

где N_major и N_minor – количество образцов мажорного и минорного классов соответственно в обучающей выборке. Такое взвешивание эффективно увеличивает вклад редких случаев трисомии в функцию потерь, предотвращая смещение модели в сторону более распространенного класса.

На валидационной выборке определялся оптимальный порог классификации по критерию Йодена (Youden, 1950), который максимизирует индекс Йодена ($J = \text{чувствительность} + \text{специфичность} - 1$). Данный критерий направлен на нахождение порога, обеспечивающего баланс между способностью метода корректно идентифицировать как положительные случаи (чувствительность), так и отрицательные (специфичность). Такой подход гарантирует, что выбранный порог будет балансировать между двумя типами ошибок: ложноотрицательными результатами (когда анеуплоидия есть, но тест ее не показывает) и ложноположительными (когда тест ошибочно указывает на наличие анеуплоидии). На тестовых данных вычисляли три ключевых показателя: площадь под ROC-кривой (AUC), чувствительность и специфичность модели. Для обучения модели использовали пакет `glmnet` (Friedman et al., 2010). Все результаты визуализировали с помощью `ggplot2` (Wickham, 2016) и `ggpubr`.

Результаты

Определение кандидатных регионов в геноме человека

На первом этапе были отобраны DNase I-гиперчувствительные сайты (DHS) из открытой базы данных (Sheffield et al., 2013). В качестве типа ткани матери были использованы все клеточные линии гематопоэтического и эндотелиального ряда, как типичные источники свободно циркулирующей вкДНК матери (Lui et al., 2002).

Критерием отбора служила дифференциальная доступность этих сайтов: открытое состояние в клеточных линиях, соответствующих материнским тканям (31 линия гематопоэтического и эндотелиального происхождения), и закрытое состояние в фетальных клеточных линиях (Chogion). Такой подход позволил идентифицировать 13637 индивидуальных DHS (рис. S1)¹.

Координаты всех отображенных сайтов были переведены в версию генома человека GRCh38 (табл. S1). Для последующего анализа вокруг каждого DHS длиной 150 п. н. выделяли регион длиной 1000 п. н., располагая сайт в его центре. Хотя сами DHS не перекрывались, фланкирующие регионы могли частично пересекаться при расстоянии между центральными сайтами менее 500 п. н., что было учтено при финальном отборе.

¹ Рис. S1–S3 и табл. S1–S3 Приложения см. по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx37.zip>

Для формирования диагностической панели мы взяли набор регионов, включающий в себя DHS: на хромосоме 21 – как прямую мишень для диагностики синдрома Дауна, на Y-хромосоме – в качестве отрицательного контроля, и на хромосомах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 – в качестве маркеров, относительное снижение покрытия которых при трисомии отражает перераспределение ридов в пользу 21-й хромосомы.

Формирование набора образцов

В исследовании были использованы данные секвенирования вкДНК из предыдущей работы (Pantiukh et al., 2016), посвященной методам неинвазивной пренатальной диагностики анеуплоидий.

Для определения концентрации фетальной вкДНК применяли два взаимодополняющих метода: количественный анализ Y-хромосомы и метод SeqFF, основанный на регрессионном анализе перепредставленных фетальных последовательностей (Kim et al., 2015; van Beek et al., 2017).

Необходимость группировки образцов обусловлена особенностями исходных данных, где среднее покрытие составляло всего 0.3×. При таком уровне покрытия на стандартный DHS длиной 150 нуклеотидов приходилось в среднем лишь одно чтение, что делало невозможным надежный количественный анализ на индивидуальном уровне. Для решения проблемы низкого покрытия образцы были отсортированы по возрастанию концентрации фетальной ДНК и равномерно распределены на четыре группы (P1–P4) (рис. S2).

Сформированный набор клинических образцов включал данные 958 случаев с нормальным кариотипом плода и 54 образца с трисомией по хромосоме 21 (синдром Дауна).

Алгоритм анализа данных полногеномного секвенирования

Все выбранные образцы вкДНК были картированы на референсный геном человека GRCh38 с использованием программы `bowtie2` (Langmead, Salzberg, 2012) в режиме глобального выравнивания (--end-to-end) с параметром --sensitive. Доля успешно картированных чтений составила 97.05 %, при этом некартированные чтения были исключены из дальнейшего анализа. Для каждого образца рассчитали покрытие каждого нуклеотида в предварительно отображенных регионах.

Агрегированные данные разделили на группы: небеременные женщины, беременные с нормальным кариотипом плода (с дальнейшим разделением по концентрации фетальной ДНК) и беременные с трисомиями плода. В DHS наблюдалось статистически значимое увеличение покрытия между группами беременных женщин с нормальным кариотипом плода (рис. 1, а) и у беременных женщин по сравнению с небеременными (это объясняется тем, что у фетальной ДНК хроматин на данном участке генома закрыт и не подвергается воздействию DNКазазы I) (см. рис. 1, б). Также различия отмечались для беременных с трисомией 21-й хромосомы у плода (см. рис. 1, б). Увеличение покрытия в DHS позволило установить, что

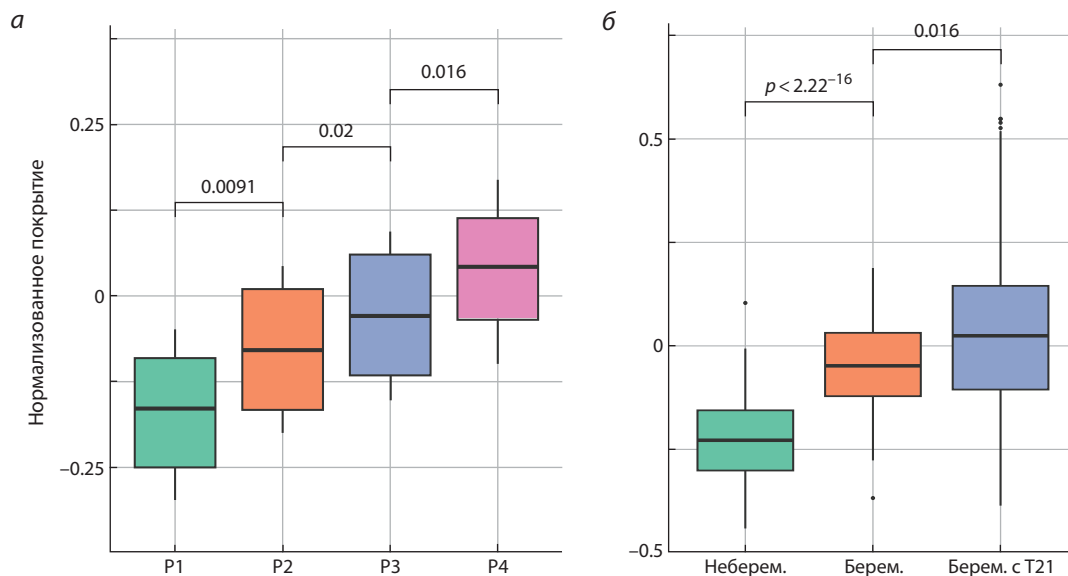


Рис. 1. Нормализованное покрытие (Z-score) в целевых регионах на примере хромосомы 21: а – в подгруппах беременных с нормальным кариотипом плода; б – в группах небеременных, беременных с нормальным кариотипом плода и беременных с трисомией у плода.

Статистическая значимость различий между группами оценивалась с помощью U-критерия Манна–Уитни (критерий Уилкоксона для независимых выборок).

с помощью предложенного метода можно детектировать фетальные анеуплоидии.

Интересно, что в некоторых регионах выявлялись множественные участки с повышенным покрытием у беременных. Проверка в геномном браузер UCSC подтвердила наличие дополнительных DHS в таких регионах (рис. S3), что согласуется с известными данными о кластеризации регуляторных элементов в геноме (Thurman et al., 2012).

Формирование критериев и выбор регионов

Основная задача состояла в поиске регионов, наиболее эффективно различающих беременных и небеременных. Для этого были предложены следующие критерии: длина максимального окна, в котором разность между средним покрытием у небеременных и средним покрытием у беременных меньше нуля; максимальная площадь под кривой разности в окне из 100 нуклеотидов; зависимость величины покрытия от концентрации фетальной вкДНК; а также функциональная значимость. Функциональная значимость оценивалась на основе критериев, предложенных в работе (Thurman et al., 2012). Промоторными сайтами считались те, у которых координаты пересекаются с сайтом начала транскрипции из референсной аннотации генома человека GENCODE (Harrow et al., 2012), или ближайший DHS к сайту начала транскрипции в 5'-направлении. Эхансерами считались те, что находятся на расстоянии не более 500000 нуклеотидов от промоторного сайта и имеют с данным промоторным сайтом высокую корреляцию ($R \geq 0.7$) по данным DNase-seq.

Чтобы определить, какой из предложенных критериев лучше всего подходит для выбора регионов, был построен бинарный классификатор на основе метода случайного

леса, который отличает образцы беременных женщин от образцов небеременных на основании среднего покрытия в 20 наилучших по данным критериям участках. Мы использовали алгоритм случайного леса Random Forest Classifier из библиотеки scikit-learn в стандартной конфигурации (Pedregosa et al., 2011). Качество предсказаний определяли F-мерой для предсказаний образцов небеременных, поскольку количество таких образцов меньше, чем беременных. Для определения наиболее эффективного правила отбора регионов мы оценивали предсказательную способность каждого критерия в отдельности и их возможных комбинаций. Наилучшая F-мера была получена на регионах, отобранных по сочетанию трех критериев: критерия подсчета площади под кривой разности; критерия наличия в регионе зависимости величины покрытия от концентрации плодной ДНК; критерия того, является ли сайт промоторным или эхансерным.

Затем для координаты каждого нуклеотида было найдено среднее значение нормализованного покрытия (Z-score) по всем классам: для образцов небеременных; для образцов беременных (по группам с разной концентрацией вкДНК); для образцов беременных с трисомией по 21-й хромосоме. После этого все регионы конкретной хромосомы были отсортированы по убыванию величины, определенной в выбранном критерии, и отбиралось заданное количество регионов.

Секвенирование отобранных районов

Для анализа 40 отобранных геномных регионов (табл. S2) у 283 образцов использовали метод таргетного секвенирования на основе мультиплексной ПЦР. Специфичные праймеры были разработаны для каждого региона (табл. S3),

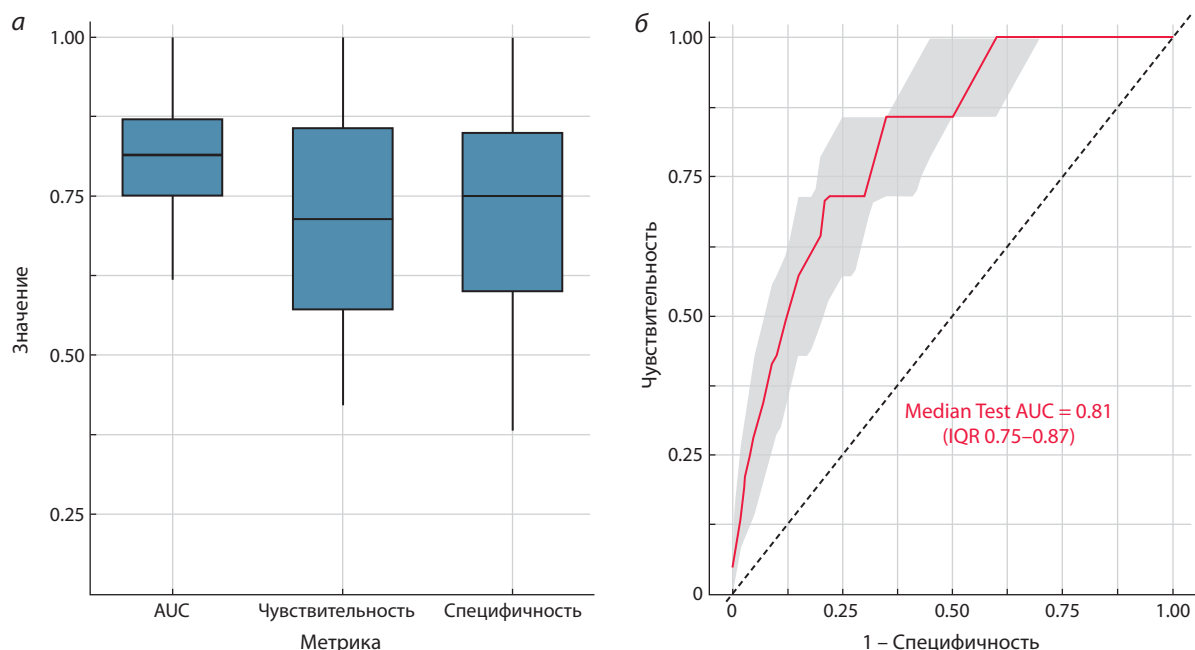


Рис. 2. Характеристики модели: *а* – распределение метрик (AUC (площадь под кривой), чувствительность и специфичность); *б* – ROC, построенная на 100 независимых разбиениях.

что позволило одновременно амплифицировать все целевые участки в одной реакции. Перед секвенированием провели молекулярное баркодирование исходных молекул ДНК на этапе амплификации, что обеспечило точный подсчет количества исходных молекул и минимизировало влияние ПЦР-артефактов. Картирование чтений было проведено таким же образом, как описано в разделе «Алгоритм анализа данных полногеномного секвенирования».

Построение и валидация модели

Для 201 образца с нормальным кариотипом плода и 82 с трисомией был произведен подсчет количества молекул вкДНК, соответствующих 40 выбранным регионам. Чтобы достоверно оценить пригодность этих регионов для использования в тест-системе, мы обучили и протестировали модель на основе LASSO-регрессии, применяя стратифицированный метод повторных случайных подвыборок и взвешивание классов (см. Материалы и методы).

Высокие показатели чувствительности и специфичности (рис. 2, *а*), а также AUC (см. рис. 2, *б*) модели позволяют сделать вывод о возможности предсказания наличия трисомии у плода по данным секвенирования DHS свободно циркулирующей вкДНК.

Обсуждение

До того момента, как анализ вкДНК плазмы крови стал доминирующим подходом в неинвазивном пренатальном тестировании, научное сообщество находилось в активном поиске альтернативных методов, позволяющих получить генетический материал плода без инвазивного вмешательства (Simpson, Elias, 1993).

Основными мишенями в этих исследованиях выступали два типа клеток: трофобласты (Bruch et al., 1991) и ядро-

содержащие эритроциты плода (фетальные эритроциты) (Simpson, Elias, 1994). Трофобласты, являющиеся производными плаценты, представлялись логичной целью, так как они содержат полный геном плода и теоретически могли бы служить идеальным материалом для анализа (Covone et al., 1984). Параллельно велись исследования в области выделения фетальных эритроцитов (Bianchi et al., 1990). Преимущество этого подхода заключалось в том, что незрелые ядросодержащие эритроциты в норме практически отсутствуют в периферической крови здорового взрослого человека, что теоретически позволяло отличить их на фоне материнских клеток.

Однако практическое применение клеточного подхода столкнулось с серьезными ограничениями (Holzgreve et al., 1992). Основной проблемой была чрезвычайно низкая концентрация фетальных клеток в материнской крови, что делает их выделение технически сложным и ненадежным.

На этом фоне начало принципиально иному пути положило открытие, сделанное Деннисом Ло и его коллегами в 1997 г., которое продемонстрировало наличие значительного количества вкДНК плода в плазме крови матери (Lo et al., 1997). Несмотря на то что вкДНК представляла собой фрагментированную плацентарную ДНК, а не полный геном плода, этот подход обладал решающими практическими преимуществами: относительно высокой концентрацией генетического материала и технологической доступностью для анализа с помощью ПЦР (Lo et al., 1998).

Современные коммерческие НИПТ, использующие методы высокопроизводительного секвенирования, показывают высокую точность, но их широкое применение все еще сдерживается относительно высокой стоимостью (Gil et al., 2017).

Наш метод, основанный на таргетном анализе 40 эпигенетических маркеров (DHS), предлагает экономически выгодное решение. Подобные подходы требуют секвенирования менее 1 % генома, что существенно сокращает расходы на реагенты и обработку данных (Schmitt et al., 2015). Следует отметить, что для такого анализа может быть использована не только платформа NGS, но и более доступная технология цифровой ПЦР (dPCR), что дополнительно снижает стоимость и упрощает внедрение метода в рутинную клиническую практику (Li et al., 2022). Это особенно актуально для небольших лабораторий, не имеющих доступа к дорогостоящим системам секвенирования. При этом сохраняются все ключевые преимущества НИПТ: неинвазивность, возможность ранней диагностики и высокая точность определения хромосомных аномалий (Zhang et al., 2026).

Важным аспектом исследования стала разработка строгих критериев отбора информативных регионов. Наш метод учитывает комплекс параметров, включая не только статистические показатели дифференциальной доступности, но и функциональную значимость сайтов, а также зависимость сигнала от концентрации фетальной ДНК. Такой комплексный подход позволяет создать надежную диагностическую панель, устойчивую к техническому шуму. А применение в работе молекулярных баркодов решает такую важную проблему количественного анализа вкДНК, как точный подсчет исходных молекул при наличии ПЦР-амплификации.

Заключение

Перспективы практического применения разработанного подхода выглядят многообещающе. Во-первых, метод принципиально позволяет расширить спектр детектируемых хромосомных аномалий без существенного увеличения стоимости анализа. Во-вторых, его адаптация для различных технологических платформ открывает возможности для создания гибких диагностических систем, которые могут быть оптимизированы под конкретные клинические задачи и бюджетные ограничения.

Дальнейшие исследования могут быть направлены на оптимизацию панели маркеров для одновременного выявления широкого спектра хромосомных аномалий и стандартизацию протоколов для использования в рутинной клинической практике. Предложенный метод имеет все предпосылки стать основой для нового поколения скрининговых тестов, сочетающих высокую надежность и экономическую эффективность.

Список литературы / References

- Albery M.S., Aziz E., Ahmed S.R., Abdel-Fattah S. Non invasive prenatal testing (NIPT) for common aneuploidies and beyond. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2021;258:424-429. doi 10.1016/j.ejogrb.2021.01.008
- Bianchi D.W., Flint A.F., Pizzimenti M.F., Knoll J.H., Latt S.A. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87(9):3279-3283. doi 10.1073/pnas.87.9.3279
- Bruch J.F., Metzeau P., Garcia-Fonknechten N., Richard Y., Tricottet V., Hsi B.L., Kitzis A., Julien C., Papiernik E. Trophoblast-like cells sorted from peripheral maternal blood using flow cytometry: a multiparametric study involving transmission electron microscopy and fetal DNA amplification. *Prenat Diagn.* 1991;11(10):787-798. doi 10.1002/pd.1970111007
- Covone A.E., Mutton D., Johnson P.M., Adinolfi M. Trophoblast cells in peripheral blood from pregnant women. *Lancet.* 1984;2(8407):841-843. doi 10.1016/s0140-6736(84)90875-4
- Dhallan R., Guo X., Emche S., Damewood M., Bayliss P., Cronin M., Barry J., Betz J., Franz K., Gold K., Vallecillo B., Varney J. A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study. *Lancet.* 2007;369(9560):474-481. doi 10.1016/S0140-6736(07)60115-9
- Fan H.C., Blumenfeld Y.J., Chitkara U., Hudgins L., Quake S.R. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(42):16266-16271. doi 10.1073/pnas.0808319105
- Friedman J., Hastie T., Tibshirani R. Regularization paths for generalized linear models via coordinate descent. *J Statist Software.* 2010;33(1):1-22. doi 10.18637/jss.v033.i01
- Gil M.M., Accurti V., Santacruz B., Plana M.N., Nicolaides K.H. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017;50(3):302-314. doi 10.1002/uog.17484
- Harrow J., Frankish A., Gonzalez J.M., Tapanari E., Diekhans M., Kokocinski F., Aken B.L., ... Valencia A., Raymond A., Gerstein M., Guigó R., Hubbard T.J. GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. *Genome Res.* 2012;22(9):1760-1774. doi 10.1101/gr.135350.111
- Holzgreve W., Garritsen H.S., Ganshirt-Ahlert D. Fetal cells in the maternal circulation. *J Reprod Med.* 1992;37(5):410-418
- Hui L., Bianchi D.W. Fetal fraction and noninvasive prenatal testing: what clinicians need to know. *Prenat Diagn.* 2020;40(2):155-163. doi 10.1002/pd.5620
- Kim S.K., Hannum G., Geis J., Tynan J., Hogg G., Zhao C., Jensen T.J., Mazloom A.R., Oeth P., Ehrich M., van den Boom D., Deciu C. Determination of fetal DNA fraction from the plasma of pregnant women using sequence read counts. *Prenat Diagn.* 2015;35(8):810-815. doi 10.1002/pd.4615
- Kuhn M. Building predictive models in R using the caret package. *J Stat Softw.* 2008;28(5):1-26. doi 10.18637/jss.v028.i05
- Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.* 2012;9(4):357-359. doi 10.1038/nmeth.1923
- Li Y.Q., Tan G.J., Zhou Y.Q. Digital PCR and its applications in noninvasive prenatal testing. *Brief Funct Genomics.* 2022;21(5):376-386. doi 10.1093/bfpg/elac024
- Lo Y.M., Corbetta N., Chamberlain P.F., Rai V., Sargent I.L., Redman C.W., Wainscoat J.S. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997;350(9076):485-487. doi 10.1016/S0140-6736(97)02174-0
- Lo Y.M., Tein M.S., Lau T.K., Haines C.J., Leung T.N., Poon P.M., Wainscoat J.S., Johnson P.J., Chang A.M., Hjelm N.M. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet.* 1998;62(4):768-775. doi 10.1086/301800
- Lui Y.Y., Chik K.W., Chiu R.W., Ho C.Y., Lam C.W., Lo Y.M. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem.* 2002;48(3):421-427. doi 10.1093/clinchem/48.3.421
- Pantiukh K.S., Chekanov N.N., Zaigrin I.V., Zotov A.M., Mazur A.M., Prokhortchouk E.B. Report on noninvasive prenatal testing: classical and alternative approaches. *F1000Res.* 2016;5:722. doi 10.12688/f1000research.8243.1
- Pedregosa F., Varoquaux G., Gramfort A., Michel V., Thirion B., Grisel O., Blondel M., ... Passos A., Cournapeau D., Brucher M., Perrot M., Duchesnay E. Scikit-learn: machine learning in Python. *J Mach Learn Res.* 2011;12(85):2825-2830
- Peng Q., Xu C., Kim D., Lewis M., DiCarlo J., Wang Y. Targeted single primer enrichment sequencing with single end duplex-UMI. *Sci Rep.* 2019;9(1):4810. doi 10.1038/s41598-019-41215-z

- Satam H., Joshi K., Mangrolia U., Waghoo S., Zaidi G., Rawool S., Thakare R.P., Banday S., Mishra A.K., Das G., Malonia S.K. Next-generation sequencing technology: current trends and advancements. *Biology*. 2023;12(7):997. doi 10.3390/biology12070997
- Schmitt M.W., Fox E.J., Prindle M.J., Reid-Bayliss K.S., True L.D., Radich J.P., Loeb L.A. Sequencing small genomic targets with high efficiency and extreme accuracy. *Nat Methods*. 2015;12(5):423-425. doi 10.1038/nmeth.3351
- Sheffield N.C., Thurman R.E., Song L., Safi A., Stamatoyannopoulos J.A., Lenhard B., Crawford G.E., Furey T.S. Patterns of regulatory activity across diverse human cell types predict tissue identity, transcription factor binding, and long-range interactions. *Genome Res*. 2013;23(5):777-788. doi 10.1101/gr.152140.112
- Simpson J.L., Elias S. Isolating fetal cells from maternal blood. *JAMA*. 1993;270(19):2357-2361
- Simpson J.L., Elias S. Isolating fetal cells in maternal circulation for prenatal diagnosis. *Prenat Diagn*. 1994;14(13):1229-1242. doi 10.1002/pd.1970141308
- Thurman R.E., Rynes E., Humbert R., Vierstra J., Maurano M.T., Haugen E., Sheffield N.C., ... Kaul R., Furey T.S., Dekker J., Crawford G.E., Stamatoyannopoulos J.A. The accessible chromatin landscape of the human genome. *Nature*. 2012;489(7414):75-82. doi 10.1038/nature11232
- Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(15):e115. doi 10.1093/nar/gks596
- van Beek D.M., Straver R., Weiss M.M., Boon E.M.J., Huijssdens-van Amsterdam K., Oudejans C.B.M., Reinders M.J.T., Sistermans E.A. Comparing methods for fetal fraction determination and quality control of NIPT samples. *Prenat Diagn*. 2017;37(8):769-773. doi 10.1002/pd.5079
- Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. New York: Springer-Verlag, 2016
- Youden W.J. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*. 1950;3(1):32-35. doi 10.1002/1097-0142(1950)3:1%3C32::aid-cnrcr2820030106%3E3.0.co;2-3
- Zhang L., Chen L., Yu Y., Wu Z., Zhao M., Wang P., Liu Z., Dai J., Li Y., Wang M. Digital PCR in prenatal diagnosis. *Clin Chim Acta*. 2026;578:120535. doi 10.1016/j.cca.2025.120535

Конфликт интересов. Мазур А.М. является директором по науке в ООО «Геноаналитика» – компании, занимающейся разработкой НИПТ. Однако данное исследование не финансировалось компанией «Геноаналитика» и не было связано с коммерческими интересами компании. Поступила в редакцию 18.12.2025. После доработки 06.02.2026. Принята к публикации 09.02.2026.

doi 10.18699/vjgb-26-68

Парадигма соматического мозаицизма при многофакторных заболеваниях

А.А. Слепцов ^{1, 2} , М.С. Назаренко ^{1, 2} , В.П. Пузырев ¹

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Томск, Россия

² Тюменский кардиологический научный центр – филиал Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Тюмень, Россия

 alexei.sleptcov@medgenetics.ru

Аннотация. Многофакторные заболевания (МФЗ) характеризуются сложной этиологией, включающей взаимодействие полигенных/олигогенных наследственных детерминант и факторов среды, а также выраженным клиническим полиморфизмом, генетической гетерогенностью, плейотропией генетических вариантов, вариабельной пенетрантностью и экспрессивностью. Достижения в области секвенирования геномов популяций существенно расширили понимание наследственной архитектуры МФЗ, однако герминативные варианты объясняют лишь часть наблюдаемой фенотипической вариабельности. Внедрение методов глубокого секвенирования ДНК и мультиомиксного анализа отдельных клеток позволило выявить дополнительную, ранее недооцененную категорию факторов риска, а именно соматические мутации, непрерывно накапливающиеся в клетках на протяжении онтогенеза и формирующие мозаичную генетическую конституцию организма (соматический мозаицизм). В настоящем обзоре рассматривается роль соматических мутаций в этиопатогенезе МФЗ с позиции их сочетанного вклада с герминативными детерминантами в формирование патологического фенотипа. Особое внимание уделено феномену клонального гемопоэза неопределенного потенциала как наиболее изученной модели соматического мозаицизма, ассоциированного с возраст-зависимой патологией. Показано, что взаимодействие соматических и герминативных вариантов реализуется в клетках в специфических тканевых контекстах через механизмы клональной селекции, стохастического клонального дрейфа и эпигенетической дисрегуляции, приводящих к дисфункции органов. В рамках концепции соматического мозаицизма в работе обосновывается механизм селекции, альтернативный классическому онкогенезу. Данный путь определяется как «пассивная клональная доминантность» и описывает селекцию как персистенцию клонов, получивших преимущество не за счет пролиферации, а благодаря резистентности к апоптозу в условиях хронического стресса. Такой механизм может быть особенно важен для постмитотических тканей, таких как миокард и нервная ткань. С практической точки зрения рассмотренные соматические варианты представляют потенциальный интерес в качестве кандидатных биомаркеров для предиктивной диагностики и стратификации риска МФЗ, что требует дальнейшей клинической валидации. Более того, они указывают на патофизиологические пути, потенциально открывающие мишени для таргетной терапии, направленной на модуляцию клонального состава и предотвращение прогрессирования заболеваний. В заключение даны перспективы и направления изучения соматического мозаицизма в контексте МФЗ, включая потенциал технологий динамического отслеживания клеточных линий для экспериментальной верификации предложенных механизмов клональной селекции. Отмечена важность интеграции данных о соматических и герминативных генетических вариантах в единые модели оценки индивидуального риска заболеваний.

Ключевые слова: соматические мутации; сердечно-сосудистые заболевания; клональный гемопоэз; многофакторные заболевания

Для цитирования: Слепцов А.А., Назаренко М.С., Пузырев В.П. Парадигма соматического мозаицизма при многофакторных заболеваниях. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(4):676-684. doi 10.18699/vjgb-26-68

Финансирование. Работа выполнена при частичной поддержке внутреннего гранта Томского НИМЦ «Клональный гемопоэз неопределенного потенциала как фактор риска хронической сердечной недостаточности: роль соматических мутаций и системного воспаления».

The paradigm of somatic mosaicism in complex diseases

А.А. Sleptcov ^{1, 2} , М.С. Nazarenko ^{1, 2} , V.P. Puzyrev ¹

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

² Tyumen Cardiology Research Center – Branch of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tyumen, Russia

 alexei.sleptcov@medgenetics.ru

Abstract. The multifactorial etiology of complex diseases involves the interplay of polygenic/oligogenic susceptibility loci and environmental factors. Complex diseases are characterized by pronounced phenotypic variability, genetic heterogeneity, pleiotropy of genetic variants, variable penetrance, and expressivity. Advances in population-wide genomic sequencing have expanded our understanding of the genetic architecture of complex diseases significantly;

however, germline variants explain only a fraction of the observed phenotypic variability. The introduction of deep DNA sequencing and single-cell multi-omics analysis has revealed an additional, previously underestimated category of risk factors: somatic mutations that continuously accumulate in cells throughout an individual's lifespan, giving rise to genetic mosaicism. This review considers the role of somatic mutations in the pathogenesis of complex diseases in the context of their combined contribution with germline determinants to the formation of disease phenotypes. Particular attention is paid to clonal hematopoiesis of indeterminate potential as the best-studied model of somatic mosaicism associated with age-related conditions. It is demonstrated that the interaction of somatic and germline variants occurs within specific tissue contexts through mechanisms of clonal selection, stochastic clonal drift, and epigenetic dysregulation, causing organ dysfunction. Within the concept of somatic mosaicism, this work suggests a selection mechanism alternative to classical oncogenesis. This pathway, defined as "passive clonal dominance", describes selection through the persistence of clones that gain advantage not via proliferation but through resistance to apoptosis under chronic stress, which may be particularly relevant to post-mitotic tissues such as the heart muscle and nervous tissue. From a practical standpoint, the somatic variants discussed herein are of interest as candidate biomarkers for predictive diagnostics and risk stratification of complex diseases, pending clinical validation. Moreover, they point to pathophysiological pathways that may reveal targets for therapies aimed at modulating clonal composition and preventing disease progression. The paper also discusses prospects for studying somatic mosaicism in the context of complex diseases, including the potential of dynamic lineage tracing technologies for experimental verification of the proposed clonal selection mechanisms, as well as the need to integrate somatic and germline genetic variant data into unified models for individual disease risk assessment.

Key words: somatic mutations; cardiovascular diseases; clonal hematopoiesis; complex/common diseases

For citation: Sleptcov A.A., Nazarenko M.S., Puzyrev V.P. The paradigm of somatic mosaicism in complex diseases. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(4):676-684. doi 10.18699/vjgb-26-68

Введение

Многофакторные заболевания (МФЗ) характеризуются широкой распространенностью и разнообразием нозологических форм в популяции. Хотя для данных патологий несвойственно менделевское наследование в его классическом понимании, наблюдается семейное накопление, описываемое с помощью моделей полигенной или олигогенной наследственной передачи с существенным вкладом факторов среды, причем соотношение генетических и средовых детерминант уникально для каждого индивида даже в рамках одной нозологической формы.

Фенотипическое проявление МФЗ подчиняется ключевым принципам генетики, включая клинический полиморфизм, генетическую гетерогенность, выраженную плейотропию генетических вариантов, а также вариабельную пенетрантность и экспрессивность, степень которых модулируется как полигенным фоном, так и факторами внешней среды.

Патологический фенотип при МФЗ дополнительно обладает многоуровневой гетерогенностью (молекулярной, клеточной, тканевой), динамичностью развития во времени и пространственной (регионарной) специфичностью, обусловленной различиями в микроокружении и профиле экспрессии генов в разных органах и тканях-мишенях. В частности, наблюдается значительная гетерогенность между пациентами с определенным МФЗ в отношении как клинических симптомов, так и основных причинных механизмов.

В отличие от герминативных мутаций, передающихся по наследству, соматические генетические варианты имеют в большей степени спорадическое происхождение и демонстрируют непрерывную аккумуляцию в клетках на протяжении всего онтогенеза, характер которой варьирует от приблизительно линейного в постмитотических тканях до нелинейного в условиях клональной селекции (Lodato et al., 2018; Brunner et al., 2019). Это формирует мозаичную генетическую конституцию организма – *соматический*

мозаицизм, представляющий собой форму постзиготической генетической изменчивости соматических клеток, модулирующую фенотипические особенности индивида. Сопутствующая эпигенетическая вариабельность между клеточными клонами может дополнительно усиливать фенотипическую гетерогенность.

Настоящий обзор посвящен феноменологии соматического мозаицизма в контексте этиопатогенеза МФЗ. Особое внимание уделяется соматическим генетическим вариантам, которые рассматриваются не только как факторы модификации унаследованной предрасположенности в конкретных тканевых контекстах, но и как самостоятельные детерминанты, способные инициировать и направлять патологический процесс через механизмы клональной селекции клеток, а также стохастического клонального дрейфа и эпигенетическую дисрегуляцию, модифицирующие мозаичную архитектуру ткани.

Соматические генетические варианты и многофакторные заболевания

В процессе эмбриогенеза высокая скорость клеточных делений в условиях укороченных клеточных циклов с редуцированными контрольными точками приводит к накоплению первичных *de novo* мутаций. В случае сохранения жизнеспособности и пролиферативной активности клетки-предшественницы, несущей такую мутацию, формируется клон, геном которого отличается от конституционального генома зародышевой линии.

У взрослых организмов соматические мутации возникают повсеместно, однако их накопление и клональная экспансия преимущественно происходят в тканях с высоким индексом клеточного обновления, таких как гемопоэтическая система и эпителий барьерных тканей, либо в паренхиматозных органах в условиях хронического повреждения и регенерации. Повторяющиеся циклы деления клеток увеличивают вероятность возникновения соматических мутаций, среди которых особое значение имеют

«драйверные» мутации в генах, непосредственно регулирующих клеточный цикл, пролиферацию и выживаемость клеток.

Наряду с ними накапливаются нейтральные «пассажиры» мутации, не оказывающие прямого влияния на приспособленность клеток. Вместе с тем часть мутаций, формально не относящихся к классическим «драйверам» онкогенеза, может оказывать опосредованное влияние на выживаемость клеток через модуляцию метаболических путей, ответа на стресс или межклеточных взаимодействий в микроокружении, обеспечивая *селективное преимущество* в определенных тканевых контекстах.

Возрастное снижение эффективности репарации ДНК способствует накоплению соматических генетических вариантов, некоторые из которых обеспечивают клеткам селективное преимущество. В условиях истощения регенеративного потенциала тканей это стимулирует кло-

нальную экспансию наиболее жизнеспособных клеточных популяций. В результате в тканях формируются мозаичные клональные популяции, определяющие уровень внутри-организменной генетической гетерогенности, совокупный масштаб которой в отдельных тканях нередко может превосходить уровень межиндивидуального генетического разнообразия на популяционном уровне (Harris, 2025).

Соматический мутагенез исторически был центральным объектом исследования в геномике злокачественных новообразований, поскольку накопление «драйверных» мутаций в онкогенах и генах-супрессорах опухолей рассматривается как ключевой этап в патогенезе рака.

Достижения в методах геномного анализа, такие как секвенирование нового поколения и анализ отдельных клеток, позволили выявить «неонкологические» МФЗ, при которых происходит накопление соматических мутаций различных классов (см. таблицу).

Соматические генетические варианты при многофакторных заболеваниях

Тип соматической мутации	Патология	Ткань, орган	PMID*
Структурные и числовые аномалии хромосом	Самопроизвольное прерывание беременности (выкидыш)	Ткани зародыша и лейкоциты родителей	11675616
Крупные клональные мозаичные перестройки хромосом (>2 Мб); варибельность числа копий участков ДНК (CNV); потеря гетерозиготности (LOH); однонуклеотидные замены	Злокачественные новообразования	Лейкоциты, опухоль	22561519, 22561516
	Нейропсихические заболевания: умственная отсталость, аутизм, эпилепсия, биполярные нарушения, шизофрения, аномалии поведения	Лейкоциты, головной мозг	23828942, 23888031
Крупные клональные мозаичные перестройки хромосом (>2 Мб)	Сахарный диабет 2-го типа с сосудистыми осложнениями	Лейкоциты	23852171
Варибельность числа копий участков ДНК	Бронхиальная астма у детей	Лейкоциты	19728390, 30262839
Однонуклеотидные замены	Болезнь Альцгеймера с ранним началом	Лейкоциты, головной мозг	30670873, 31300647, 35444284
	Фибрилляция предсердий	Лейкоциты, миокард	16790700, 20606116
	Врожденные пороки сердца	Лейкоциты, слюна, миокард	29729027, 32349777
	Венозные мальформации	Лейкоциты, сосуды	19079259
	Церебральные кавернозные мальформации	Лейкоциты, сосуды	33729480, 34496175, 36995941, 41366709, 35852613
	Эндометриоз	Эндометрий	30110635
Воспалительные заболевания кишечника	Кишечные крипты	32697969	
Атеросклероз, аномалии развития сосудов, аневризма аорты, сердечная недостаточность, болезнь Альцгеймера, сахарный диабет 2-го типа, а также хронические заболевания печени и почек		Лейкоциты	40175709, 31406340, 34298011, 33731931, 31672865, 33057201, 28636844, 37046084, 37197843
			33432195
Аутизм		Лейкоциты «трио» и других членов семьи	33432195

* ID публикации в системе PubMed.

Существенная часть постзиготических мутаций, скорее всего, не может быть обнаружена вследствие *негативной селекции*. Вредные генетические варианты, приводящие к потере функции ключевых генов, инициируют апоптоз или необратимую остановку клеточного цикла в пораженных клетках, что делает их «невидимыми» для стандартных методов геномного анализа.

Секвенирование ДНК в формате «трио» (мать-отец-ребенок) позволяет идентифицировать мутации *de novo*, возникшие в зародышевой линии. В то же время детекция соматических вариантов требует сравнительного анализа различных тканей одного индивида, а также применения методов глубокого секвенирования или технологий секвенирования отдельных клеток для выявления низкоуровневого мозаицизма (Shao et al., 2025).

Недавние исследования, основанные на секвенировании генома отдельных клеток, пересматривают традиционные представления о бремени соматических мутаций в постмитотических тканях. Показано, что нейроны здорового взрослого человека могут нести более 1000 соматических однонуклеотидных вариантов (SNV) на клетку, что значительно превышает более ранние оценки (Lodato et al., 2018).

Аналогичным образом исследование 48 кардиомиоцитов от 10 здоровых доноров разного возраста показало, что единичный кардиомиоцит может содержать от 4000 до 30000 соматических SNV, причем количество мутаций демонстрирует выраженную корреляцию с возрастом донора (Choudhury et al., 2022). Эти данные, полученные прямым подсчетом мутаций в отдельных клетках, свидетельствуют о том, что накопление соматических SNV является масштабным и повсеместным процессом в непролиферирующих клетках организма, потенциально вносящим вклад в их естественное старение и предрасположенность к заболеваниям.

Постзиготические мутации представляют собой принципиально иной, менделевский источник фенотипической изменчивости, способный как модифицировать пенетрантность и экспрессивность унаследованной предрасположенности, так и самостоятельно инициировать патологические процессы через механизмы клональной селекции клеток в тканях-мишенях. Тем самым соматический мозаицизм может выступать не только в роли модификатора унаследованной предрасположенности, но и в качестве самостоятельного патогенетического фактора, вносящего вклад в развитие заболевания в определенных клинических контекстах.

Ниже рассмотрена роль соматических мутаций в формировании МФЗ на примере сердечно-сосудистых патологий.

Соматическая варибельность генома при сердечно-сосудистых заболеваниях

Соматический мутагенез, формирующий тканевую мозаицизм, затрагивает, наряду с паренхиматозными клетками органов-мишеней, также и клетки крови. В гемопоэтической системе этот процесс манифестирует в форме клонального гемопоэза (clonal hematopoiesis, CH), при котором гемопоэтическая стволовая клетка (ГСК), несущая опреде-

ленную «драйверную» мутацию, приобретает селективное преимущество, инициирующее ее клональную экспансию.

Особое значение имеет феномен клонального гемопоэза неопределенного потенциала (clonal hematopoiesis of indeterminate potential, CHIP), определяемый как присутствие в периферической крови клональной популяции клеток с соматическими мутациями в генах, ассоциированных с гемобластомами, при отсутствии у индивида признаков миелодисплазии, лейкоза или иного гематологического новообразования (Jaiswal et al., 2014; Khoury et al., 2022).

Интенсивное изучение CHIP в последние годы закрепило за ним статус независимого фактора риска развития МФЗ и существенно расширило понимание патогенетического значения соматического мозаицизма, продемонстрировав, что мутантные гемопоэтические клоны способны индуцировать состояние системного хронического «стерильного» воспаления.

Патогенетическая значимость данного феномена обусловлена приобретением мутантными клонами иммунных клеток (в первую очередь макрофагами) аномальной провоспалительной активности. Их способность к гиперпродукции цитокинов формирует состояние хронического системного воспаления низкой интенсивности (low-grade inflammation). Именно этот процесс рассматривается как ключевое звено, через которое CHIP вносит вклад в повышенный риск развития атеросклероза, ишемической болезни сердца, сердечной недостаточности и других возраст-ассоциированных патологий (Jaiswal et al., 2017).

Отдельно стоит отметить, что патогенное влияние соматического мозаицизма на сердечно-сосудистую систему не ограничивается областью гемопоэза. Параллельным и не менее значимым механизмом является олигоклональная экспансия резидентных клеток сосудистой стенки, прежде всего гладкомышечных клеток. В ответ на повреждение или атерогенные стимулы отдельные клетки-предшественницы приобретают способность к доминированию, формируя клональные кластеры внутри атеросклеротической бляшки, что фундаментально влияет на ее стабильность и динамику роста (Lin et al., 2023).

Клональный гемопоэз неопределенного потенциала при сердечно-сосудистых заболеваниях: молекулярные механизмы и основные детерминанты данного феномена

В соответствии с общепринятыми критериями, предложенными Steensma с коллегами (2015), мутации при фенотипе CHIP характеризуются частотой вариантного аллеля (VAF) $\geq 2\%$ и затрагивают относительно ограниченный спектр генов-«драйверов» гемопоэза, включая *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *JAK2* и др. (Steensma et al., 2015). Следует подчеркнуть, что этот порог обусловлен пределом чувствительности стандартного секвенирования нового поколения и не исключает патогенетической значимости клонов с более низкой VAF.

Распространенность данного состояния коррелирует с возрастом. При стандартном пороге детекции (VAF $\geq 2\%$) она достигает 15–20% в когорте лиц старше 70 лет, тогда как применение методов глубокого секвенирования с

повышенной чувствительностью выявляет существенно более высокую частоту низкоуровневых клонов. Надо отметить, что фенотип СНП, хотя и не сопровождается клинически выраженной цитопенией, демонстрирует ассоциацию с субклиническими изменениями эритроцитарных индексов, в первую очередь с увеличением ширины распределения эритроцитов и среднего объема эритроцита (Acuna-Hidalgo et al., 2017; Walsh et al., 2022).

У индивидов с СНП относительный риск развития злокачественных новообразований системы кроветворения, согласно ряду когортных исследований, повышен приблизительно в 10–13 раз, хотя данная оценка существенно варьирует в зависимости от размера клона и спектра «драйверных» мутаций (Genovese et al., 2014; Jaiswal et al., 2014).

Риск манифестации ишемической болезни сердца (ИБС) зависит от специфики мутировавшего гена-драйвера при СНП. Так, наличие мутаций в генах *DNMT3A*, *TET2* или *ASXL1* сопряжено с двукратным повышением риска развития ИБС, тогда как носительство мутации *JAK2* (p.Val617Phe) ассоциировано с 12-кратным увеличением относительного риска, что, по всей видимости, опосредовано сопутствующим субклиническим миелопролиферативным фенотипом (Jaiswal et al., 2017).

Установлена прямая корреляция между размером мутантного клона (VAF) и выраженностью атеросклеротического поражения сосудистого русла, оцениваемого по коронарному кальциевому индексу (индекс Агатстона). В когорте пациентов с СНП регистрируется высокая частота развития ишемического инсульта и иных сердечно-сосудистых событий, что и определяет повышенные показатели общей смертности в данной группе.

Хотя панель генов, ассоциированных с СНП, включает до сотни позиций, мутации в генах *DNMT3A*, *TET2* и *ASXL1* составляют большинство случаев и выявляются у значительной доли пациентов с ИБС, имеющих СНП (Jaiswal et al., 2017). Мутации “loss-of-function” в генах *DNMT3A* и *TET2* в мышечных моделях приводят к нарушению эпигенетического контроля, что проявляется в усилении самообновления ГСК, ослаблении их дифференцировки и последующей клональной доминантности в гемопоэтической системе (Challen et al., 2011; Moran-Crusio et al., 2011).

Молекулярный патогенез при мутациях *DNMT3A* реализуется через фокальное гипометилирование специфических геномных локусов и последующую aberrантную дерепрессию генов, регулирующих самообновление ГСК (включая *Нох*-кластер, в частности *НОХА5*, *НОХА7* и *НОХА9*), тогда как утрата функции *TET2* приводит к нарушению окислительного деметилирования и, как следствие, к фокальной персистенции 5-метилцитозина в регуляторных регионах генома, что нарушает энхансерный ландшафт и блокирует терминальную дифференцировку миелоидных предшественников (Challen et al., 2011; Moran-Crusio et al., 2011).

Несмотря на то что модификация гистонов, опосредованная белком ASXL1, признана фундаментальным процессом для поддержания нормального гемопоэза, деталь-

ные молекулярные механизмы, обеспечивающие селективное преимущество мутантных клеток в условиях возрастного клонального гемопоэза, остаются не до конца выясненными (Yamamoto et al., 2021).

В то время как роль белка ASXL1 «дикого» типа заключается в обеспечении прецизионного эпигенетического контроля через регуляцию репрессивных комплексов, патогенез СНП неразрывно связан с формированием специфических мутаций (преимущественно мутаций со сдвигом рамки считывания в экзоне 12). Известно, что мутации *ASXL1* приводят к синтезу стабильного «усеченного» белка (ASXL1-trunc), обладающего свойствами “gain-of-function”. Данная форма белка активно дестабилизирует комплекс PRC2, одновременно усиливая взаимодействие с деубиквитиназой VAP1 в составе комплекса PR-DUB. Результатом этого синергичного воздействия становится глобальное снижение уровня метилирования H3K27me3 и aberrантная де-репрессия критических лейкомогенных локусов, в том числе генов кластера *НОХА*, что может обеспечивать селективное преимущество мутантным клеткам (Inoue et al., 2016; Nagase et al., 2018; Yang et al., 2018).

Соматические мутации в генах *JAK2*, *PPM1D* и *TP53*, ассоциированные с СНП, выявляются у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и вносят вклад в их патогенез, причем мутации в *TP53* и *PPM1D*, в отличие от *TET2* и *DNMT3A*, часто возникают как адаптивный ответ на стресс (например, химиотерапию) и ассоциированы с более агрессивным клоном. Тирозинкиназа *JAK2* функционирует как ключевой элемент сигнального каскада JAK/STAT (трансдуктор сигнала и активатор транскрипции). Присутствие соматических «активирующих» мутаций индуцирует конститутивную активность киназного домена, что обеспечивает цитокин-независимую пролиферацию и определяет селективное преимущество мутантного клона (Kralovics et al., 2005).

Белок p53, кодируемый геном *TP53*, является центральным регулятором ответа на повреждение ДНК (DNA damage response, DDR) и клеточный стресс. Гемопоэтические стволовые клетки, несущие мутации “loss-of-function” в *TP53*, приобретают селективное преимущество за счет уклонения от апоптоза и нарушения механизмов клеточного старения, что приводит к клональной доминантности в условиях конкурентного взаимодействия с клетками дикого типа (Bondar, Medzhitov, 2010). Дополнительным фактором клонального преимущества клеток с мутациями в гене *TP53* может быть повышение толерантности к окислительному стрессу и генотоксическому воздействию. PPM1D также является частью пути DDR в качестве негативного регулятора p53, а мутации «усечения» в экзоне 6 обеспечивают пролиферативное преимущество ГСК за счет повышенной устойчивости к p53-опосредованному апоптозу (Hsu et al., 2018).

Хотя мутации СНП регистрируются в соматических клетках, все больше данных свидетельствует о наличии наследственной предрасположенности к их формированию в ГСК. В 2009 г. GWAS выявил связь SNV (rs10974944), маркирующего гаплотип 46/1 гена *JAK2*, с предрасположенностью к приобретению соматической мутации

p.Val617Phe в *JAK2* и последующим развитием миелопролиферативных новообразований (Kilpivaara et al., 2009).

Позднее была установлена твердая ассоциация генетических вариантов и гена *TERT* (в частности, rs144418061), кодирующего ключевой ферментативный компонент теломеразного комплекса для поддержания длины теломер, а также полиморфизма в локусе *TCL1A* (rs2887399) с риском формирования СНП (Bick et al., 2020).

Более того, генетический анализ выявил частичное перекрытие между локусами, предрасполагающими к приобретению соматических мутаций СНП (так называемая наследуемость предрасположенности к соматическим мутациям), и локусами, ассоциированными с риском сердечно-сосудистых заболеваний по данным GWAS. Это наблюдение подтверждает наличие общих герминальных детерминант, модулирующих индивидуальный профиль риска посредством воздействия одновременно на кинетику клональной экспансии мутантных ГСК и на резистентность сосудистой стенки через независимые патогенетические пути, что считается проявлением генетической плейотропии.

Общая кинетика клональной экспансии мутантных ГСК находится под строгим контролем эпигенетических механизмов регуляции генома. Исследования подтверждают наличие строгой корреляции между скоростью роста мутантного клона и показателями эпигенетического старения, которые оцениваются как посредством прямого профилирования метилирования ДНК, так и на основе генетических предикторов. Установлено, что маркеры биологического возраста, включая алгоритмы PhenoAge, GrimAge и HannumAge, демонстрируют положительную ассоциацию как с самим фактом наличия СНП, так и со скоростью пролиферации клональных гемопоэтических клеток (Nachun et al., 2021; Mack et al., 2024).

Наряду с конституциональными и эндогенными детерминантами, на динамику клональной экспансии мутантных ГСК существенное влияние оказывают экзогенные стрессоры и провоспалительный фон. Курение и ятрогенные вмешательства (в первую очередь цитотоксическая терапия) увеличивают частоту возникновения соматических мутаций. Системное хроническое воспаление действует преимущественно как фактор селекции клонов клеток. В совокупности эти процессы создают адаптивное преимущество для клонов, резистентных к апоптозу и цитотоксическому воздействию.

Феномен клонального гемопоэза демонстрирует значимую ассоциацию не только с прогрессированием атеросклероза и тромбоэмболическими осложнениями, но и с широким кругом гетерогенных возраст-зависимых состояний, что позволяет рассматривать его как один из ключевых факторов системного воспалительного старения (inflammaging). Спектр коморбидных патологий включает фибрилляцию предсердий, сердечную недостаточность, аневризму брюшного отдела аорты, венозные тромбоэмболии, а также нейродегенеративные процессы альцгеймеровского типа и метаболические нарушения, в частности сахарный диабет 2-го типа (Schuermans, Honigberg, 2025).

Исследования на мышинных моделях, в частности трансплантация костного мозга от мышей с нокаутом *Tet2* или

Dnmt3a, демонстрируют, что СНП-ассоциированные клоны макрофагов и других миелоидных производных продуцируют избыточное количество провоспалительных цитокинов и хемокинов, таких как IL-1 β , IL-6 и CXCL2. Данная персистирующая провоспалительная сигнализация индуцирует дисфункцию периферических тканей и органов-мишеней, инициируя развитие инсулинорезистентности и нарушение тканевого гомеостаза. В совокупности эти патофизиологические сдвиги воспроизводят полисистемный фенотип ускоренного старения, наблюдаемый в клинической практике (Schuermans, Honigberg, 2025).

Специфической формой клонального мозаицизма является мозаичная потеря Y-хромосомы (mLOY) в лейкоцитах периферической крови, которая представляет собой наиболее частое соматическое событие у мужчин. Данный феномен ассоциирован с повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний, в частности с развитием кардиофиброза и сердечной недостаточности (Sano et al., 2022), а также с тяжелым течением нейродегенеративных процессов (Ljungström et al., 2022). У мужчин с выраженной mLOY наблюдается тенденция к повышению VAF мутаций, характерных для СНП, что указывает на вероятное сосуществование этих событий в одном и том же клоне. Совокупность имеющихся данных свидетельствует о частом одновременном возникновении СНП и mLOY в процессе старения, что позволяет интерпретировать их как потенциально взаимосвязанные проявления общих возрастных изменений клональной архитектуры костного мозга (Ljungström et al., 2022).

Несмотря на выявленные взаимосвязи, детализация молекулярных каскадов, связывающих СНП с широким спектром МФЗ, требует дальнейших изысканий. В качестве теоретической модели для объяснения механизмов селекции клеток рассматривается и концепция, аналогичная феномену «парадоминантности» (Happle, 1993), согласно которой соматическая мутация, возникающая на фоне конституционального гетерозиготного носительства в идентичном локусе, приводит к биаллельной инактивации и локальной манифестации патологического фенотипа на ранней стадии онтогенеза. Однако применимость подобной модели на гены-драйверы СНП (в частности, *TET2* или *DNMT3A*) остается предметом дискуссии, поскольку клонально значимый фенотип в данном контексте нередко формируется уже в условиях моноаллельной инактивации.

Вместе с тем теоретический потенциал описанной модели заключается в возможности предложить механистическое объяснение феноменам неполной пенетрантности и вариабельной экспрессивности МФЗ (Пузырев и др., 2014). Это представляется особенно релевантным для генов-драйверов, конституциональная гомозиготная инактивация которых часто приводит к тяжелым дефектам развития или несовместима с эмбриогенезом.

Заключение и перспективы изучения соматического мозаицизма в контексте МФЗ

Детализация вклада соматического мозаицизма в этиопатогенез МФЗ открывает перспективы для разработки принципиально новых стратегий молекулярной диагностики и терапевтических вмешательств. Эти подходы должны

быть направлены не только на орган-мишень, но и на селективную элиминацию или репрограммирование специфических патогенных клонов, вносящих вклад в прогрессию патологии, резистентность к терапии и клинический полиморфизм заболевания. Критическим императивом данной терапевтической парадигмы является обязательный учет временной динамики клональной архитектуры. Композиция и объем патогенных клонов демонстрируют временную нестабильность и подвержены модификации под влиянием селективного давления, включая цитотоксический эффект лечебных агентов.

Механизмы динамики клонов клеток рассматриваются преимущественно через призму *нейтрального дрейфа* (стохастическое замещение в отсутствие селективного давления, описанное для эпителия кишечника; Klein, Simons, 2011) или *позитивной селекции*, обеспечивающей пролиферативное преимущество мутантного клона в обновляющихся тканях (например, в гемопоэзе). При этом феномен соматического мозаицизма в постмитотических структурах, в частности, накопление мутаций в нейронах и кардиомиоцитах, часто интерпретируется лишь как пассивный процесс накопления *генетического шума*, сопровождающий старение (Lodato et al., 2018). Однако данные подходы не в полной мере объясняют потенциально неслучайный характер формирования мозаичного ландшафта в тканях с крайне низким пролиферативным потенциалом.

В настоящей работе предлагается концептуальная модель альтернативного механизма клональной селекции клеток в постмитотических тканях, определяемого как *пассивная клональная доминантность*, реализуемая посредством селекции на персистенцию. Под этим термином понимается увеличение относительной фракции клонов, обладающих не прямым пролиферативным преимуществом, а повышенной резистентностью к элиминации в условиях хронического стресса.

В пролиферирующих тканях (например, в гемопоэтической системе или эпителии) дарвиновский отбор благоприятствует клонам с мутациями, усиливающими пролиферацию и выживаемость («драйверные» мутации). Однако в функционально специализированных тканях с низким или отсутствующим регенераторным потенциалом, включая популяции кардиомиоцитов и нейронов, может реализовываться принципиально иной сценарий. В таких условиях преимущество получают не пролиферирующие клоны, а популяции «наименее уязвимых» клеток, характеризующихся повышенной резистентностью к элиминации в условиях хронического стресса, что приводит к изменению мозаичной архитектуры ткани на фоне элиминации клеток со стандартным порогом апоптоза.

Подобную селекцию клеток потенциально могут обеспечивать мутации, которые в специфическом микроокружении постмитотических тканей не дают прямого пролиферативного преимущества, но способствуют их выживанию, в частности, инактивация генов, контролирующих апоптоз, интегрированную стрессовую реакцию (integrated stress response, ISR) или метаболический гомеостаз. Увеличение представленности мутантного клона клеток в рамках данной модели реализуется не посредством митотиче-

ской активности, а за счет их длительной персистенции на фоне ускоренного апоптоза соседних клеток дикого типа, обладающих меньшей стрессоустойчивостью.

Логическим следствием является постепенное накопление функционально неполноценных, но резистентных к элиминации клеточных клонов, представляющее собой специфическую форму соматической эволюции, направляемой селективным давлением микросреды. Этот гипотетический процесс, при котором ткань обогащается клонами с сохраненной жизнеспособностью, но нарушенной функцией, может вносить вклад в возраст-зависимую дисфункцию ткани и клиническую манифестацию МФЗ наряду с другими известными механизмами, что требует экспериментальной верификации с применением продолжительных исследований и методов отслеживания клональной динамики *in vivo*.

Ключевым инструментом такой верификации может стать динамическое отслеживание клеточных линий (dynamic lineage tracing) – подход, который уже трансформировал понимание клональной архитектуры в гемопоэзе и может быть адаптирован для изучения постмитотических тканей. Базируясь на системах сайт-специфической рекомбинации (Cre-lox) с использованием полихроматических репортерных конструкций (например, системы Confetti или Rainbow) и методов высокопроизводительного секвенирования отдельных клеток (scRNA-seq), данный подход позволил впервые осуществить прямое наблюдение кинетики клональной экспансии в архитектуре ткани (McKenna, Gagnon, 2019).

Применительно к феномену CHIP, понимание которого было первоначально сформировано в ходе масштабных популяционных исследований методом секвенирования нового поколения, технологии отслеживания клеточных линий позволили перейти от констатации статического факта наличия мутантного клона к анализу его динамической истории (Haghverdi, Ludwig, 2023; Jindal et al., 2024). В частности, стало возможным определить иерархическую принадлежность клона, идентифицируя конкретную гемопоэтическую стволовую или прогениторную клетку, инициировавшую экспансию с мутациями в генах *DNMT3A*, *TET2* или *ASXL1*, и реконструировать полное филогенетическое дерево клона в нише костного мозга.

Наряду с этим данные методы позволили фиксировать конкурентную динамику клеток в реальном времени, к примеру пронаблюдать, как клон с драйверной мутацией (в частности, *JAK2* p.Val617Phe) осуществляет вытеснение клеток дикого типа в процессе старения или под воздействием провоспалительных стимулов (Haghverdi, Ludwig, 2023; Jindal et al., 2024). Наконец, на уровне отдельной клетки удалось соотнести факт принадлежности к мутантному клону с его функциональным статусом, транскриптомным профилем и эпигеномом, что позволило выявить детерминанты, обуславливающие инертность одних клонов и выраженный провоспалительный потенциал других (Xie, Zeidan, 2023; Jindal et al., 2024).

Применение подобных комплексных подходов к изучению биологии соматического мозаицизма имеет высокий потенциал для трансформации понимания молекулярных

событий, посредством которых соматические мутации перепрограммируют функции гемопоэтических и иных соматических клеток, индуцируя системное воспаление и повышая риск МФЗ (Jindal et al., 2024). Детализация механизмов клональной селекции, включая предложенную модель *пассивной клональной доминантности*, открывает перспективы для разработки таргетных вмешательств, направленных на модуляцию клональной архитектуры тканей, что, в свою очередь, может способствовать предотвращению широкого спектра возраст-ассоциированных патологий.

Список литературы / References

- Пузырев В.П., Назаренко М.С., Лебедев И.Н., Марков А.В., Слепцов А.А., Кашеварова А.А., Толмачева Е.Н., Фролов А.В., Попов А.В., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С. Феномен парадоминантного наследования при атеросклерозе. *Медицинская генетика*. 2014;13(10):10-17
[Puzyrev V.P., Nazarenko M.S., Lebedev I.N., Markov A.V., Sleptsov A.A., Kashevarova A.A., Tolmacheva E.N., Frolov A.V., Popov V.A., Barbarash O.L., Barbarash L.S. Phenomenon of parадомinant inheritance in atherosclerosis. *Medical Genetics*. 2014; 13(10):10-17 (in Russian)]
- Acuna-Hidalgo R., Sengul H., Steehouwer M., van de Vorst M., Vermeulen S.H., Kiemeneij L.A.L.M., Veltman J.A., Gilissen C., Hoi-schen A. Ultra-sensitive sequencing identifies high prevalence of clonal hematopoiesis-associated mutations throughout adult life. *Am J Hum Genet*. 2017;101(1):50-64. doi 10.1016/j.ajhg.2017.05.013
- Bick A.G., Weinstock J.S., Nandakumar S.K., Fulco C.P., Bao E.L., Zekavat S.M., Szeto M.D., ... Natarajan P. Inherited causes of clonal haematopoiesis in 97,691 whole genomes. *Nature*. 2020;586(7831): 763-768. doi 10.1038/s41586-020-2819-2
- Bondar T., Medzhitov R. p53-mediated hematopoietic stem and progenitor cell competition. *Cell Stem Cell*. 2010;6(4):309-322. doi 10.1016/j.stem.2010.03.002
- Brunner S.F., Roberts N.D., Wylie L.A., Moore L., Aitken S.J., Davies S.E., Sanders M.A., ... Abascal F., Stratton M.R., Martincorena I., Hoare M., Campbell P.J. Somatic mutations and clonal dynamics in healthy and cirrhotic human liver. *Nature*. 2019;574(7779): 538-542. doi 10.1038/s41586-019-1670-9
- Challen G.A., Sun D., Jeong M., Luo M., Jelinek J., Berg J.S., Bock C., ... Meissner A., Issa J.P., Godley L.A., Li W., Goodell M.A. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat Genet*. 2011;44(1):23-31. doi 10.1038/ng.1009
- Choudhury S., Huang A.Y., Kim J., Zhou Z., Morillo K., Maury E.A., Tsai J.W., ... Araten S., Hilal N., Lee E.A., Chen M.H., Walsh C.A. Somatic mutations in single human cardiomyocytes reveal age-associated DNA damage and widespread oxidative genotoxicity. *Nat Aging*. 2022;2(8):714-725. doi 10.1038/s43587-022-00261-5
- Genovese G., Kähler A.K., Handsaker R.E., Lindberg J., Rose S.A., Bakhoum S.F., Chambert K., ... Sullivan P.F., Sklar P., Grönberg H., Hultman C.M., McCarroll S.A. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2477-2487. doi 10.1056/NEJMoa1409405
- Haghverdi L., Ludwig L.S. Single-cell multi-omics and lineage tracing to dissect cell fate decision-making. *Stem Cell Rep*. 2023;18(1): 13-25. doi 10.1016/j.stemcr.2022.12.003
- Happle R. Mosaicism in human skin. Understanding the patterns and mechanisms. *Arch Dermatol*. 1993;129(11):1460-1470
- Harris K. An uneasy truce between population health and the gene pools within our bodies. *Nat Rev Genet*. 2025;26(7):441. doi 10.1038/s41576-025-00851-0
- Hsu J.I., Dayaram T., Tovy A., De Braekeleer E., Jeong M., Wang F., Zhang J., ... Vassiliou G., Futreal P.A., Donehower L.A., Takahashi K., Goodell M.A. PPMID mutations drive clonal hematopoiesis in response to cytotoxic chemotherapy. *Cell Stem Cell*. 2018; 23(5):700-713.e6. doi 10.1016/j.stem.2018.10.004
- Inoue D., Matsumoto M., Nagase R., Saika M., Fujino T., Nakayama K.I., Kitamura T. Truncation mutants of ASXL1 observed in myeloid malignancies are expressed at detectable protein levels. *Exp Hematol*. 2016;44(3):172-176.e1. doi 10.1016/j.exphem.2015. 11.011
- Jaiswal S., Fontanillas P., Flannick J., Manning A., Grauman P.V., Mar B.G., Lindsley R.C., ... Koistinen H.A., Ladenvall C., Getz G., Correa A., Ebert B.L. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2488-2498. doi 10.1056/NEJMoa1408617
- Jaiswal S., Natarajan P., Silver A.J., Gibson C.J., Bick A.G., Shvartz E., McConkey M., ... Melander O., Sukhova G.K., Neuberg D., Libby P., Ebert B.L. Clonal hematopoiesis and risk of atherosclerotic cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2017;377(2):111-121. doi 10.1056/NEJMoa1701719
- Jindal K., Adil M.T., Yamaguchi N., Yang X., Wang H.C., Kamimoto K., Rivera-Gonzalez G.C., Morris S.A. Single-cell lineage capture across genomic modalities with CellTag-multi reveals fate-specific gene regulatory changes. *Nat Biotechnol*. 2024;42(6):946-959. doi 10.1038/s41587-023-01931-4
- Khoury J.D., Solary E., Abla O., Akkari Y., Alaggio R., Apperley J.F., Bejar R., ... Wang W., Wood B., Xiao W., Yeung C., Hochhaus A. The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1703-1719. doi 10.1038/s41375-022- 01613-1
- Kilpivaara O., Mukherjee S., Schram A.M., Wadleigh M., Mullally A., Ebert B.L., Bass A., ... Offit K., Stone R.M., Gilliland D.G., Klein R.J., Levine R.L. A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2^{V617F}-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*. 2009;41(4):455-459. doi 10.1038/ng.342
- Klein A.M., Simons B.D. Universal patterns of stem cell fate in cycling adult tissues. *Development*. 2011;138(15):3103-3111. doi 10.1242/dev.06103
- Kralovics R., Passamonti F., Buser A.S., Teo S.S., Tiedt R., Passweg J.R., Tichelli A., Cazzola M., Skoda R.C. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352(17):1779-1790. doi 10.1056/NEJMoa051113
- Lin A., Brittan M., Baker A.H., Dimmeler S., Fisher E.A., Sluimer J.C., Misra A. Clonal expansion in cardiovascular pathology. *JACC Basic Transl Sci*. 2023;9(1):120-144. doi 10.1016/j.jacbts.2023.04.008
- Ljungström V., Mattsson J., Halvardson J., Pandzic T., Davies H., Rychlicka-Buniowska E., Danielsson M., Lacaze P., Cavalier L., Dumanski J.P., Baliakas P., Forsberg L.A. Loss of Y and clonal hematopoiesis in blood-two sides of the same coin? *Leukemia*. 2022; 36(3):889-891. doi 10.1038/s41375-021-01456-2
- Lodato M.A., Rodin R.E., Bohrsen C.L., Coulter M.E., Barton A.R., Kwon M., Sherman M.A., ... Hatem N.E., Ryu S.C., Woodworth M.B., Park P.J., Walsh C.A. Aging and neurodegeneration are associated with increased mutations in single human neurons. *Science*. 2018;359(6375):555-559. doi 10.1126/science.aao4426
- Mack T.M., Raddatz M.A., Pershad Y., Nachun D.C., Taylor K.D., Guo X., Shuldiner A.R., ... Smith A.V., Reiner A.P., Jaiswal S., Weinstein J.S., Bick A.G. Epigenetic and proteomic signatures associate with clonal hematopoiesis expansion rate. *Nat Aging*. 2024; 4(8):1043-1052. doi 10.1038/s43587-024-00647-7
- McKenna A., Gagnon J.A. Recording development with single cell dynamic lineage tracing. *Development*. 2019;146(12):dev169730. doi 10.1242/dev.169730
- Moran-Crusio K., Reavie L., Shih A., Abdel-Wahab O., Ndiaye-Lobry D., Lobry C., Figueroa M.E., ... Nimer S.D., Melnick A., Godley L.A., Aifantis I., Levine R.L. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell*. 2011;20(1):11-24. doi 10.1016/j.ccr.2011.06.001


- Nachun D., Lu A.T., Bick A.G., Natarajan P., Weinstock J., Szeto M.D., Kathiresan S., ... Whitsel E.A., Wilson J.G., Horvath S., Jaiswal S.; NHLBI Trans-Omics for Precision Medicine (TOPMed) Consortium. Clonal hematopoiesis associated with epigenetic aging and clinical outcomes. *Aging Cell*. 2021;20(6):e13366. doi 10.1111/accel.13366
- Nagase R., Inoue D., Pastore A., Fujino T., Hou H.A., Yamasaki N., Goyama S., ... Takeda R., Tien H.F., Honda H., Abdel-Wahab O., Kitamura T. Expression of mutant Asxl1 perturbs hematopoiesis and promotes susceptibility to leukemic transformation. *J Exp Med*. 2018;215(6):1729-1747. doi 10.1084/jem.20171151
- Sano S., Horitani K., Ogawa H., Halvardson J., Chavkin N.W., Wang Y., Sano M., ... Arai Y., Mychaleckyj J.C., Hirschi K.K., Forsberg L.A., Walsh K. Hematopoietic loss of Y chromosome leads to cardiac fibrosis and heart failure mortality. *Science*. 2022;377(6603):292-297. doi 10.1126/science.abn3100
- Schuermans A., Honigberg M.C. Clonal haematopoiesis in cardiovascular disease: prognostic role and novel therapeutic target. *Nat Rev Cardiol*. 2025;22(11):845-856. doi 10.1038/s41569-025-01148-9
- Shao D.D., Kriz A.J., Snellings D.A., Zhou Z., Zhao Y., Enyenihi L., Walsh C. Advances in single-cell DNA sequencing enable insights into human somatic mosaicism. *Nat Rev Genet*. 2025;26(11):761-774. doi 10.1038/s41576-025-00832-3
- Steensma D.P., Bejar R., Jaiswal S., Lindsley R.C., Sekeres M.A., Hasserjian R.P., Ebert B.L. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2015;126(1):9-16. doi 10.1182/blood-2015-03-631747
- Walsh K., Raghavachari N., Kerr C., Bick A.G., Cummings S.R., Druley T., Dunbar C.E., ... Natarajan P., Shindyapina A.V., Shuldiner A.R., Van Den Akker E.B., Vijg J. Clonal hematopoiesis analyses in clinical, epidemiologic, and genetic aging studies to unravel underlying mechanisms of age-related dysfunction in humans. *Front Aging*. 2022;3:841796. doi 10.3389/fragi.2022.841796
- Xie Z., Zeidan A.M. CHIPing away the progression potential of CHIP: a new reality in the making. *Blood Rev*. 2023;58:101001. doi 10.1016/j.blre.2022.101001
- Yamamoto K., Goyama S., Asada S., Fujino T., Yonezawa T., Sato N., Takeda R., ... Nakagawa S., Hirose T., Ogawa S., Akimitsu N., Kitamura T. A histone modifier, ASXL1, interacts with NONO and is involved in paraspeckle formation in hematopoietic cells. *Cell Rep*. 2021;36(8):109576. doi 10.1016/j.celrep.2021.109576
- Yang H., Kurtenbach S., Guo Y., Lohse I., Durante M.A., Li J., Li Z., ... Nimer S.D., Harbour J.W., Wahlestedt C., Xu M., Yang F.C. Gain of function of ASXL1 truncating protein in the pathogenesis of myeloid malignancies. *Blood*. 2018;131(3):328-341. doi 10.1182/blood-2017-06-789669

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 26.02.2025. После доработки 16.03.2026. Принята к публикации 16.03.2026.

doi 10.18699/vjgb-26-69

Мобильные генетические элементы в патогенезе репродуктивных нарушений человека

А.А. Бабовская , Е.А. Трифонова , В.А. Степанов 

Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра, Томск

 anastasia.babovskaya@medgenetics.ru

Аннотация. Мобильные генетические элементы (МГЭ), или транспозоны, представляют собой автономные последовательности ДНК, способные к перемещению и распространению в пределах генома. Долгое время рассматривавшиеся как «эгоистичная» или «мусорная» ДНК в настоящее время МГЭ считаются одними из компонентов, принимающих участие в эволюции генома, регуляции экспрессии генов и патогенезе ряда заболеваний. У человека МГЭ подразделяются на два основных класса: ретротранспозоны (I класс), реплицирующиеся через промежуточную стадию РНК по механизму «копирования–вставки» (copy-and-paste), и ДНК-транспозоны (II класс), перемещающиеся по механизму «вырезания–вставки» (cut-and-paste) без РНК-интермедиата. Ретротранспозоны, по данным проекта «Геном человека», составляют примерно 42 % от доли МГЭ в человеческом геноме. Наиболее многочисленны ретротранспозоны без длинных концевых повторов (non-LTR), среди которых доминируют автономные элементы LINE-1. Несмотря на то что в геноме присутствует около 500 000 копий LINE-1, большинство из них дефектно и лишь малая часть (<100) сохраняет возможность к транспозиции у современного человека. Второй по распространенности группой (около 10.6 %) семейства ретротранспозонов являются короткие диспергированные повторы Alu (SINE-элементы), которые, будучи неавтономными, используют для перемещения и встраивания молекулярный аппарат LINE-1. Активность МГЭ – строго регулируемый процесс в соматических тканях. Эпигенетические механизмы, в частности метилирование ДНК, в норме эффективно подавляют экспрессию и мобильность мобильных генетических элементов. Нарушение этого контроля ассоциировано с широким спектром патологий. Так, гипометилирование и реактивация ретротранспозонов, в особенности LINE-1, продемонстрированы при различных типах рака, нейродегенеративных и аутоиммунных заболеваниях. Цель настоящего обзора – систематический анализ современных представлений о роли мобильных генетических элементов, в частности ретротранспозонов LINE-1, Alu и HERV, в развитии заболеваний репродуктивной системы человека, также включая заболевания, связанные с патологией плаценты, область которых остается недостаточно изученной, несмотря на растущий объем данных.

Ключевые слова: мобильные элементы генома; транспозоны; репродукция; плацента; заболевания человека

Для цитирования: Бабовская А.А., Трифонова Е.А., Степанов В.А. Мобильные генетические элементы в патогенезе репродуктивных нарушений человека. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(4):685-695. doi 10.18699/vjgb-26-69

Финансирование. Исследование выполнено за счет средств государственного задания по теме ФНИ № 122020200083-8.

Mobile genetic elements in the pathogenesis of human reproductive disorders

А.А. Babovskaya , Е.А. Trifonova , V.A. Stepanov 

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

 anastasia.babovskaya@medgenetics.ru

Abstract. Mobile genetic elements (MGEs), or transposons, are autonomous DNA sequences capable of moving and proliferating within the genome. Long considered “selfish” or “junk” DNA, MGEs are now recognized as key components involved in genome evolution, the regulation of gene expression, and the pathogenesis of various diseases. In humans, MGEs are divided into two main classes: retrotransposons (Class I), which replicate via an RNA intermediate through a “copy-and-paste” mechanism, and DNA transposons (Class II), which move via a “cut-and-paste” mechanism without an RNA intermediate. According to the Human Genome Project, retrotransposons constitute the majority (approximately 42 %) of the MGE fraction within the human genome. The most abundant are the non-long terminal repeat (non-LTR) retrotransposons, dominated by autonomous LINE-1 elements. Although approximately 500 000 LINE-1 copies are present in the genome, the vast majority are defective, and only a small fraction (<100) retain the capacity for transposition in modern humans. The second most prevalent group (about 10.6 %) within the retrotransposon family is the short interspersed nuclear elements (SINEs), specifically Alu elements, which are non-autonomous and hijack the LINE-1 molecular machinery for their mobilization and integration. MGE activity is a tightly regulated process in somatic tissues. Epigenetic mechanisms, particularly DNA

methylation, normally effectively suppress MGE expression and mobility. Disruption of this control is associated with a wide range of pathologies. For instance, hypomethylation and reactivation of retrotransposons, notably LINE-1, have been demonstrated in various cancers, as well as in neurodegenerative and autoimmune diseases. The aim of this review is to provide a systematic analysis of the current understanding of the role of mobile genetic elements, particularly LINE-1, Alu, and HERV retrotransposons, in the development of human reproductive system disorders. This also includes diseases associated with placental pathology, an area that remains insufficiently studied to date, despite a growing body of data.

Key words: mobile genetic elements; transposons; reproduction; placenta; human diseases

For citation: Babovskaya A.A., Trifonova E.A., Stepanov V.A. Mobile genetic elements in the pathogenesis of human reproductive disorders. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(4):685-695. doi 10.18699/vjgb-26-69

Введение

Современные исследования мобильных генетических элементов (МГЭ) и их роли в развитии заболеваний представляют собой динамично развивающуюся область молекулярной биологии и генетики. Мобильные генетические элементы у человека классифицируются на два основных класса: ретротранспозоны, которые реплицируются через промежуточное звено мРНК по механизму «копирования и вставки», и ДНК-транспозоны, использующие в качестве промежуточного звена сегмент ДНК. Наиболее многочисленную группу в геноме человека составляют ретротранспозоны, которые подразделяются на элементы, содержащие длинные концевые повторы (LTR), и элементы, лишенные LTR (non-LTR). Последние доминируют: на их долю приходится 75.2 % всех мобильных элементов и приблизительно 33.6 % всего генома (Lander et al., 2001; Chénais et al., 2012). Среди non-LTR ретротранспозонов длинные диспергированные ядерные элементы-1 (LINE-1; рис. 1) претерпели значительную экспансию, достигнув численности около 500 000 копий, большая часть которых представлена дефектными или фрагментированными последовательностями. На семейство LINE-1 приходится около 38 % всех МГЭ и 16.9 % генома (см. рис. 1). При этом лишь небольшая часть копий LINE-1 сохранила транспозиционную активность, то есть способность к автономной ретротранспозиции путем обратной транскрипции своей мРНК и интеграции полученной кДНК в новые сайты генома.

Ко второй по распространенности категории МГЭ относятся неавтономные короткие диспергированные ядерные элементы (SINE), в частности повторы Alu, которые составляют 24 % всех МГЭ и 10.6 % генома. В референсном геноме человека идентифицирован 1 млн копий элементов Alu, происходящих от нескольких эволюционно молодых подсемейств, например AluY. Их массовая амплификация связана с всплеском ретротранспозиционной активности у предковых приматов 35–40 млн лет назад. Для своей ретротранспозиции элементы Alu используют ферментативный аппарат, эндонуклеазу и обратную транскриптазу, элементов LINE-1. К другим представителям SINE у человека относятся MIR-повторы (Mammalian-wide Interspersed Repeats). К неавтономным, мобилизуемым LINE-1 элементам также относятся составные последовательности SVA, состоящие из гомологичных SINE участков, tandemных повторов переменного числа (VNTR) и Alu-подобных последовательностей. Транспозиционно активными в геноме

современного человека считаются лишь некоторые подсемейства, такие как Alu Ya5, Alu Yb8, Alu Yb9, SVA-E и SVA-F. Активность LINE-1 в зародышевой линии обуславливает появление новых интеграций LINE-1, Alu и SVA, которые служат популяционными генетическими маркерами (Хитринская и др., 2003, 2014).

LTR-ретротранспозоны представлены в геноме человека в меньшем количестве и в основном включают эндогенные ретровирусы человека (HERV). По своей структуре и механизму ретротранспозиции HERV сходны с ретровирусами, но утратили функциональные гены оболочки (env). Активность LTR-ретротранспозонов у человека существенно снизилась в последние несколько миллионов лет, однако их последовательности по-прежнему составляют около 8 % генома (см. рис. 1). Классификация HERV основана на типе тРНК, используемой для инициации обратной транскрипции; наиболее эволюционно молодым и активным подсемейством считается HERV-K (использует лизин). Среди других элементов представлены HERV-I (изолейциновая тРНК) и HERV-L (лейциновая тРНК). Элементы II класса (ДНК-транспозоны) в геноме человека встречаются значительно реже, составляя около 6 % от всех МГЭ и 2.8 % генома (см. рис. 1). Наиболее представлены три суперсемейства: TC1/mariner, включая mariner, MER2-Tigger и Tc2; hAT, включая MER1-Charlie и Zaphod, и PiggyBac (Lander et al., 2001; Brouha et al., 2003).

В последние годы внедрение методов полногеномного и транскриптомного анализа, а также технологий секвенирования единичных клеток значительно расширило понимание роли МГЭ в регуляции экспрессии генов. Известно, что эти элементы участвуют в широком спектре биологических процессов как в норме, так и при патологии. Изучение молекулярных механизмов, посредством которых МГЭ модулируют активность генов и участвуют в патогенезе различных заболеваний, можно выделить как новое направление в научных исследованиях. В частности, выясняется роль МГЭ в развитии онкологических патологий (Chénais, 2015; Kong et al., 2019; McKerrow et al., 2022), атеросклероза (Hueso et al., 2018), инфекционных (Chen et al., 2023) и нейродегенеративных заболеваний (Ravel-Godreuil et al., 2021; Roy et al., 2024; Zhang W. et al., 2025). Ретротранспозоны могут влиять на экспрессию генов как напрямую, встраиваясь в гены и нарушая рамку считывания, что приводит к преждевременной остановке синтеза белка, так и опосредованно, предоставляя новые промоторы, сайты сплайсинга и сайты связывания для

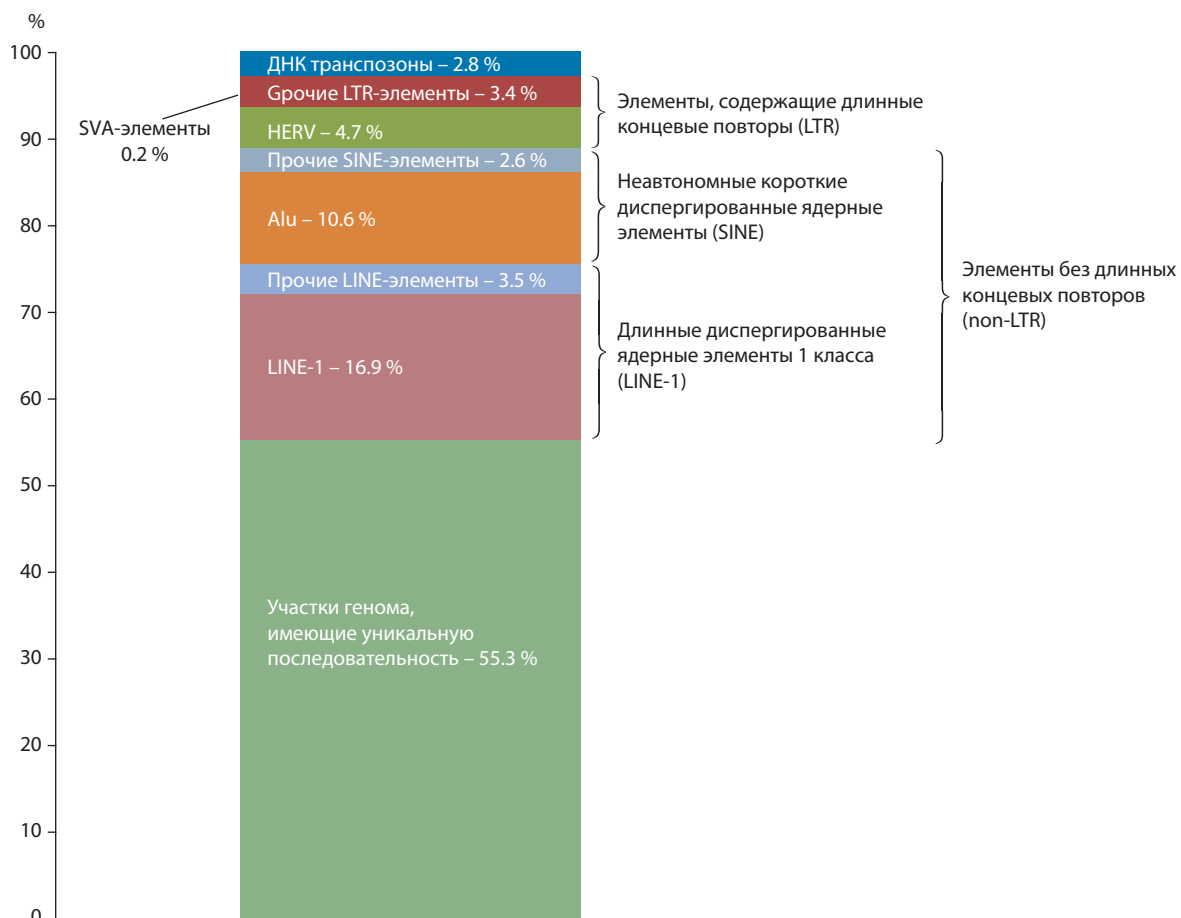


Рис. 1. Доли мобильных элементов в геноме человека и их распределение в различных семействах и подсемействах согласно (Lander et al., 2001).

транскрипционных факторов. Кроме того, МГЭ могут быть источниками энхансерных и промоторных последовательностей, влиять на трехмерную архитектуру хроматина и способствовать возникновению новых регуляторных генов, включая некодирующие РНК и факторы транскрипции (Vouqque et al., 2018).

Накопленные данные позволяют предположить, что МГЭ выступали в роли ключевых драйверов эволюционных изменений, лежащих в основе становления плацентарной беременности у млекопитающих (Lynch et al., 2015), в связи с чем представляется интересным расширить анализ литературы за пределы соматических структур репродуктивной системы, включив плаценту – уникальный транзитный орган, формирующийся в период беременности. Исследования плацентарного метилома показали, что некоторые повторяющиеся элементы, такие как LINE-1 и эндогенный ретровирус человека (HERV), являются ключевыми регуляторами экспрессии генов в ткани плаценты. Предполагают, что их метилирование в плацентарной ткани регулирует специфичные для плаценты функции. Например, некоторые ретротранспозоны функционируют как альтернативные промоторы специфичных для плаценты транскриптов, таких как *KCNH5* и *IL2RB*. Экспрессия альтернативной формы *KCNH5* может способствовать процессу инвазии трофобласта.

Имеется целый ряд работ, посвященных изучению активности ретротранспозона LINE-1 в первом триместре беременности (Vasilyev et al., 2021; Деменева и др., 2023). Однако, несмотря на достигнутые результаты в изучении роли МГЭ при различных патологиях, их вклад в развитие заболеваний репродуктивной системы до настоящего времени остается недостаточно изученным.

Обзор методов изучения влияния мобильных генетических элементов на репродуктивную систему

Репродуктивная система представляет собой уникальную мишень для активности МГЭ в силу интенсивных процессов клеточного деления, рекомбинации и эпигенетического репрограммирования. Изучение их влияния требует комплексного методологического подхода, сочетающего классические генетические методы с новейшими технологиями высокопроизводительного секвенирования и биоинформатического анализа. Современное исследование влияния МГЭ на репродуктивную функцию можно условно разделить на три ключевых направления, каждое из которых обладает своими преимуществами и ограничениями.

Геномные и транскриптомные подходы позволяют с высокой точностью идентифицировать вставки МГЭ

и оценивать их активность. Так, полногеномный анализ выявил 88 опухоль-специфических вставок LINE-1 в высокозлокачественных серозных карциномах яичников, что коррелировало с худшей выживаемостью пациентов (Nguyen et al., 2018). Транскриптомный анализ (RNA-Seq) в сочетании со специализированными биоинформатическими алгоритмами, такими как TETranscripts REdiscoverTE, SalmonTE, ExplorATE, SQuIRE и другими, позволяет количественно оценить экспрессию МГЭ и найти ее связь с развитием патологий (Grow et al., 2015; Bourque et al., 2018).

Эпигенетические подходы фокусируются на механизмах контроля активности МГЭ, прежде всего на ДНК-метилировании и гистоновых модификациях. С помощью бисульфитного секвенирования продемонстрировано, что в процессе сперматогенеза у мышей происходит масштабное деметилирование и последующее реметилирование промоторов LINE-1, создающее «окно» уязвимости для ретротранспозиции (Molago et al., 2011). У людей возрастное снижение метилирования LINE-1 в сперме коррелирует с ухудшением ее качества (Jenkins et al., 2014). Метод ChIP-seq на моделях мышей подтвердил критическую роль PIWI-пути, показав, что белки, ассоциированные с piRNA, например MIWI2, направляют установление репрессивной метки H3K9me3 на сайты МГЭ в зародышевых клетках; нокаут соответствующих генов приводит к массовой реактивации транспозонов, нарушению мейоза и стерильности (Di Giacomo et al., 2013).

Функциональные исследования *in vitro* и *in vivo* направлены на установление причинно-следственных связей между генетическими изменениями, обусловленными вставкой мобильных генетических элементов, и последующим развитием фенотипических признаков. Клеточные модели, такие как эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) человека, с репортерными системами позволяют в реальном времени наблюдать ретротранспозицию LINE-1 и оценивать влияние на нее различных факторов (Macia et al., 2017). Примером функциональной валидации *in vivo* служат модели мышей с нокаутом генов PIWI-пути, например *Mov10LINE-1*, у которых наблюдается дерепрессия МГЭ, блокада сперматогенеза и полная стерильность (Zheng, Wang, 2012).

Однако, несмотря на значительный прогресс, исследование МГЭ сопряжено с рядом методологических сложностей. Сохраняется проблема точного анализа повторяющихся последовательностей при помощи коротких прочтений, хотя создаются новые улучшенные алгоритмы, которые предлагают решения для исключения ложных результатов (Gardner et al., 2017).

Молекулярные механизмы патогенного воздействия мобильных генетических элементов на геном человека

Мобильные генетические элементы оказывают многогранное влияние на структуру и функционирование генома. Патогенный потенциал МГЭ реализуется через разнообразные молекулярные механизмы, нарушающие ге-

номную стабильность, нормальную экспрессию генов и эпигенетический контроль. Эти механизмы можно систематизировать в три основные категории: инсерционный мутагенез, индукция геномной нестабильности и нарушение эпигенетического ландшафта (Chénaïs, 2015; Goodier, 2016).

Инсерционный мутагенез – самый распространенный механизм патогенеза, интеграция новой копии МГЭ в функционально значимую область генома. Описано свыше 120 случаев наследственных заболеваний, обусловленных *de novo* или унаследованными патогенными инсерциями МГЭ (Callinan, Batzer, 2006; Hancks, Kazazian, 2016). Инактивация гена-мишени происходит преимущественно двумя путями: прямым прерыванием кодирующей последовательности или нарушением процессинга РНК. В первом случае вставка МГЭ в экзон нарушает открытую рамку считывания, что часто приводит к возникновению преждевременного терминирующего кодона и последующей деградации транскрипта посредством нонсенс-опосредованного распада мРНК (NMD) (Miki et al., 1992). Во втором случае инсерция в интронные или экзонные области может создавать критические сайты сплайсинга, что приводит к aberrантному сплайсингу пре-мРНК, включению псевдоэкзонов или пропуску экзонов и, как следствие, к синтезу дефектных изоформ белка. Яркий пример такого механизма представляет инсерция SVA-элемента в 3'-нетранслируемую область (3'-UTR) гена *FKTN*, ассоциированную с мышечной дистрофией Фукуямы. Данная инсерция не вызывает полную нокаутную инактивацию гена, а приводит к альтернативному сплайсингу, результатом которого становится синтез С-усеченного белка. Этот усеченный белок накапливается в аппарате Гольджи и эндоплазматическом ретикулуме, нарушая процессы посттрансляционной модификации и тем самым приводя к развитию патологии (Taniguchi-Ikeda et al., 2011). Кроме того, процесс ретротранспозиции может быть сопряжен с делецией сайта интеграции. Внедрение кДНК ретротранспозона (LINE-1, Alu, SVA) сопровождается разрывом двуцепочечной ДНК, что может привести к потере от нескольких пар оснований до нескольких мегабаз. Подобные делеции *de novo*, ассоциированные с инсерциями МГЭ, были идентифицированы в человеческих геномах и могут непосредственно элиминировать функционально важные генетические элементы (Gilbert et al., 2002; van den Hurk et al., 2007).

Индукция геномной нестабильности и хромосомных перестроек выступает вторым механизмом патогенности МГЭ. Высокая степень гомологии между многочисленными копиями МГЭ, например повторами Alu, создает субстрат для неаллельной гомологичной рекомбинации. Некорректное спаривание гомологичных последовательностей, расположенных в разных локусах генома во время мейоза, может приводить к делециям, дупликациям, инверсиям или транслокациям (Sen et al., 2006). Этот механизм лежит в основе ряда микроделеционных синдромов, таких как наследственная нейропатия с предрасположенностью к параличам от сдавления (ННСПС), вызванная

реципной рекомбинацией между повторяющимися последовательностями, в области хромосомы 17 p11.2-12, кодирующей синтез белка периферического миелина 22 (peripheral myelin protein 22, PMP22) (Полынникова и др., 2021).

Нарушение эпигенетической регуляции – третий механизм патогенного воздействия МГЭ. Он обусловлен способностью МГЭ нарушать нормальный статус метилирования участка ДНК. Поскольку транскрипционная активность МГЭ представляет угрозу для клетки, эукариоты выработали механизмы их репрессии, в первую очередь, путем метилирования CpG-динуклеотидов в их промоторах (Figueiredo et al., 2009). Сообщается, что вставка МГЭ может оказывать влияние также и на соседние участки ДНК. Высокометилированные промоторы интегрировавшихся МГЭ, например LINE-1 или SVA, могут выступать мишенями для привлечения ДНК-метилтрансфераз и гистон-модифицирующих комплексов, что приводит к конденсации гетерохроматина на прилегающие регуляторные области генов, вызывая их транскрипционную инактивацию (Slotkin, Martienssen, 2007).

Почему репродуктивная система особенно уязвима?

Репродуктивная система человека обладает повышенной восприимчивостью к нарушениям регуляции мобильных генетических элементов, что обусловлено уникальными особенностями ее биологии, связанными с эпигенетическим репрограммированием, эволюционной кооптацией (внедрением) МГЭ и высокими требованиями к геномной стабильности (Smith et al., 2012).

Ключевым фактором, обуславливающим уязвимость, является масштабное эпигенетическое репрограммирование, оно происходит в ходе гаметогенеза и на ранних стадиях эмбриогенеза. Этот процесс включает глобальное деметилирование ДНК, необходимое для стирания родительских эпигенетических меток и приобретения тотипотентности (Smith et al., 2012). Однако временное снятие репрессивных метилмаркеров, в частности, с промоторных регионов МГЭ, таких как LINE-1 и Alu, создает транзитное «окно уязвимости». В этот период происходит реактивация транскрипционного потенциала МГЭ, что значительно повышает риск инсерционного мутагенеза *de novo* в генах, критически важных для развития гамет и эмбриона (van den Hurk et al., 2007; Grow et al., 2015). Таким образом, сама биологическая программа, обеспечивающая плюрипотентность и развитие, повышает геномную нестабильность.

Ряд исследований указывает на то, что определенный уровень активности МГЭ физиологически необходим для нормального функционирования репродуктивной системы. В процессе эволюции произошла кооптация последовательностей МГЭ в регуляторные сети, контролируемые эмбриогенез и плацентацию (Lynch et al., 2015). Например, экспрессия определенных семейств ретротранспозонов (MERVL у мышей, HERVN у человека) необходима для активации генетической программы тотипотентности на

стадии двухклеточного эмбриона, выступающих в качестве альтернативных энхансеров и промоторов (Macfarlan et al., 2012; Grow et al., 2015). Есть свидетельства, что в ходе плацентации одни из белков, опосредующие слияние цитотрофобласта и образование синцитиотрофобласта плаценты, имеют ретровирусное происхождение. Например, гены синцитинов изначально были генами оболочки (env) эндогенных ретровирусов (HERV-W, HERV-FRD), их экспрессия жизненно важна для формирования плаценты (Mi et al., 2000; Blaise et al., 2003; Lavielle et al., 2013).

В то же время нарушение механизмов эпигенетического контроля за МГЭ способно привести к неконтролируемой транскрипции и ретротранспозиции, что вызывает повреждение генов, значимых для репродукции (Vasilyev et al., 2021). Предполагается, что подобная дисрегуляция ассоциирована с широким спектром патологий, включая идиопатическое бесплодие, нарушения имплантации, невынашивание беременности, а также осложнения, связанные с дисфункцией плаценты, – преэклампсию и задержку роста плода. Особую уязвимость демонстрирует плацента, где, в отличие от соматических тканей, поддерживается глобальное гипометилирование генома, в том числе промоторов элементов LINE-1 (He, Ecker, 2014). В норме это создает условия для реализации уникальных функций трофобласта, однако aberrантная гиперактивация ретротранспозонов нарушает инвазивную способность трофобласта и ремоделирование спиральных артерий, непосредственно участвуя в патогенезе преэклампсии и задержки роста плода (Васильев и др., 2015).

Мобильные генетические элементы в патогенезе нарушений гаметогенеза и бесплодия

Дисрегуляция мобильных генетических элементов, в частности ретротранспозонов LINE-1, представляет собой один из ключевых молекулярных механизмов, ассоциированных с нарушениями фертильности и патологией гаметогенеза. Патогенное воздействие реализуется через нарушение эпигенетического контроля, индукцию геномной нестабильности и aberrантную регуляцию генов, важных для репродукции.

Эпигенетическая дисрегуляция МГЭ в половых клетках. В отличие от соматических клеток, где промоторы LINE-1 находятся в состоянии конститутивного гиперметилирования, в половых клетках характерна выраженная динамичность и тканевой специфичность. Одним из основных факторов риска нарушения созревания половых клеток является возраст-зависимое изменение статуса метилирования LINE-1. В сперматозоидах наблюдается повышение уровня метилирования промотора LINE-1 с возрастом мужчины (Jenkins et al., 2014), в то время как в ооцитах человека на стадии диплотены и в овулировавших ооцитах второго порядка регистрируется относительное гипометилирование этих элементов (Smith et al., 2012). Подобный эпигенетический дисбаланс создает предпосылки для реактивации транспозиционной активности МГЭ, что

может приводить к инсерционному мутагенезу в ключевых генах, контролирующих мейоз, дифференцировку гамет и эмбриональное развитие. Показано, что в сперматозоидах мышей с идиопатическим бесплодием наблюдается значительное гипометилирование ДНК в промоторах элементов LINE-1 по сравнению с фертильными особями (Jachowicz et al., 2017). Это эпигенетическое нарушение приводит к их повышенной транскрипционной и ретротранспозиционной активности. Важно отметить, что избыточная экспрессия LINE-1 коррелирует с повышенным уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов, что указывает на прямую связь между дерепрессией ретротранспозонов и повреждением генома мужских гамет. Гипометилирование LINE-1 служит независимым прогностическим маркером нарушения сперматогенеза и качества эякулята (Jenkins et al., 2014).

Инсерционный мутагенез в гены, важные для спермогенеза. Патогенное воздействие МГЭ на мужскую репродуктивную функцию реализуется, в первую очередь, через механизм инсерционного мутагенеза. Установлено, что *de novo* инсерции ретротранспозона LINE-1 способны нарушать целостность ключевых генов, критически важных для нормального протекания сперматогенеза. Наибольшую значимость представляют повреждения в AZF-локусе (Azoospermia Factor) Y-хромосомы, который содержит кластер генов, непосредственно отвечающих за продуцирование сперматозоидов. Показано, что инсерции МГЭ в гены семейства DAZ (Deleted in Azoospermia), расположенные в AZF-регионе, становятся одной из прямых причин их инактивации, что ведет к нарушению сперматогенеза и развитию азооспермии (Hancks, Kazanian, 2016).

Помимо воздействия на гены Y-хромосомы, ретротранспозиционная активность может затрагивать и критические аутомсомные локусы. Описаны случаи инсерций LINE-1 в гене *FKBP6*, кодирующий белок, участвующий в мейотическом делении. Мутации в этом гене ассоциированы с нарушением конъюгации хромосом и синаптонемального комплекса в профазе мейоза I, что приводит к мужскому бесплодию (Wyrwoll et al., 2022).

Нарушение раннего эмбриогенеза и имплантации. Вторая волна масштабного эпигенетического репрограммирования, инициирующаяся после оплодотворения и длящаяся до стадии бластоцисты, сопровождается пассивным деметилированием генома и резким повышением транскрипционного потенциала LINE-1. В норме этот процесс находится под строгим контролем механизмов РНК-интерференции и необходим для перестраивания хроматина и активации эмбрионального генома (Jachowicz et al., 2017). Однако нарушение тонкого баланса между активацией и репрессией МГЭ приводит к патологическим последствиям. Сообщается, что искусственное подавление транскрипции LINE-1 в зиготах мыши нарушает процессы дробления и останавливает развитие на ранних стадиях (Percharde et al., 2018). Это связано с тем, что последовательности LINE-1 выступают в качестве альтернативных промоторов для генов, важных для клеточного деления,

например *TP53*, и участвуют в регуляции пространственной организации хроматина (Chow et al., 2010).

Невынашивание беременности, обусловленное хромосомными аномалиями

Важным аспектом является взаимовлияние активности МГЭ и хромосомной нестабильности. Анеуплоидия, в свою очередь, может индуцировать глобальные изменения в метиломе. Показано, что в плацентарных тканях с мозаичной формой анеуплоидии уровень метилирования LINE-1 достоверно повышен (Васильев и др., 2015). Это может быть следствием компенсаторного механизма – гиперметилирования промоторов для снижения транскрипционной нагрузки на геном в условиях нарушенного баланса генной дозы.

Кроме того, активация МГЭ при невынашивании может носить вторичный характер, будучи маркером общего клеточного стресса. Окислительный стресс, характерный для плацент с хромосомными аномалиями, вызывает глобальное деметилирование ДНК, что снимает репрессию с промоторов LINE-1 и Alu-элементов (Lou et al., 2020). Последующая ретротранспозиция и накопление разрывов двуцепочечной ДНК еще более дестабилизируют геном трофобласта, закрепляя патологическое состояние и делая его несовместимым с дальнейшим развитием беременности (García-Perez et al., 2016). Таким образом, дисрегуляция МГЭ выступает не только как триггер, но и как универсальный усилитель патологических процессов, ведущих к репродуктивным сбоям на самых ранних этапах гестации.

Вклад мобильных генетических элементов в патогенез преэклампсии

Ранее было показано, что сотни генов приобретали и теряли свою экспрессионную активность в эндометрии, что совпадало с возникновением беременности и децидуализации у млекопитающих (Lynch et al., 2015; Mika et al., 2021). Известно, что для подготовки матки к имплантации эмбриона эндометрий подвергается процессу децидуализации, в ходе которого стромальные клетки трансформируются в децидуальные стромальные клетки (ДСК). Децидуальная оболочка, формирующаяся в результате этого процесса, обеспечивает имплантацию эмбриона и защиту плода от материнской иммунной системы. Децидуализация регулируется прогестероном через его рецептор (PGR), вторичный мессенджер цАМФ, протеинкиназу А (PKA) и фактор транскрипции FOXO1 (Kajihara et al., 2013). Этот процесс, возникший в эволюционной линии эутерийных млекопитающих, сопровождается масштабными изменениями в регуляции активности генов, клеточной организации и физиологии эндометрия, необходимыми для успешной имплантации и беременности (Mess, Carter, 2006; Kin et al., 2014).

Особый вклад в развитие и функционирование ДСК в процессе адаптации, предположительно, внесли МГЭ. Две крупные волны активности и внедрения транспозонов в геном привели к ремоделированию транскриптома и регуляторного ландшафта децидуальных стромальных

клеток. Современные исследования говорят о том, что гены, расположенные вблизи регуляторных элементов, происходящих из транспозонов, демонстрируют высокую чувствительность к прогестерону и, по-видимому, играют ключевую роль в сигнальном ответе на этот гормон, представляя сайты связывания для рецепторов прогестерона (Mika, Lynch, 2022). Дефекты децидуализации на ранних сроках беременности могут приводить к задержке роста плода, прерыванию беременности или акушерским осложнениям, таким как преэклампсия (ПЭ).

Преэклампсия – одно из наиболее тяжелых осложнений беременности, для нее свойственны нарушение плацентации, эндотелиальная дисфункция и системный воспалительный ответ. Центральной гипотезой патогенеза ПЭ является неполная инвазия трофобласта в спиральные артерии матки, что вызывает плацентарную гипоксию. Роль МГЭ, таких как транспозоны (LINE-1, Alu и SVA-элементы), в регуляции экспрессии генов и эпигенетических механизмов в децидуальных клетках до сих пор недостаточно изучена.

Преэклампсия характеризуется системным воспалением, в котором децидуальные клетки играют ключевую роль благодаря секреции провоспалительных цитокинов. Исследования показали, что PSG1, PSG6 и PSG11 увеличивают секрецию противовоспалительных цитокинов IL-10 и IL-6, в то время как все гены PSG активируют рецептор TGF β в иммунных клетках (Warren et al., 2018). Активация МГЭ, особенно LINE-1, может индуцировать воспалительные пути через продукцию двухцепочечной РНК (дцРНК), которая распознается врожденными иммунными рецепторами, такими как TLR3. Подобные механизмы наблюдаются при аутоиммунных заболеваниях, где транспозоны активируют интерфероновый ответ (Crow, 2014). Однако прямые доказательства участия этого механизма в патогенезе ПЭ в децидуальных клетках остаются ограниченными и требуют дальнейших исследований. Интеграция транспозонов в геном человека также привела к регуляции экспрессии важнейших плацентарных гормонов, таких как лептин (LEP), инсулиноподобный белок 4 (INSL4) и кортиколиберин (CRH), что дополнительно подчеркивает значительную роль МГЭ в регуляции процессов, связанных с развитием беременности.

Кроме того, некоторые работы указывают на прямое влияние гиперактивации МГЭ на нарушение дифференцировки и функции клеток трофобласта. Для успешной плацентации цитотрофобласт должен дифференцироваться по двум основным путям: в синцитиотрофобласт и инвазивный вневорсинчатый трофобласт. Нарушение этого тонко регулируемого процесса дифференцировки и вследствие этого неполноценная инвазия вневорсинчатого трофобласта и его неспособность ремоделировать спиральные артерии напрямую ассоциированы с развитием преэклампсии. Показано, что ретротранспозоны, такие как LINE-1, способны вмешиваться в ключевые сигнальные пути, управляющие этим процессом дифференцировки трофобласта, что, по-видимому, может быть причиной нарушений плацентации, лежащих в основе преэклампсии (Деменева и др., 2024).

Мобильные генетические элементы и их роль в патогенезе задержки роста плода

Задержка роста плода (ЗРП), или синдром внутриутробной гипотрофии, определяется как рождение плода с массой тела и/или длиной тела, соответствующими ≤ 10 -му перцентилю или ≥ 2 стандартных отклонения ниже среднего для данного гестационного возраста (Li et al., 2019). Задержка роста плода ассоциирована с повышенным риском перинатальной смертности, неврологических нарушений, задержки психомоторного развития, метаболического синдрома и сердечно-сосудистых заболеваний во взрослом возрасте (Entringer et al., 2012). Патогенез ЗРП многогранен и включает материнские, плацентарные и фетальные факторы, среди которых в том числе дисрегуляция мобильных генетических элементов.

LINE-1 – наиболее распространенные автономные ретротранспозоны в геноме человека, в норме LINE-1 находятся в глубоко метилированном и транскрипционно подавленном состоянии в соматических тканях взрослого организма (Figueiredo et al., 2009). Однако в условиях эпигенетической нестабильности, например при дефиците метильных доноров, происходит гипометилирование промоторных областей LINE-1, что может приводить к их активации, транскрипции и ретротранспозиции (Howard et al., 2008). Фолиевая кислота, как ключевой донор метильных групп, играет центральную роль в поддержании глобального метилирования ДНК. Эксперименты *in vitro* показали, что культивирование эмбриональных стволовых клеток мыши (mESC) в условиях дефицита фолата приводит к внутриклеточному дефициту 5-метилтетрагидрофолата, снижению уровня S-аденозилметионина (SAM) и последующему гипометилированию LINE-1 (Chang et al., 2013). Аналогичные наблюдения были сделаны *in vivo*: у беременных женщин с плодами, имеющими дефекты нервной трубки, отмечено значимое снижение метилирования LINE-1, что коррелировало с низким уровнем фолатов в материнской сыворотке (Li et al., 2019).

Исследования на мышинной модели показали, что гипометилирование и активация LINE-1 в плаценте коррелируют с уменьшением массы плода и нарушением структуры плаценты, включая истончение слоя синцитиотрофобласта и снижение васкуляризации. У человека в когортных исследованиях установлено, что уровень метилирования LINE-1 в пуповинной крови и плацентарной ткани у детей с ЗРП статистически значимо ниже, чем у детей с нормальным весом при рождении. Более того, у матерей с низким уровнем фолатов в первом триместре беременности отмечается повышенный риск рождения детей с ЗРП и одновременно сниженное метилирование LINE-1 в плаценте (Joubert et al., 2016; Li et al., 2019).

Онкогенная роль мобильных генетических элементов

Проведенный обзор экспериментальных работ позволяет сделать вывод о значимой роли мобильных генетических элементов, в частности ретротранспозонов LINE-1, в патогенезе злокачественных новообразований репродуктивной системы. При эпителиальном раке яичников

белок LINE-1 ORF1p не только экспрессируется, но и секретируется опухолевыми клетками, обнаруживаясь в плазме и асцитической жидкости пациентов, что указывает на его потенциал в качестве биомаркера (Sato et al., 2023). Ранее полногеномный анализ, проведенный научной группой T.H.M. Nguyen, выявил 88 опухоль-специфических ретротранспозиционных событий LINE-1 в высокозлокачественных серозных карциномах яичников, что коррелировало с худшей выживаемостью пациентов (Nguyen et al., 2018). Эксперименты *in vitro*, где ингибировали экспрессию LINE-1, продемонстрировали снижение инвазии, миграции и повышение апоптоза опухолевых клеток (Fu et al., 2023). При раке эндометрия отмечено статистически значимое гипометилирование промоторов LINE-1 в опухолях по сравнению с нормальной тканью, степень гипометилирования была выше в папиллярных серозных карциномах. Анализ подтвердил, что гипометилирование приводит к повышению транскриптов LINE-1, причем наиболее выраженная активация наблюдалась в p53-мутированных опухолях с высоким уровнем CNV, что говорит о синергизме между мутацией p53 и эпигенетической дерепрессией МГЭ (Zhang B. et al., 2014). Исследование McKerrow подтвердило способность сверхэкспрессии LINE-1 запускать фосфорилирование RAD50 – ключевого этапа в пути ответа на двухцепочечные разрывы ДНК, при этом статистический анализ показал сильную корреляцию активности LINE-1 с уровнем хромосомных aberrаций (CNV) и активацией путей репликативного стресса (McKerrow et al., 2022). При раке шейки матки в эксперименте с использованием RNA-seq образцов инвазивной карциномы обнаружено, что наибольшее число дифференциально экспрессирующихся ретроэлементов ассоциировано со случаями коинфекции разными типами ВПЧ, что свидетельствует о потенциальном синергизме в прогрессии заболевания (Curty et al., 2021). При раке предстательной железы системный анализ результатов полногеномного секвенирования показал, что соматическая ретротранспозиция значительно выше в метастазах по сравнению с первичными опухолями, при этом 68 % вставок локализовались в экзонах, интронах или регуляторных областях генов, включая гены-супрессоры опухолевого роста, что прямо указывает на механизм инактивации защитных путей и усиления геномной нестабильности (Tubio et al., 2014).

Следует отметить, что представленные исследования освещают лишь часть активно развивающейся области. Требуются дальнейшие исследования для детального понимания системы процессов, контролирующей активность МГЭ в разных тканях и клетках, а также оценка вклада других семейств ретротранспозонов в канцерогенезе.

Заключение

Проведенный обзор имеющихся исследований свидетельствует о фундаментальной роли мобильных генетических элементов в регуляции физиологических процессов репродуктивной системы, а нарушения активности МГЭ ассоциированы с развитием широкого спектра патологических состояний. Среди разнообразных семейств МГЭ



Рис. 2. Ключевые пути дисрегуляции МГЭ и их вклад в патофизиологию репродуктивных нарушений. ДК – децидуальные клетки, ПЭ – преэклампсия, НБ – невынашивание беременности, ЗРП – задержка роста плода.

в настоящее время наиболее изучены ретротранспозоны LINE-1. Пусковым фактором патогенного воздействия МГЭ выступает эпигенетическая дисрегуляция, проявляющаяся в гипометилировании промоторных регионов МГЭ при физиологическом репрограммировании или под влиянием клеточного стресса, что инициирует их транскрипционную и транспозиционную активность. Этот процесс запускает каскад событий, включающий инсерционный мутагенез, индукцию геномной нестабильности, а также нарушение нормальных механизмов регуляции генов ввиду возникновения альтернативных промоторов (рис. 2).

В совокупности всех молекулярных нарушений развиваются тяжелые акушерские осложнения: преэклампсия и задержка роста плода формируются вследствие нарушения дифференцировки трофобласта и инвазии в спиральные артерии, непосредственно связанных с гиперактивацией LINE-1, тогда как невынашивание беременности возникает как результат комбинированного воздействия инсерционного мутагенеза, хромосомной нестабильности и дефектов плацентарного развития. Перспективы дальнейшего прогресса в этой интенсивно развивающейся области в том числе связаны с совершенствованием используемых методов. Внедрение технологий секвенирования длинных прочтений открывает возможности для прямой детекции полных последовательностей вставок МГЭ в сложных участках генома (de la Morena-Barrío et al., 2022; Yano et al., 2024). Мультиомные интегративные платформы, комбинирующие ATAC-seq и RNA-seq, позволят анализировать влияние МГЭ на трехмерную организацию хроматина, в то время как методы геномного редактирования (CRISPR-Cas) предоставят уникальные возможности для направленного моделирования влияния вставок или делеций конкретных МГЭ в функциональных исследованиях. Таким образом, изучение МГЭ – перспективное направление

молекулярной биологии и генетики, способное углубить понимание механизмов, участвующих в поддержании физиологического гомеостаза репродуктивной системы, что послужит основой для дальнейших исследований при создании стратегий диагностики и терапии репродуктивных заболеваний.

Список литературы / References

- Васильев С.А., Толмачева Е.Н., Кашеярова А.А., Саженова Е.А., Лебедев И.Н. Статус метилирования ретротранспозона LINE-1 при хромосомном мозаицизме на ранних стадиях эмбрионального развития человека *Молекулярная биология*. 2015;49(1): 165-174. doi 10.7868/S0026898414060196 [Vasiliev S.A., Tolmacheva E.N., Kashevarova A.A., Sazhenova E.A., Lebedev I.N. Methylation status of line-1 retrotransposon in chromosomal mosaicism during the early stages of human embryonic development. *Mol Biol*. 2015;49(1):144-152. doi 10.1134/S0026893314060193]
- Деменева В.В., Толмачева Е.Н., Никитина Т.В., Саженова Е.А., Юрьев С.Ю., Махмутходжаев А.Ш., Зуев А.С., Филатова С.А., Дмитриев А.Е., Даркова Я.А., Назаренко Л.П., Лебедев И.Н., Васильев С.А. Экспрессия генов NUP153 и YWHAB с их канонических промоторов и альтернативных промоторов ретротранспозона LINE-1 в плаценте первого триместра беременности. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(1):63-71. doi 10.18699/VJGB-23-09 [Demeneva V.V., Tolmacheva E.N., Nikitina T.V., Sazhenova E.A., Yuriev S.Y., Makhmutkhodzhaev A.S., Zuev A.S., Filatova S.A., Dmitriev A.E., Darkova Y.A., Nazarenko L.P., Lebedev I.N., Vasiliev S.A. Expression of the NUP153 and YWHAB genes from their canonical promoters and alternative promoters of the LINE-1 retrotransposon in the placenta of the first trimester of pregnancy. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2023;27(1):63-71. doi 10.18699/VJGB-23-09]
- Деменева В.В., Толмачева Е.Н., Филатова С.А., Зуев А.С., Ушакова А.С., Васильева О.Ю., Саженова Е.А., Никитина Т.В., Васильев С.А. Уровень метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинках хориона в эмбрионах из семей со спорадическим и привычным невынашиванием беременности. *Медицинская генетика*. 2024;23(10):50-54. doi 10.25557/2073-7998.2024.10.50-54 [Demeneva V.V., Tolmacheva E.N., Filatova S.A., Zuev A.S., Ushakova A.S., Vasilyeva O.Yu., Sazhenova E.A., Nikitina T.V., Vasiliev S.A. The level of methylation of LINE-1 retrotransposon in chorionic villi in embryos from families with sporadic and recurrent miscarriage. *Med Genet*. 2024;23(10):50-54. doi 10.25557/2073-7998.2024.10.50-54 (in Russian)]
- Польниникова А.К., Зиновьева О.Е., Солоха О.А., Мисюреева Е.В. Клиническое наблюдение случая наследственной невропатии со склонностью к параличам от сдавления. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2021;13(4):116-122. doi 10.14412/2074-2711-2021-4-116-122 [Polynnikova A.K., Zinovyeva O.E., Solokha O.A., Misyuryeva E.V. Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: a case report. *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2021;13(4):116-122. doi 10.14412/2074-2711-2021-4-116-122 (in Russian)]
- Хитринская И.Ю., Степанов В.А., Пузырев В.П. *Alu*-повторы в геноме человека. *Молекулярная биология*. 2003;37(3):382-391 [Khitrinskaya I.Y., Stepanov V.A., Puzyrev V.P. *Alu* repeats in the human genome. *Mol Biol*. 2003;37(3):325-333. doi 10.1023/A:1024218806634]
- Хитринская И.Ю., Харьков В.Н., Воевода М.И., Степанов В.А. Генетическое разнообразие и взаимоотношения популяций Северной Евразии по полиморфным инсерциям *Alu*-элемента. *Молекулярная биология*. 2014;48(1):69-80. doi 10.7868/s0026898414010054 [Khitrinskaya I.Y., Kharkov V.N., Voevoda M.I., Stepanov V.A. Genetic diversity and relationships of populations of northern Eurasia by polymorphic *Alu* insertions. *Mol Biol*. 2014;48(1):58-68. doi 10.1134/S0026893314010051]
- Blaise S., de Parseval N., Béné L., Heidmann T. Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(22):13013-13018. doi 10.1073/pnas.2132646100
- Bourque G., Burns K.H., Gehring M., Gorbunova V., Seluanov A., Hammell M., Imbeault M., Izsvák Z., Levin H.L., Macfarlan T.S., Mager D.L., Feschotte C. Ten things you should know about transposable elements. *Genome Biol*. 2018;19(1):199. doi 10.1186/s13059-018-1577-z
- Brouha B., Schustak J., Badge R.M., Lutz-Prigge S., Farley A.H., Moran J.V., Kazazian H.H. Jr. Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(9):5280-5285. doi 10.1073/pnas.0831042100
- Callinan P.A., Batzer M.A. Retrotransposable elements and human disease. *Genome Dyn*. 2006;1:104-115. doi 10.1159/000092503
- Chang S., Wang L., Guan Y., Shangguan S., Du Q., Wang Y., Zhang T., Zhang Y. Long interspersed nucleotide element-1 hypomethylation in folate-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biochem*. 2013;114(7):1549-1558. doi 10.1002/jcb.24496
- Chen X., Pacis A., Aracena K.A., Gona S., Kwan T., Groza C., Lin Y.L., Sindeaux R., Yotova V., Pramatarova A., Simon M.-M., Pastinen T., Barreiro L.B., Bourque G. Transposable elements are associated with the variable response to influenza infection. *Cell Genomics*. 2023; 3(5):100292. doi 10.1016/j.xgen.2023.100292
- Chénais B. Transposable elements in cancer and other human diseases. *Curr Cancer Drug Targets*. 2015;15(3):227-242. doi 10.2174/1568009615666150317122506
- Chénais B., Caruso A., Hiard S., Casse N. The impact of transposable elements on eukaryotic genomes: from genome size increase to genetic adaptation to stressful environments. *Gene*. 2012;509(1):7-15. doi 10.1016/j.gene.2012.07.042
- Chow J.C., Ciaudo C., Fazzari M.J., Mise N., Servant N., Glass J.L., Attreed M., Avner P., Wutz A., Barillot E., Greally J.M., Voinnet O., Heard E. LINE-1 activity in facultative heterochromatin formation during X chromosome inactivation. *Cell*. 2010;141(6):956-969. doi 10.1016/j.cell.2010.04.042
- Crow M.K. Type I interferon in the pathogenesis of lupus. *J Immunol*. 2014;192(12):5459-5468. doi 10.4049/jimmunol.1002795
- Curry G., Menezes A.N., Brant A.C., de Mulder Rougvié M., Moreira M.Á.M., Soares M.A. Expression of retroelements in cervical cancer and their interplay with HPV infection and host gene expression. *Cancers (Basel)*. 2021;13(14):3513. doi 10.3390/cancers13143513
- de la Morena-Barrio B., Stephens J., de la Morena-Barrio M.E., Stefanucci L., Padilla J., Miñano A., Gleadall N., ... Vicente V., Ouwehand W.H., Corral J., Sanchis-Juan A.; NIHR BioResource. Long-read sequencing identifies the first retrotransposon insertion and resolves structural variants causing antithrombin deficiency. *Thromb Haemost*. 2022;122(8):1369-1378. doi 10.1055/s-0042-1749345
- Di Giacomo M., Comazzetto S., Saini H., De Fazio S., Carrieri C., Morgan M., Vasiliauskaitė L., Benes V., Enright A.J., O'Carroll D. Multiple epigenetic mechanisms and the piRNA pathway enforce LINE1 silencing during adult spermatogenesis. *Mol Cell*. 2013;50(4):601-608. doi 10.1016/j.molcel.2013.04.026
- Entringer S., Buss C., Swanson J.M., Cooper D.M., Wing D.A., Wafar F., Wadhwa P.D. Fetal programming of body composition, obesity, and metabolic function: the role of intrauterine stress and stress biology. *J Nutr Metab*. 2012;2012:632548. doi 10.1155/2012/632548
- Figueiredo J.C., Grau M.V., Wallace K., Levine A.J., Shen L., Hamdan R., Chen X., Bresalier R.S., McKeown-Eyssen G., Haile R.W., Baron J.A., Issa J.P. Global DNA hypomethylation (LINE-1) in the normal colon and lifestyle characteristics and dietary and genetic factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(4):1041-1049. doi 10.1158/1055-9965.EPI-08-0926
- Fu J., Qin T., Li C., Zhu J., Ding Y., Zhou M., Yang Q., Liu X., Zhou J., Chen F. Research progress of LINE-1 in the diagnosis, prognosis, and

- treatment of gynecologic tumors. *Front Oncol.* 2023;13:1201568. doi 10.3389/fonc.2023.1201568
- Garcia-Perez J.L., Widmann T.J., Adams I.R. The impact of transposable elements on mammalian development. *Development.* 2016; 143(22):4101-4114. doi 10.1242/dev.132639
- Gardner E.J., Lam V.K., Harris D.N., Chuang N.T., Scott E.C., Pittard W.S., Mills R.E.; 1000 Genomes Project Consortium; Devine S.E. The Mobile Element Locator Tool (MELT): population-scale mobile element discovery and biology. *Genome Res.* 2017;27(11):1916-1929. doi 10.1101/gr.218032.116
- Gilbert N., Lutz-Prigge S., Moran J.V. Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition. *Cell.* 2002;110(3):315-325. doi 10.1016/S0092-8674(02)00828-0
- Goodier J.L. Restricting retrotransposons: a review. *Mob DNA.* 2016; 7:16. doi 10.1186/s13100-016-0070-z
- Grow E.J., Flynn R.A., Chavez S.L., Bayless N.L., Wossidlo M., Wesche D.J., Martin L., Ware C.B., Blish C.A., Chang H.Y., Pera R.A., Wysocka J. Intrinsic retroviral reactivation in human preimplantation embryos and pluripotent cells. *Nature.* 2015; 522(7555):221-225. doi 10.1038/nature14308
- Hancks D.C., Kazazian H.H. Jr. Roles for retrotransposon insertions in human disease. *Mob DNA.* 2016;7:9. doi 10.1186/s13100-016-0065-9
- He X.J., Ecker J.R. Non-CG methylation in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2014;16:55-77. doi 10.1146/annurev-genom-090413-025437
- Howard G., Eiges R., Gaudet F., Jaenisch R., Eden A. Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. *Oncogene.* 2008;27(3):404-408. doi 10.1038/sj.onc.1210631
- Hueso M., Cruzado J.M., Torras J., Navarro E. ALUminating the path of atherosclerosis progression: chaos theory suggests a role for alu repeats in the development of atherosclerotic vascular disease. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6):1734. doi 10.3390/ijms19061734
- Jachowicz J.W., Bing X., Pontabry J., Bošković A., Rando O.J., Torres-Padilla M.E. LINE-1 activation after fertilization regulates global chromatin accessibility in the early mouse embryo. *Nat Genet.* 2017;49(10):1502-1510. doi 10.1038/ng.3945
- Jenkins T.G., Aston K.I., Pflueger C., Cairns B.R., Carrell D.T. Age-associated sperm DNA methylation alterations: possible implications in offspring disease susceptibility. *PLoS Genet.* 2014;10(7):e1004458. doi 10.1371/journal.pgen.1004458
- Joubert B.R., den Dekker H.T., Felix J.F., Bohlin J., Ligthart S., Beckert E., Tiemeier H., ... Peddada S.D., Jaddoe V.W., Nystad W., Duijts L., London S.J. Maternal plasma folate impacts differential DNA methylation in an epigenome-wide meta-analysis of newborns. *Nat Commun.* 2016;7:10577. doi 10.1038/ncomms10577
- Kajihara T., Brosens J.J., Ishihara O. The role of FOXO1 in the decidual transformation of the endometrium and early pregnancy. *Med Mol Morphol.* 2013;46(2):61-68. doi 10.1007/s00795-013-0018-z
- Kin K., Maziarz J., Wagner G.P. Immunohistological study of the endometrial stromal fibroblasts in the opossum, *Monodelphis domestica*: evidence for homology with eutherian stromal fibroblasts. *Biol Reprod.* 2014;90(5):111. doi 10.1095/biolreprod.113.115139
- Kong Y., Rose C.M., Cass A.A., Williams A.G., Darwish M., Lianoglou S., Haverty P.M., ... Mellman I., Bourgon R., Grealley J., Jhunjhunwala S., Chen-Harris H. Transposable element expression in tumors is associated with immune infiltration and increased antigenicity. *Nat Commun.* 2019;10(1):5228. doi 10.1038/s41467-019-13035-2
- Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J., Devon K., ... Shizuya H., Choi S., Chen Y.J., Szustakowski J.; International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001; 409(6822):860-921. doi 10.1038/35057062
- Lavialle C., Cornelis G., Dupressoir A., Esnault C., Heidmann O., Veronchet C., Heidmann T. Paleovirology of 'syncytins', retroviral env genes exapted for a role in placentation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2013;368(1626):20120507. doi 10.1098/rstb.2012.0507
- Li B., Chang S., Liu C., Zhang M., Zhang L., Liang L., Li R., Wang X., Qin C., Zhang T., Niu B., Wang L. Low maternal dietary folate alters retrotransposon by methylation regulation in Intrauterine Growth Retardation (IUGR) fetuses in a mouse model. *Med Sci Monit.* 2019;25:3354-3365. doi 10.12659/MSM.914292
- Lou C., Goodier J.L., Qiang R. A potential new mechanism for pregnancy loss: considering the role of LINE-1 retrotransposons in early spontaneous miscarriage. *Reprod Biol Endocrinol.* 2020;18(1):6. doi 10.1186/s12958-020-0564-x
- Lynch V.J., Nnamani M.C., Kapusta A., Brayer K., Plaza S.L., Mazur E.C., Emera D., ... Young S.L., Lieb J.D., DeMayo F.J., Feschotte C., Wagner G.P. Ancient transposable elements transformed the uterine regulatory landscape and transcriptome during the evolution of mammalian pregnancy. *Cell Rep.* 2015;10(4):551-561. doi 10.1016/j.celrep.2014.12.052
- Macfarlan T.S., Gifford W.D., Driscoll S., Lettieri K., Rowe H.M., Bonanomi D., Firth A., Singer O., Trono D., Pfaff S.L. Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. *Nature.* 2012;487(7405):57-63. doi 10.1038/nature11244
- Macia A., Widmann T.J., Heras S.R., Ayllon V., Sanchez L., Benkadour-Boumzaouad M., Muñoz-Lopez M., ... Menendez P., Ng P., Muotri A.R., Goodier J.L., Garcia-Perez J.L. Engineered LINE-1 retrotransposition in nondividing human neurons. *Genome Res.* 2017;27(3):335-348. doi 10.1101/gr.206805.116
- McKerrow W., Wang X., Mendez-Dorantes C., Mita P., Cao S., Grivainis M., Ding L., LaCava J., Burns K.H., Boeke J.D., Fenyö D. LINE-1 expression in cancer correlates with p53 mutation, copy number alteration, and S phase checkpoint. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2022;119(8):e2115999119. doi 10.1073/pnas.2115999119
- Mess A., Carter A.M. Evolutionary transformations of fetal membrane characters in Eutheria with special reference to Afrotheria. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2006;306(6):480-494. doi 10.1002/jez.b.21079
- Mi S., Lee X., Li X., Veldman G.M., Finnerty H., Racie L., LaVallie E., Tang X.Y., Edouard P., Howes S., Keith J.C., McCoy J.M. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature.* 2000;403(6771):785-789. doi 10.1038/35001608
- Mika K., Lynch V.J. Transposable elements continuously remodel the regulatory landscape, transcriptome, and function of decidual stromal cells. *Genome Biol Evol.* 2022;14(12):evac164. doi 10.1093/gbe/evac164
- Mika K., Marinić M., Chigurupati S., Lynch V.J. Evolutionary transcriptomics implicates new genes and pathways in human pregnancy and adverse pregnancy outcomes. *Elife.* 2021;10:e69584. doi 10.7554/eLife.69584
- Miki Y., Nishisho I., Horii A., Miyoshi Y., Utsunomiya J., Kinzler K.W., Vogelstein B., Nakamura Y. Disruption of the APC gene by a retrotransposon insertion of L1 sequence in a colon cancer. *Cancer Res.* 1992;52(3):643-645
- Molaro A., Hodges E., Fang F., Song Q., McCombie W.R., Hannon G.J., Smith A.D. Sperm methylation profiles reveal features of epigenetic inheritance and evolution in primates. *Cell.* 2011;146(6):1029-1041. doi 10.1016/j.cell.2011.08.016
- Nguyen T.H.M., Carreira P.E., Sanchez-Luque F.J., Schauer S.N., Fagg A.C., Richardson S.R., Davies C.M., ... Perrin L.C., Hooper J.D., Ewing A.D., Upton K.R., Faulkner G.J. L1 retrotransposon heterogeneity in ovarian tumor cell evolution. *Cell Rep.* 2018;23(13): 3730-3740. doi 10.1016/j.celrep.2018.05.090
- Percharde M., Lin C.J., Yin Y., Guan J., Peixoto G.A., Bulut-Karslioglu A., Biechele S., Huang B., Shen X., Ramalho-Santos M. A LINE1-nucleolin partnership regulates early development and esc identity. *Cell.* 2018;174(2):391-405.e19. doi 10.1016/j.cell.2018.05.043
- Ravel-Godreuil C., Znaidi R., Bonnifet T., Joshi R.L., Fuchs J. Transposable elements as new players in neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* 2021;595(22):2733-2755. doi 10.1002/1873-3468.14205

- Roy N., Haq I., Ngo J.C., Bennett D.A., Teich A.F., De Jager P.L., Olah M., Sher F. Elevated expression of the retrotransposon LINE-1 drives Alzheimer's disease-associated microglial dysfunction. *Acta Neuropathol.* 2024;148(1):75. doi 10.1007/s00401-024-02835-6
- Sato S., Gillette M., de Santiago P.R., Kuhn E., Burgess M., Doucette K., Feng Y., ... Birrer M.J., Skates S.J., Burns K.H., Carr S.A., Drapkin R. LINE-1 ORF1p as a candidate biomarker in high grade serous ovarian carcinoma. *Sci Rep.* 2023;13(1):1537. doi 10.1038/s41598-023-28840-5
- Sen S.K., Han K., Wang J., Lee J., Wang H., Callinan P.A., Dyer M., Cordaux R., Liang P., Batzer M.A. Human genomic deletions mediated by recombination between *Alu* elements. *Am J Hum Genet.* 2006;79(1):41-53. doi 10.1086/504600
- Slotkin R.K., Martienssen R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet.* 2007;8(4):272-285. doi 10.1038/nrg2072
- Smith Z.D., Chan M.M., Mikkelsen T.S., Gu H., Gnirke A., Regev A., Meissner A. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature.* 2012;484(7394):339-344. doi 10.1038/nature10960
- Taniguchi-Ikeda M., Kobayashi K., Kanagawa M., Yu C.C., Mori K., Oda T., Kuga A., Kurahashi H., Akman H.O., DiMauro S., Kaji R., Yokota T., Takeda S., Toda T. Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature.* 2011;478(7367):127-131. doi 10.1038/nature10456
- Tubio J.M.C., Li Y., Ju Y.S., Martincorena I., Cooke S.L., Tojo M., Gundem G., ... McDermott U., Campbell P.J.; ICGC Breast Cancer Group; ICGC Bone Cancer Group; ICGC Prostate Cancer Group. Mobile DNA in cancer: Extensive transduction of nonrepetitive DNA mediated by L1 retrotransposition in cancer genomes. *Science.* 2014;345(6196):1251343. doi 10.1126/science.1251343
- van den Hurk J.A.J.M., Meij I.C., Seleme M.C., Kano H., Nikopoulos K., Hoefsloot L.H., Sistermans E.A., de Wijs I.J., Mukhopadhyay A., Plomp A.S., de Jong P.T., Kazazian H.H., Cremers F.P. L1 retrotransposition can occur early in human embryonic development. *Hum Mol Genet.* 2007;16(13):1587-1592. doi 10.1093/hmg/ddm108
- Vasilyev S.A., Tolmacheva E.N., Vasilyeva O.Y., Markov A.V., Zhigalina D.I., Zatula L.A., Lee V.A., Serdyukova E.S., Sazhenova E.A., Nikitina T.V., Kashevarova A.A., Lebedev I.N. LINE-1 retrotransposon methylation in chorionic villi of first trimester miscarriages with aneuploidy. *J Assist Reprod Genet.* 2021;38(1):139-149. doi 10.1007/s10815-020-02003-1
- Warren J., Im M., Ballesteros A., Ha C., Moore T., Lambert F., Lucas S., Hinz B., Dveksler G. Activation of latent transforming growth factor- β 1, a conserved function for pregnancy-specific beta 1-glycoproteins. *Mol Hum Reprod.* 2018;24:602-612. doi 10.1093/molehr/gay044
- Wyrwoll M.J., Gaasbeek C.M., Golubickaite I., Stakaitis R., Oud M.S., Nagirnaja L., Dion C., ... Conrad D.F., Almstrup K., Veltman J.A., Tüttelmann F., van der Heijden G.W. The piRNA-pathway factor FKBP6 is essential for spermatogenesis but dispensable for control of meiotic LINE-1 expression in humans. *Am J Hum Genet.* 2022; 109(10):1850-1866. doi 10.1016/j.ajhg.2022.09.002
- Yano N., Chong P.F., Kojima K.K., Miyoshi T., Luqman-Fatah A., Kimura Y., Kora K., ... Hagiwara M., Kondo T., Kira R., Takita J., Yoshida T. Long-read sequencing identifies an SVA_D retrotransposon insertion deep within the intron of *ATP7A* as a novel cause of occipital horn syndrome. *J Med Genet.* 2024;61(10):950-958. doi 10.1136/jmg-2024-110056
- Zhang B., Xing X., Li J., Lowdon R.F., Zhou Y., Lin N., Zhang B., Sundaram V., Chiappinelli K.B., Hagemann I.S., Mutch D.G., Goodfellow P.J., Wang T. Comparative DNA methylome analysis of endometrial carcinoma reveals complex and distinct deregulation of cancer promoters and enhancers. *BMC Genomics.* 2014;15(1):868. doi 10.1186/1471-2164-15-868
- Zhang W., Huang C., Yao H., Yang S., Jiapaer Z., Song J., Wang X. Retrotransposon: an insight into neurological disorders from perspectives of neurodevelopment and aging. *Transl Neurodegener.* 2025;14(1):14. doi 10.1186/s40035-025-00471-y
- Zheng K., Wang P.J. Blockade of pachytene piRNA biogenesis reveals a novel requirement for maintaining post-meiotic germline genome integrity. *PLoS Genet.* 2012;8(11):e1003038. doi 10.1371/journal.pgen.1003038

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 25.11.2025. После доработки 22.01.2026. Принята к публикации 19.02.2026.

doi 10.18699/vjgb-26-70

Эволюция вида *Ovis aries*

Т.Н. Хамируев 

Научно-исследовательский институт ветеринарии Восточной Сибири – филиал Сибирского федерального научного центра агробиотехнологий Российской академии наук, Чита, Россия

 tnik0979@mail.ru

Аннотация. Овца – одно из первых одомашненных животных в неолитической Юго-Западной Евразии. Представленное исследование позволяет предположить, что одомашнивание овец произошло на Анатолийском плато, к северо-западу от общепринятых границ Плодородного полумесяца, а не внутри них. Однако многие аспекты процесса доместикиации (конкретное место, время и история после доместикиации) остаются до конца невыясненными. В обзоре подробно рассматривается филогенез, прослеживается основная роль азиатского муфлона (*Ovis gmelini*) как предка, а также обсуждаются спорные аспекты вклада других диких видов *Ovis*, раскрывается история интродукции и миграции овец в мире, обобщается современное научное понимание филогенетических связей между популяциями диких муфлонов и домашних овец (*Ovis aries*). Рассматриваются многогранный процесс приручения, обсуждаются предлагаемые эволюционные механизмы, такие как синдром одомашнивания, и гипотезы о гормонах щитовидной железы, а также опосредованный человеком отбор ключевых фенотипических признаков. В статье анализируются результаты, полученные с помощью различных генетических маркеров, включая гаплогруппы митохондриальной ДНК. Филогенетический анализ с использованием митохондриальной ДНК был успешно применен для выявления филогеографических закономерностей и времени дивергенции с раннего неолита и до средневековья, миграции овец из центра одомашнивания в Азию, Европу и Африку. Одомашненные овцы, пережившие и выдержавшие экстремальные изменения климата, происходившие в последний послеледниковый период, стали родоначальниками современных местных пород овец. Начиная с седьмого тысячелетия до нашей эры одомашненные овцы были завезены на Кавказ, в Центральную Азию и Европу. Распространение овец в Азии началось с Ближнего Востока на Монгольское плато и Индийский субконтинент, затем на север и юго-запад Китая. В России, территория которой занимает значительную часть Евразии, выведено уникальное породное разнообразие овец, при этом гаплогруппа В типична для пород овец европейского типа происхождения (западные географические регионы), а гаплогруппа А – для овец азиатского типа (восточные географические регионы).

Ключевые слова: эволюция; генетика; муфлон; доместикиация; домашняя овца; миграция; гаплогруппа


Для цитирования: Хамируев Т.Н. Эволюция вида *Ovis aries*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2026;30(4):696-707. doi 10.18699/vjgb-26-70

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (FNUU-2025-0003).

Evolution of the species *Ovis aries*

T.N. Khamiruev 

Research Institute of Veterinary Medicine of Eastern Siberia – Branch of the Siberian Federal Scientific Centre of AgroBioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, Chita, Russia

 tnik0979@mail.ru

Abstract. The sheep was one of the first domesticated animals in Neolithic Southwest Eurasia. The presented study suggests that the domestication of sheep occurred on the Anatolian plateau, to the northwest of the commonly accepted boundaries of the Fertile Crescent, rather than within it. However, many aspects of the domestication process (the specific place, time, and history after domestication) have remained not fully understood. The review examines in detail the complex origin, traces the primary role of the Asian mouflon (*Ovis gmelini*) as an ancestor, and also discusses controversial aspects of the contribution of other wild *Ovis* species. It reveals the history of the introduction and migration of sheep in the world, and summarizes the current scientific understanding of the phylogenetic relationships between populations of wild mouflons and domestic sheep (*Ovis aries*). A multifaceted process of domestication is considered, and the proposed evolutionary mechanisms are discussed, such as the domestication syndrome and hypotheses about thyroid hormones, as well as the human-mediated selection of key phenotypic traits. The article analyzes the results obtained using various genetic markers, including mitochondrial DNA haplogroups. Phylogenetic analysis using mitochondrial DNA has been successfully applied to identify the phylogeographic patterns and divergence times, from the early Neolithic to the Middle Ages, of sheep migration from the domestication center to Asia, Europe, and Africa. Domesticated sheep, having survived and endured extreme climate changes that occurred in the last post-glacial period, became the ancestors of modern local sheep breeds. Starting from the seventh millennium BC, domesticated sheep were brought to the Caucasus, Central Asia, and Europe. The spread of sheep in Asia began from the Middle East to the

Mongolian Plateau and the Indian subcontinent, then to the north and southwest of China. In Russia, the territory of which covers a significant part of Eurasia, a unique breed diversity of sheep has been developed, with haplogroup B typical for breeds of the European-type origin (western geographic regions), and haplogroup A of the Asian-type sheep (eastern geographic regions).

Key words: evolution, genetics, mouflon, domestication, domestic sheep, migration, haplogroup

For citation: Khamiruev T.N. Evolution of the species *Ovis aries*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(4):696-707. doi 10.18699/vjgb-26-70

Введение

Род *Ovis* насчитывает около 8.31 млн лет существования и включает восемь ныне живущих видов: домашнюю овцу (*Ovis aries*), аргали (*O. ammon*), азиатского муфлона (*O. orientalis*), европейского муфлона (*O. musimon*), уриала (*O. vignei*), толсторога (*O. canadensis*), тонкорого (*O. dalli*) и снежного барана (*O. nivicola*) (Rezaei et al., 2010). При этом происхождение и «дикий» статус европейского муфлона – предмет значительных дискуссий (Hiendleder et al., 2002; Chessa et al., 2009). Р. Mereu с коллегами (2025) считают, что его следует отнести к подвиду азиатского муфлона. Исторически считалось, что европейские муфлоны, особенно те, которые обитают на Корсике и Сардинии, являются остатками древней популяции европейских диких овец (Poplin, 1979). Однако археологические данные свидетельствуют о том, что они были завезены людьми на Кипр в раннем неолите (примерно 10000 лет назад), а затем на Корсику и Сардинию (Vigne et al., 2011). Эти популяции были далеки от одомашнивания в современном понимании, а содержались в огороженных местах лишь для защиты от хищников и обеспечения постоянного, легкодоступного источника мяса и шкур с минимальным взаимодействием между людьми и животными (Barbato et al., 2022; Portanier et al., 2022; Mereu et al., 2024).

Домашняя овца *O. aries* Linnaeus относится к числу первых domesticiрованных видов домашнего скота. Одомашнивание произошло около 12000 лет назад на Ближнем Востоке в районе гор Загроса (Her et al., 2022; Mereu et al., 2024), при этом многие аспекты процесса одомашнивания, такие как конкретное место и время, остаются невыясненными (Kaptan et al., 2024). Впоследствии в результате миграции человека овцы распространились по всей Евразии и под действием естественного и искусственного отбора образовали различные популяции (Wang et al., 2025).

Происхождение домашней овцы включало первоначальное одомашнивание и раннюю дивергенцию, за которыми последовала обширная постнеолитическая диверсификация. На раннем этапе одомашнивания участие человека было минимальным и в основном сконцентрировано на защите и обеспечении овец кормами, а не на интенсивном разведении с целью развития конкретных признаков (Portanier et al., 2022; Mereu et al., 2025). Крайне важно понимать эту примитивную фазу одомашнивания овец, чтобы различать генетические изменения, существовавшие до одомашнивания, и те, которые непосредственно связаны с отбором, осуществляемым человеком. Этот исторический контекст показывает, что одомашнивание – это не единичное событие, а непрерывный процесс, характеризующийся постепенным накоплением генетических,

фенотипических и физиологических изменений (Jackson et al., 2020; Mereu et al., 2024).

F. Teletchea и P. Fontaine (2014) предложили классификацию с пятью уровнями одомашнивания: первый уровень соответствует начальным испытаниям по акклиматизации диких животных в неволе. Затем, когда часть жизненного цикла находится под контролем, наступает второй уровень, где наиболее важным является размножение в неволе, третий уровень – когда весь жизненный цикл находится под контролем, но инстинкты диких предков еще присутствуют. На четвертом уровне одомашненные животные существенно отличаются от своих диких сородичей. А пятый уровень приводит к созданию определенных пород. Важно отметить, что различные группы популяций в пределах одного вида действительно могут отображать разные уровни одомашнивания, даже в пределах одной географической области (Teletchea, Fontaine, 2014; Zeder, 2015).

Несмотря на интенсивную работу с использованием геномных данных современных овец (Lv et al., 2022; Матюков и др., 2023; Денискова, 2025; Dossybayev et al., 2025), ни точное местонахождение, ни дикие предки, участвовавшие в первом процессе одомашнивания, ни постнеолитическая демографическая история популяций домашних овец или муфлонов до сих пор не выяснены (Kaptan et al., 2024).

Происхождение домашних овец

Один из открытых вопросов – происхождение генофонда домашних овец. Более ранние исследования указывали на несколько видов азиатских овец (*O. ammon*, Linnaeus, 1758; *O. gmelini*, Blyth, 1841; *O. vignei*, Blyth, 1841) как на вероятного предка домашних овец (Pedrosa et al., 2005; Sanna et al., 2015). Однако недавние генетические исследования подтверждают гипотезу о том, что азиатский муфлон является единственным прародителем домашней овцы (Chen et al., 2021), при этом, по мнению D. Kaptan с коллегами (2024), данный факт полностью не установлен. Более поздние геномные исследования указывают, что ген *VPS13B* демонстрирует сигналы интрогрессии от уриала или муфлона, а аргали внесли аллели в линии домашних овец Юго-Восточной Азии, интрогрессировав ген *MSRB3*, который, как было установлено, специфически связан с вариациями морфологии ушей (Cheng et al., 2023).

Вид *O. gmelini* включает пять подвидов: армянский муфлон (*O. gmelini gmelini*, Blyth, 1841); исфаханский муфлон (*O. gmelini isphananica*, Nasonov, 1910); ларистанский муфлон (*O. gmelini laristanica*, Nasonov, 1910); кипрский муфлон (*O. gmelini ophion*, Blyth, 1841) и азиатский муфлон (*O. gmelini anatolica*, Valenciennes, 1856). Из-за сложной внутривидовой таксономии азиатского муфлона

генетический вклад различных подвидов в одомашнивание овец остается неясным (Demirci et al., 2013; Li R. et al., 2021; Daly et al., 2025). По мнению D. Sanna с коллегами (2015), эти подвиды представляют собой местные дикие популяции с начала голоцена, за исключением кипрского муфлона, завезенного с материковой Анатолии примерно в 12-м тысячелетии до н. э.

S. Hiendleder с коллегами (2002) предположили, что овцы были одомашнены из двух разных подвидов в Турции и западном Иране (Ближний Восток), соответствующих линиям мтДНК А и В домашних овец соответственно. Значительное нуклеотидное разнообразие митохондриальных линий в этом регионе подтверждает географическую роль в одомашнивании овец и указывает на более сложную картину доместикизации, чем предполагалось ранее (Meadows et al., 2007; Machová et al., 2022).

Недавние исследования, включающие генетические и географические данные азиатских муфлонов по всему ареалу их распространения, а также современных и древних овец из Анатолии, Юго-Западной Азии, Европы и Африки, дают основание считать, что раннее овцеводство, вероятно, зародилось в Анатолии и связано с азиатским подвидом муфлона (*O. gmelini anatolica*) (Her et al., 2022; Atağ et al., 2024; Sandoval-Castellanos et al., 2024).

Предполагается, что азиатские и кипрские муфлоны в прошлом подвергались одомашниванию, по классификации F. Teletchea и P. Fontaine (2014) соответствующему первому уровню (Sanna et al., 2015; Barbato et al., 2017). Однако это пока лишь предположение, и генетические связи между этими муфлонами, древними и современными домашними овцами остаются до конца неясными.

Еще один в значительной степени нерешенный вопрос – история пород домашних овец. Современные породы овец делят на две основные географические группы: Европа и Азия–Африка (Naval-Sanchez et al., 2018; Li X. et al., 2020). Это восточное и западное генетическое разделение прослеживается до 7000–6000 гг. до н. э., что указывает на их раннюю диверсификацию. Такое разделение также наблюдается и в современных группах митохондриальных гаплотипов овец: европейские овцы в основном несут гаплотип В (> 50 % от поголовья овец в мире), а азиатские – преимущественно гаплотип А (34 % от поголовья овец в мире) (Machová et al., 2022; Mereu et al., 2024).

На основе анализа полиморфизма контрольного региона мтДНК овец было идентифицировано семь гаплогрупп, две из которых (F и G) исчезли, а пять других присутствуют в современных породах (Wood, Phua, 1996; Chen et al., 2021). Кроме упомянутых А и В гаплогрупп, обнаружена третья признанная филогенетическая ветвь, гаплогруппа С (9 % от поголовья овец в мире), выявленная у местных португальских овец, особей с Кавказа, Ближнего Востока и Азии (Guo et al., 2005; Pedrosa et al., 2005; Pereira et al., 2006; Mereu et al., 2024). Затем была идентифицирована четвертая материнская линия, гаплогруппа D, наиболее близкая к *O. gmelini anatolica* (Demirci et al., 2013; Sanna et al., 2015).

Гаплогруппа E, идентифицированная с помощью анализа последовательностей D-петли, *CytB* и всего мито-

генома, – ключевая митохондриальная линия иранского азиатского муфлона (Mereu et al., 2025; Wang et al., 2025). Последние обнаруженные гаплогруппы D и E (<0.5 % от поголовья овец в мире) – самые редкие, выявлены только у животных из Турции, Кавказа (Tapio et al., 2006), Европы (Gáspárdy et al., 2021), Тибета (Liu et al., 2016), Ирана (Rafia, Tarang, 2016). Все гаплогруппы образовались предположительно от 5 до 35 тыс. лет назад (Rezaei et al., 2010).

В научной литературе сообщается о восьмой, «дикий», митохондриальной линии X, которая встречается у кипрских, азиатских и иранских муфлонов и, по-видимому, является базальной по отношению к домашним гаплогруппам С и E (Guerrini et al., 2021; Mereu et al., 2025).

Результаты исследований древней ДНК позволили установить, что азиатские неолитические овцы преимущественно схожи с современными европейскими породами, в то время как киргизские неолитические овцы больше схожи с современными азиатскими породами, что предполагает раннее формирование данного разделения (Yurtman et al., 2021).

Эти закономерности подразумевают либо наличие нескольких центров одомашнивания, либо большую гетерогенную популяцию-предшественницу, прошедшую через несколько независимых «бутылочных горлышек». Однако в исследовании E. Yurtman с коллегами (2021) все современные породы показали значительное генетическое сходство друг с другом, чем с неолитическими овцами, что говорит о значительном смешении пород в постнеолитический период среди континентальных популяций овец, включая возможную интрогрессию от диких овец в домашние стада, а также о распространении и разведении овец с желаемыми признаками по континентам (Deng et al., 2020; Cheng et al., 2023).

Интрогрессия от диких родственников в популяции домашних овец позволила последним адаптироваться к различным условиям окружающей среды и распространиться по всему миру, претерпевая генетические улучшения в различных системах производства. Установлены общие сигналы интрогрессии аллелей в генах, связанных с обонянием (*ADCY3* и *TRPV1*), и семействе генов *PADI*, включая *PADI2*, сопряженный с врожденным иммунитетом.

Дальнейший анализ полногеномных последовательностей показал, что интрогрессированные аллели в определенном регионе *PADI2* (chr2: 248302667–248306614) коррелируют с устойчивостью к пневмонии. Это позволило овцам адаптироваться к различным климатическим и экологическим условиям после одомашнивания (Ciani et al., 2020; Cao et al., 2021). В результате возникло множество уникальных пород, а обширные вариации, наблюдаемые как в местных, так и в улучшенных породах, подчеркивают геномное разнообразие, адаптивные характеристики и важные признаки продуктивности, присущие домашним овцам (Li X. et al., 2020; Cao et al., 2021; Alipanah et al., 2025). Дифференциация местных популяций овец на породы стала более выраженной с XVIII в. благодаря использованию систематического разведения с четко определенными целями (Ciani et al., 2020).

Изменение фенотипа домашних овец

При переходе от диких предков-муфлонов к современным домашним овцам сформировался ряд морфологических, физиологических и поведенческих признаков, которые привели к нынешним фенотипическим различиям между дикими и одомашненными видами. Эти признаки, включая размер мозга и зубов, размер и форму ушей и хвоста, пятнистую окраску, гормональные изменения и продолжительность репродуктивного сезона, характеризуют многие виды, которые были одомашнены различными способами и по разным причинам. Более того, некоторые из этих признаков, по-видимому, появились без целенаправленного отбора – уменьшение размеров тела, изменение размера и формы хвоста (Zeder, 2015).

Жирнохвостые овцы произошли от тонкохвостых овец в результате длительного естественного отбора в чрезвычайно суровых географических и климатических условиях (Caiye et al., 2023). Наличие жирного хвоста позволяет овцам лучше адаптироваться к суровым условиям окружающей среды (Kalds et al., 2022a). Связь между одомашниванием и набором фенотипических признаков впервые была отмечена С.Р. Дарвином (1875) и до сих пор полностью не выяснена.

S.J. Crookford с коллегами (2002) предположили, что фенотипические признаки одомашненных животных могут быть связаны с изменениями «сигнальных действий» гормонов щитовидной железы. В свою очередь, A.S. Wilkins с коллегами (2014) предложили гипотезу о «синдроме одомашнивания», согласно которой фенотипические признаки домашних видов животных могут быть связаны с изменениями в формировании, дифференциации или миграционных паттернах клеток нервного гребня (Wilkins et al., 2020). Обе гипотезы позже были оценены на основе геномных данных, и хотя гипотеза «синдрома одомашнивания» получила значительную поддержку, они не обязательно являются взаимоисключающими, поскольку могли по-разному влиять на процесс доместикации во времени и пространстве (Karlsson et al., 2016; Fitak et al., 2020).

Таким образом, отбор по признаку «покладистость», вероятно, косвенно влиял на широкий набор генов и сигнальных путей, участвующих в поведении, морфологии и физиологии. Однако с учетом вышеизложенных гипотез нельзя упускать из виду то, что для некоторых признаков целенаправленный отбор, осуществляемый человеком, следует рассматривать как наиболее правдоподобную гипотезу развития фенотипа одомашненного животного (Mereu et al., 2024).

Дикие предки обычно обладали рогами у обоих полов, грубой шерстью и специфическими цветовыми узорами, постепенно эволюционировали преимущественно в комолые, шерстные породы овец с белым цветом шерсти (Garel et al., 2022). Эти трансформации раскрывают важные аспекты селективного давления, действовавшего во время одомашнивания.

Дикие овцы – обычно рогатые, что имеет значение для внутривидовой конкуренции (Hu et al., 2016). В отличие от них, домашние овцы – чаще комолые (Simon et al., 2022). Важную роль в наличии или отсутствии рогов играет ген

RXFP2 (Cheng et al., 2023). Комолость связана со вставкой 1.8 кб в 3'-нетранслируемой области гена *RXFP2*, но этот вариант не полностью объясняет изменчивость состояния рогов у разных пород (Simon et al., 2022).

Ключевой трансформацией стали потеря способности ежегодной линьки шерсти у диких муфлонов и непрерывный рост шерсти у домашних овец (Jackson et al., 2020). Вариателность цвета шерсти, часто белого, у домашних овец – сложный признак, на который влияют такие гены, как *Extension* (ген *E*), *ASIP* (*agouti*) и *POMC*, регулирующие выработку меланина (Trigo et al., 2021; Zhang et al., 2023).

Короткий тонкий хвост муфлона предполагает, что разнообразные фенотипы хвоста, наблюдаемые у домашних овец, появились позже в процессе одомашнивания (Kalds et al., 2022b). Развитие жирного хвоста, например, считается адаптивным ответом на изменение климата, при этом древние селекционеры отбирали овец с жирными хвостами за их повышенную адаптивность к условиям пустыни и как ценный источник жира (Ahbara et al., 2022; McManus et al., 2025). Такие гены, как костный морфогенетический белок 2 (*BMP-2*) и фактор роста тромбоцитов D (*PDGF-D*), являются потенциальными генами-маркерами формы и размера хвоста (Luo et al., 2023; Jin et al., 2026). Ген транскрипционного фактора T-box T (*TBXT*) участвует в регуляции длины хвоста у млекопитающих, включая овец (Kalds et al., 2022b). Генотип CT/CT гена *TBXT*: с. [333G>C; 334G>T] обнаружен у курдючных пород овец и отсутствовал у пород с длинным и коротким хвостом (Han et al., 2019).

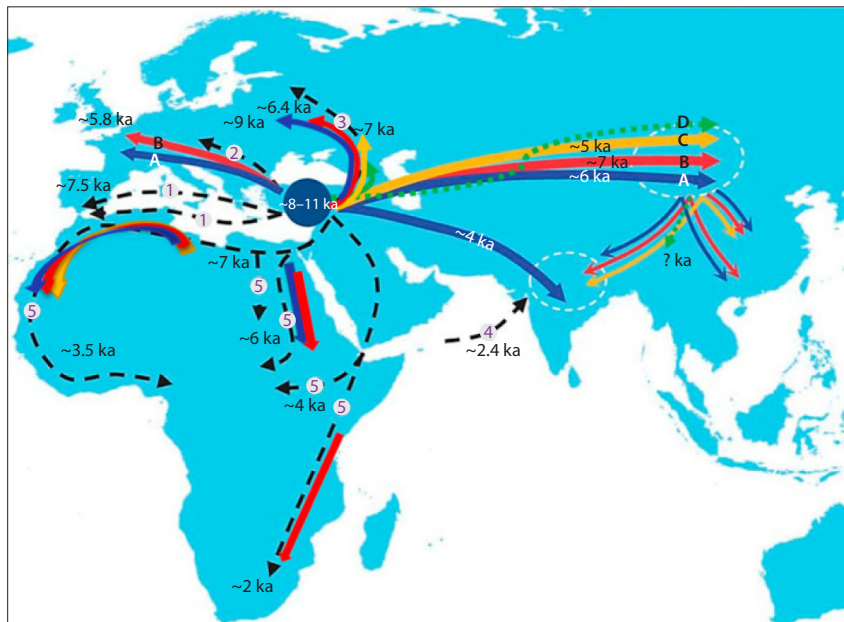
Возникновение этих фенотипических изменений не случайное, а представляет собой прямую адаптацию к условиям окружающей среды, подчеркивая сильное селективное давление, оказываемое человеком в процессе одомашнивания. Анализ этих фенотипических сдвигов в сочетании с идентификацией лежащих в их основе генов дает ценные сведения о генетической архитектуре одомашнивания и о том, как потребности человека и факторы окружающей среды формировали эволюцию вида *O. aries*.

Более поздние интродукции от диких предков к домашним овцам содержат локусы с потенциальными генами одомашнивания *PAPPA2*, *NR6A1*, *SH3GL3*, *RFX3* и *SAMK4*, связанными с морфологическими, иммунными, репродуктивными или продуктивными признаками (шерсть, мясо, молоко); *NEURL1* – нервной реакцией, *PRUNE2* – нейрогенезом, *USH2A* – слухом, *AGTPBP1*, *CRTAC1* и *RPGRIP1L* – обонянием, *PAG11* и *PAG3* – жизнеспособностью плаценты (Chen et al., 2021), *FAT3* – адаптацией к засушливой среде (Yang J. et al., 2016), *PCDH15* – иммунным ответом (Atlija et al., 2016), *PDGFD* – формой хвоста (Li X. et al., 2020).

Миграция одомашненных овец

Начиная с 7-го тысячелетия до н. э. домашние овцы были завезены из Юго-Западной Азии на северо-восток, на Кавказ (Chataigner et al., 2014), в Центральную Азию (Taylor et al., 2021) и Европу (Arbuckle, Atici, 2013; Lv et al., 2015).

По F.-H. Lv с коллегами (2015) и K. Machová с коллегами (2022), распространение овец по континентам из центра одомашнивания происходило в соответствии с рисунком.



Основные пути распространения овец из центра одомашнивания (ка – тыс. лет назад) (Lv et al., 2015; Machová et al., 2022).

A, B, C, D – пути основных митохондриальных линий (Lv et al., 2015; Liu et al., 2016).

Маршруты: 1 – средиземноморский (Ryder, 1984; Zeder, 2017); 2 – дунайский (Ryder, 1984; Zeder, 2017); 3 – в Северную Европу (Tapió et al., 2006); 4 – маршруты древнего морского пути на Индийский субконтинент (Singh et al., 2013); 5 – маршруты в Африку (Gornas et al., 2011; Álvarez et al., 2013; Muigai, Hanotte, 2013; Resende et al., 2016).

Существует предположение о наличии двух путей распространения овец из Анатолии в Европу: континентальный и морской через Средиземное море (Racimo et al., 2020; Brigand et al., 2022). Овцы Северной Франции эпохи неолита попали на данную территорию вместе с культурой линейно-ленточной керамики, которая, как известно, распространилась на запад от среднего Дуная в бассейны Рейна и Сены, а также на север и восток в бассейны Эльбы и Вислы (Nachem, 2018; Auxiette, Nachem, 2021).

Иберийские овцы эпохи неолита, возможно, были завезены средиземноморским морским путем (Kartan et al., 2024). Позже произошло заселение Северной Италии и Южной Франции. Затем, по дунайскому пути, овцы распространились в Центральную и Северную Европу (Larsson et al., 2024). В Альпах овцы оказались чуть более 5000 лет назад, на Пиренейском полуострове – 7700–7300 лет назад (Испания, Португалия) (Chen et al., 2021). Однако, согласно другой гипотезе, имело место заселение Северной Европы через центр одомашнивания на Кавказе (Tapió et al., 2006; Niemi et al., 2013).

Анализ распространения линий в Восточной Евразии показал наличие двух миграционных волн овец, происшедших 4.5–6.8 тыс. лет назад (линии A и B – около 6.4–6.8 тыс. лет назад; C – около 4.5 тыс. лет назад) (Lv et al., 2015).

Согласно исследованию D. Cai с коллегами (2011), линия A была самой многочисленной в Древнем Китае бронзового века (95.5 %), ее численность увеличивалась с запада на восток. Предполагается, что овцы из ближневосточного центра одомашнивания мигрировали через Кавказ и Центральную Азию и расселились в Северном

и Юго-Западном Китае (линии A, B и C), а затем на Индийском субконтиненте (линии B и C) (Lv et al., 2015).

Распространение овец в Азии могло происходить несколькими путями, как это было в Европе (Singh et al., 2013). Комбинированный филогенетический анализ с использованием древних и современных митогеномов овец показал, что Узбекистан и Монгольское плато (Алтай) могли быть миграционными центрами распространения овец в Восточной Азии. Через Узбекистан и Северо-Западный Китай овцы распространились по среднему и нижнему течению р. Хуанхэ (около 4000 г. до н. э.), через Монгольское плато (Алтай) – к центральной части Внутренней Монголии (около 4429–2500 г. до н. э.) (Yang L. et al., 2024). В более ранних работах подтверждается, что в Китай овцы распространились с Монгольского плато приблизительно 5000–5700 лет назад. Затем, примерно 2000–2600 лет назад, овцы попали на Цинхай-Тибетское и Юньнань-Гуйчжоуское плато, следуя маршрутам миграции народа Ди-Цян с севера на юго-запад (Zhao Y.X. et al., 2017).

В Северную Африку овцы, вероятно, проникли двумя путями около 7000 лет назад: первый – это колонизационное расселение через Средиземноморский бассейн, второй – по Синайскому полуострову через Красное море (Zeder, 2017). На африканском континенте существовало несколько путей расселения: на юг к долине Среднего Нила, на запад к центральной Сахаре и на север к Ливии. Еще одна возможность – распространение овец из Средиземноморья вдоль северных берегов Африки. Кроме того, предполагается и прямая торговая связь между Восточной Африкой и Аравийским полуостровом (Muigai,

Hanotte, 2013). Как и в Европе, в Африке доминирует митохондриальная гаплогруппа В, что подтверждено исследованиями в разных регионах континента – Южной Африке (Horsburgh, Rhines, 2010), Судане (Gornas et al., 2011), Кении (Resende et al., 2016), Западной Африке и Канарских островах (Álvarez et al., 2013).

Распространение овец в Австралии происходило в современной истории в XVIII–XIX вв. (Ciani et al., 2015). Первые овцы, привезенные испанцами в Центральную Америку, были либо тонкорунными (западноафриканские тонкорунные овцы), либо грубошерстными (с Иберийского полуострова), которые позже были скрещены с мериносом и дали начало креольскому типу овец (Alonso et al., 2017).

В Америку тонкорунные овцы были привезены с Канарских островов Х. Колумбом и первыми колонизаторами, а в начале XVII в. – вместе с рабами из других регионов Западной Африки, и их вклад в генофонд современных американских тонкорунных овец является наиболее значительным (Spangler et al., 2017).

В Австралию первые овцы были завезены из Индии, Южной Африки (жирнохвостые) и Испании (мериносы) после 1788 г., а также с Британских островов (саксонские мериносы, саутдаунские и ромни) после 1840 г. (Ryder, 1984). Таким образом, можно предположить существование тех же гаплотипов, что и в популяциях, из которых произошли австралийские породы. Это предположение подтвердилось исследованием, проведенным на 18 породах, содержащихся в Австралии, которое выявило 55 % распространенности гаплогруппы В и 45 % распространенности гаплогруппы А (Meadows et al., 2005).

На основе анализа древних образцов установлено, что современные породы демонстрируют большее генетическое сходство друг с другом, чем с неолитическими овцами, что подразумевает значительное постнеолитическое смешение популяций овец (Kaptan et al., 2024).

Изначально овцеводство было сосредоточено в основном на производстве мяса, а специализация на шерсти и молоке возникла в Азии (7–6 тыс. лет до н. э.) и затем в Европе (Becker et al., 2016; Deng et al., 2020). Специализация на производстве шерсти, по всей видимости, зародилась в Юго-Западной Азии и только затем распространилась в Европу, что подтверждается исследованиями В. Chessa с коллегами (2009) и анализом ДНК европейских овец бронзового века (Sabatini et al., 2019). Археологические находки также указывают на появление новой породы в Центральной Европе в позднем каменном веке. Сравнение с более ранними данными подтвердило увеличение размеров тела овец, разводимых в районе Богемии и Моравии (территория современной Чехии), а также с начала бронзового века – в Венгрии (Kyselý, 2016). Другим примером служит распространение мериносовых овец с Пиренейского полуострова со второй половины XV в. по всей Европе (Landi et al., 2019).

Раннее одомашнивание подчеркивает основополагающую роль овец в истории человечества, поскольку с тех пор они представляют собой важнейший ресурс в глобальном масштабе, обеспечивая население по всему миру

мясом, шерстью, смушками, овчинами, молоком и другим необходимым сырьем (Kaptan et al., 2024; Mereu et al., 2024).

Раннее одомашнивание, вероятно, было менее контролируемым процессом, основанным на использовании доступного дикого поголовья, а не на интенсивной селекции одной однородной предковой группы. Следовательно, генетическое разнообразие, наблюдаемое у современных овец, частично отражает древнее разнообразие диких овец и не является исключительно продуктом постодомашненной мутации или отбора. При этом ранняя радиация (около 810 тыс. лет назад) обусловила изменчивость домашних овец и муфлонов (Mereu et al., 2025).

Таким образом, процесс доместикиции овец следует рассматривать не как упрощенную модель одомашнивания в виде единичного события из однородной предковой популяции, а как более сложное действие, включающее заимствование разнообразных диких генетических фонов.

Филогенетический анализ современных пород овец на основе мтДНК

Последующее разведение одомашненных овец, наряду с естественным и искусственным отбором, привело к появлению не менее 1400 пород, а длительная селекционная деятельность людей играла важную роль в формировании у овец необходимых продуктивно-биологических признаков (Дымова и др., 2019). Сравнительный анализ генетического разнообразия древних и современных овец способствует лучшему пониманию процессов происхождения этих животных, доместикиции и их миграции, а также позволяет оценить роль человека на разных этапах формирования современного биологического разнообразия пород овец (Lv et al., 2015).

В исследованиях Х. Ли с коллегами (2020) у 36 местных и 6 культурных пород овец (*O. aries*) Европы, Азии, Африки и Ближнего Востока установлен более низкий уровень геномного разнообразия по сравнению с их дикими предками (*O. orientalis*). Это свидетельствует о том, что существенная часть геномной изменчивости была утрачена во время и после одомашнивания, при этом геномное разнообразие у местных пород овец сохранилось в более значительной степени, чем у культурных пород.

Формирование пород овец в Европе, по мнению Е. Циани с коллегами (2020), свидетельствует, что греческие породы овец выступали барьером между азиатскими и европейскими породами. По всей видимости, Греция оставалась «слепым пятном» на эволюционной карте миграции овец в Западную Европу, поскольку до сих пор не оценены исторические закономерности генного потока (Michailidou et al., 2025).

У итальянских пород овец гаплогруппа В преобладала в древних образцах (90 %), тогда как гаплогруппа А обнаружена в 10 % образцов и соответствует современному распределению у современных овец в Италии. Это свидетельствует о том, что нынешнее соотношение гаплогрупп А и В сформировалось еще в Средние века и не является результатом последующих событий, таких как селекционная работа (Gabbianelli et al., 2015). Восемь наи-

более распространенных местных пород овец Болгарии продемонстрировало высокую распространенность европейской гаплогруппы В (95.2 %), в то время как остальные особи были отнесены к гаплогруппе А (4.8 %). Сеть медианного соединения показала, что почти все гаплотипы, принадлежащие к гаплогруппе В, образуют звездообразную сеть, что свидетельствует о слабой генетической дифференциации и большом генном потоке между болгарскими аборигенными породами (Kalaydzhiev et al., 2023).

У двух венгерских пород, цигаи и чикта, подтверждено наличие гаплогрупп В и А, а гаплогруппы С – только у породы чикта. При этом преобладает гаплогруппа В, которая находится на уровне более 80 % в обеих породах, что подтверждает наличие общего предкового корня (Gásrárdy et al., 2022). Однородное материнское происхождение девяти пород овец Восточной Адриатики, характерное для европейских пород, установлено в исследованиях М. Ferencakovic с коллегами (2013), анализ митохондриальной ДНК выявил у них высокую частоту гаплотипов типа В.

У 27 проанализированных индийских пород овец обнаружено три линии мтДНК, а именно А, В и С. Линия А преобладала среди индийских овец, тогда как линии В и С наблюдались с низкой частотой. При этом породы мандья и сонати значительно отличались от других индийских пород высокой долей линии В, которая, предположительно, попала на Индийский субконтинент не с Монгольского плато, а по Аравийскому морскому пути (Kamalakkannan et al., 2021). Авторы цитируемой работы на основании проведенных исследований, вопреки существующим гипотезам, считают, что одомашнивание овец гаплогруппы А произошло на Индийском субконтиненте.

Филогенетический анализ последовательности D-петли мтДНК 963 особей 16 аборигенных пород, распространенных в семи географических регионах Китая, показал, что три гаплогруппы, А, В и С, были установлены у всех пород, за исключением горного региона Юго-Западного Китая, где присутствовали только гаплогруппы А и В (Zhao E. et al., 2013).

Семь местных индонезийских пород овец на острове Ява тесно связаны между собой и объединены в две гаплогруппы, А и В. При этом большинство из них относится к гаплогруппе В, за исключением овец пород гарут и прианган (Ibrahim et al., 2023). Овцы основной породы Вьетнама фанранг принадлежат к гаплогруппам А (28 %) и В (72 %), что подтверждает гипотезу об их двойном происхождении с влиянием как азиатской, так и европейской линий (Luong et al., 2024). Филогенетический анализ шести пород овец Казахстана показал, что 44 % животных принадлежали к гаплогруппе А, 39 % – к гаплогруппе В и 17 % – к гаплогруппе С, что согласуется с распределением гаплогрупп у древних домашних овец. В настоящее время линия А преобладает в казахских породах овец. Это указывает на то, что большая часть казахских пород овец генетически ближе к азиатскому генотипу, чем к европейскому (Tarlykov et al., 2021).

Овцы в Африке принадлежат к разным митохондриальным линиям, что дает им преимущество в генетическом

разнообразии пород и популяций, имеет практическое значение для использования в селекционных программах по повышению продуктивности и приспособительных качеств. Метаанализ 399 пород позволил обнаружить три основные гаплогруппы, А, В и С, причем гаплогруппа В является доминирующей (Wanjala et al., 2021; Salim et al., 2023).

В настоящее время в России разводят 17 тонкорунных пород (57.9 % от общей численности овец), 17 – полутонкорунных (4.1 %), 2 – полугрубошерстные (1.1 %), 16 – грубошерстных пород (30. %), неидентифицированные (6.6 %) (Бригида и др., 2025). Полутонкорунные породы овец в основном имеют мясо-шерстное направление продуктивности, а полугрубошерстные и грубошерстные – мясо-сальное направление. Многочисленность пород овец в стране связана с многообразием природно-климатических и географических зон.

Генетический анализ мтДНК древних овец России свидетельствует о том, что в период ранней бронзы по крайней мере две линии (А и В) существовали на юге Западной Сибири (Дымова и др., 2019). Секвенирование D-петли митохондриальной ДНК из 17 останков костей овец (возрастом ~4000–1000 лет), найденных в археологических комплексах на юге Алтая (Россия), показало присутствие митохондриальных линий А, В, С, D и E. Относительно высокое разнообразие гаплотипов овец, включая наличие двух базальных гаплотипов, указывает на то, что Алтайский регион мог быть транспортным путем миграции одомашненных овец. Определение принадлежности древних образцов к филогенетическим линиям показало, что к линии В относится 70 %, А – 25 %, С и D – по 2.5 % (Dymova et al., 2017).

Филогенетический анализ 25 российских местных пород овец позволил выявить четыре гаплогруппы, включая А, В, С и D, что объясняется широким ареалом исследуемых животных; наиболее распространенными оказались гаплогруппы В и А, характерные для овец европейского и азиатского происхождения, при этом линия В преобладала в Западной части России (Кошкина и др., 2021).

Анализ сети медианного соединения и байесовского дерева российских пород показал, что наиболее часто встречается гаплогруппа В (64.8 %), на гаплогруппу А приходилось 28.9 %, на гаплогруппу С – 5.5 %, и только 0.8 % отнесено к гаплогруппе D. Отмечается, что гаплогруппы А и В присутствовали во всех породах овец, гаплогруппа С была представлена гаплотипами пород овец из Северо-Кавказского и Дальневосточного федеральных округов, тогда как гаплогруппа D обнаружена у одного животного Южного федерального округа (Koshkina et al., 2023). М. Тарюс с коллегами (2006) выявили гаплогруппу D у одного животного карачаевской породы на Северном Кавказе, что указывает на наличие этой митохондриальной линии на территории России.

Изучение нуклеотидной последовательности D-петли мтДНК у овец тонкорунных пород (сальской, ставропольской и советского меринуса) показало разделение исследуемых популяций овец на два кластера: первый кластер представлен гаплогруппой В, характерной для европей-

ских домашних овец, а также овец Новой Зеландии и Австралии, второй – гаплогруппой А (около 30 %), доминирующей у азиатских овец. Полученные результаты исследований позволили установить сходство и различие овец мериносовых пород России с мериносами европейской и австралийской селекции (Широкова и др., 2018). При определении овец романовской (Бакоев и др., 2018) и куйбышевской пород (Кошкина и др., 2022а) установлено, что они принадлежат к гаплогруппе В.

Анализ митохондриальных геномов трех пород разного направления продуктивности (грозненская – тонкорунная, горноалтайская – полутонкорунная и буубэй – грубошерстная) из различных эколого-кормовых регионов страны показал, что все особи трех пород отнесены к общепринятым гаплогруппам А ($n = 46.7\%$), В ($n = 46.7\%$) и С ($n = 6.6\%$), характерным для овец европейского и азиатского происхождения (Кошкина и др., 2022б).

Заключение

На основании проведенного анализа научно-информационных источников в предметной области установлено, что при одомашнивании такие аспекты, как конкретное место, время и дальнейшее развитие после домостикации, на сегодня до конца остаются невыясненными.

Митохондриальная ДНК является отличным инструментом эволюционной биологии. Она наследуется из поколения в поколение практически без изменений, поскольку не участвует в рекомбинации; таким образом, время возникновения каждой мутации можно оценить на основе средней скорости мутаций. Благодаря этому женские гаплогруппы позволяют выяснить события, произошедшие в далеком прошлом (процессы одомашнивания и миграции). У одомашненных овец было идентифицировано семь гаплогрупп, две из которых (F и G) исчезли, а пять других (A, B, C, D, E) присутствуют в современных породах.

Изменчивость мтДНК в той или иной степени коррелирует с расстоянием от центра одомашнивания. Наибольшее разнообразие генома обнаруживается ближе к месту происхождения, как это было установлено у человека (Li J.Z. et al., 2008). Настоящий обзор подтверждает существование одного центра одомашнивания на Ближнем Востоке, откуда овцы распространились в Европу через Средиземное море и долину Дуная, что подтверждается исследованиями лентивирусов мелких жвачных животных (Molaee et al., 2020). Возможно, существовал и другой путь распространения овец в Европу, который проходил через Кавказ, Россию и Северную Европу (Tarjo et al., 2006). Сначала линия В, вероятно, достигла Финляндии, затем, в раннем Средневековье, за ней последовала линия А (Niemi et al., 2013). Происхождение линий С и D в Центральной Европе остается неясным, но есть предположение, что они могли туда попасть с доисторическим человеком или гораздо позже, например, во время османской экспансии (Gáspárdy et al., 2021). Монгольское плато действовало как миграционный центр, из которого линии распространялись с центра одомашнивания в Азию (Ganbold et al., 2019). В Индии установлено высокое нуклеотидное разнообразие линий А и В, в Северном Китае – линии С (Lv et al., 2015).

В процессе миграции одомашненные овцы адаптировались к различным эколого-кормовым условиям среды обитания на всех континентах мира, при этом у современных домашних овец сформировался ряд морфологических, физиологических и поведенческих признаков, которые привели к нынешним фенотипическим различиям между дикими и домашними видами.

Результаты исследований древней ДНК позволили установить, что анатолийские неолитические овцы имеют значительную схожесть с современными европейскими породами, в то время как киргизские овцы неолита и бронзового века демонстрируют большее сходство с современными азиатскими породами.

В настоящее время домашние овцы делятся на две основные географические группы – Европу и Азию. Европейские овцы в основном несут гаплотип В, а азиатские – преимущественно гаплотип А. Разнообразие представленных гаплогрупп одомашненных и современных пород овец косвенно указывает на их миграцию на территории Евразии, включая Российскую Федерацию, в двух направлениях – в Европу (на запад) и Азию (на восток).

Список литературы / References

- Бакоев Н.Ф., Гетманцева Л.В., Бакоев С.Ю., Костюнина О.В. Анализ нуклеидной последовательности D-петли мтДНК у овец романовской породы. *Овцы, козы, шерстяное дело*. 2018;4:18-20 [Bakoev N.F., Getmantseva L.V., Bakoev S.Yu., Kostyunina O.V. Analysis of the nucleotide sequence of the mtDNA D-loop in Romanov sheep. *Ovcy, Kozy, Sherstyanoje Delo = Sheep, Goats, and Wool Industry*. 2018;4:18-20 (in Russian)]
- Бригида А.В., Приданова И.Е., Машталер Д.В. Предпосылки развития молочного овцеводства на территории Российской Федерации (Обзор). *Ветеринария и кормление*. 2025;7:13-16. doi 10.30917/TT-VK-1814-9588-2025-7-3 [Brigida A.V., Pridanova I.E., Mashtaler D.V. Prerequisites for the development of dairy sheep breeding in the Russian Federation (Review). *Veterinariya i Kormlenie*. 2026;7:13-16. doi 10.30917/TT-VK-1814-9588-2025-7-3 (in Russian)]
- Денискова Т.Е. Идентификация QTL, локализованных в регионах гомозиготности у пород овец, разводимых в России. *Аграрная наука*. 2025;10:102-109. doi 10.32634/0869-8155-2025-399-102-109 [Deniskova T.E. Identification of QTL localized in the runs of homozygosity in sheep breeds raised in Russia. *Agrarnaya Nauka = Agrarian Science*. 2025;10:102-109. doi 10.32634/0869-8155-2025-399-102-109 (in Russian)]
- Дымова М.А., Тишкин А.А., Мишукова О.В., Храпов Е.А., Грушин С.П., Филипенко М.Л. Гаплотипическое разнообразие домашней овцы (*Ovis aries*) (по материалам археологических памятников ранней бронзы юга Западной Сибири). *Зоологический журнал*. 2019;98(7):836-842. doi 10.1134/S0044513419070043 [Dymova M.A., Tishkin A.A., Mishukova O.V., Khrapov E.A., Grushin S.P., Filipenko M.L. Haplotype diversity of the ancient sheep (*Ovis aries*), based on material from Western Siberian Bronze Age archaeological sites. *Zoologicheskij Zhurnal*. 2019;98(7):836-842. doi 10.1134/S0044513419070043 (in Russian)]
- Кошкина О.А., Денискова Т.Е., Дотев А.В., Kunz E., Upadhyay M., Krebs S., Соловьева А.Д., Medugorac I., Зиновьева Н.А. Оценка материнской изменчивости российских локальных пород овец на основе анализа полиморфизма гена цитохрома В. *Сельскохозяйственная биология*. 2021;56(6):1134-1147. doi 10.15389/agrobiology.2021.6.1134rus [Koshkina O.A., Deniskova T.E., Dotsev A.V., Kunz E., Upadhyay M., Krebs S., Solovieva A.D., Medugorac I., Zinovieva N.A.

- A study of maternal variability of Russian local sheep breeds based on the analysis of cytochrome B gene polymorphism. *Sel'skhozvaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2021;56(6):1134-1147. doi 10.15389/agrobiology.2021.6.1134eng]
- Кошкина О.А., Денискова Т.Е., Зиновьева Н.А. Филогенетический анализ полных последовательностей митохондриального генома овец куйбышевской породы. *Овцы, козы, шерстяное дело*. 2022a;4:8-11. doi 10.26897/2074-0840-2022-4-8-11 [Koshkina O.A., Deniskova T.E., Zinovieva N.A. Phylogenetic analysis of complete mitochondrial genome sequences of Kuibyshev sheep. *Ovtsy, Kozy, Sherstyanoje Delo = Sheep, Goats, and Wool Industry*. 2022a;4:8-11. doi 10.26897/2074-0840-2022-4-8-11 (in Russian)]
- Кошкина О.А., Денискова Т.Е., Зиновьева Н.А. Разработка и апробация тест-системы для выделения полных митохондриальных геномов домашних овец. *Достижения науки и техники АПК*. 2022b;36(10):60-65. doi 10.53859/02352451_2022_36_10_60 [Koshkina O.A., Deniskova T.E., Zinovieva N.A. Development and implementation of test system for investigation of complete mitochondrial genomes of domestic sheep. *Dostizheniya Nauki i Tekhniki APK = Achievements of Science and Technology in Agro-industrial Complex*. 2022b;36(10):60-65. doi 10.53859/02352451_2022_36_10_60 (in Russian)]
- Матюков В.С., Жариков Я.А., Канева Л.А. Анализ аллелофонда полутонкорунных овец печорской популяции с помощью STR-маркеров. *Генетика*. 2023;59(7):843-849. doi 10.31857/S0016675823060103 [Matyukov V.S., Zharikov Ya.A., Kaneva L.A. Analysis of the allele fund of semi-fine wool sheep of the Pechora population using STR markers. *Russ J Genet*. 2023;59(7):732-738. doi 10.1134/s1022795423060108]
- Широкова Н.В., Бакоев Н.Ф., Колосова М.А., Гетманцева Л.В., Колосов Ю.А. Исследование нуклеотидной последовательности D-петли мтДНК у овец мериносовых пород РФ. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2018;11(77):21-25. doi 10.23670/IRJ.2018.77.11.039 [Shirokova N.V., Bakoev N.F., Kolosova M.A., Getmantseva L.V., Kolosov Yu.A. Study of the nucleotide sequence of the mtDNA D-loop in Merino sheep of the Russian Federation. *Mezhdunarodnyi Nauchno-Issledovatel'skij Zhurnal = International Research Journal*. 2018;11(77):21-25. doi 10.23670/IRJ.2018.77.11.039 (in Russian)]
- Ahbara A.M., Musa H.H., Robert C., Abebe A., Al-Jumaili A.S., Kebede A., Latairish S., Agoub M.O., Clark E., Hanotte O., Mwacharo J.M. Natural adaptation and human selection of northeast African sheep genomes. *Genomics*. 2022;114(5):110448. doi 10.1016/j.ygeno.2022.110448
- Alipanah M., Gharari F., Mazloom S.M. Comparison of selection signatures among five meat sheep breeds. *Small Ruminant Res*. 2025; 249:107524. doi 10.1016/j.smallrumres.2025.107524
- Alonso R.A., Ulloa-Arvizu R., Gayosso-Vázquez A. Mitochondrial DNA sequence analysis of the Mexican Creole sheep (*Ovis aries*) reveals a narrow Iberian maternal origin. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*. 2017;28(6):793-800. doi 10.1080/24701394.2016.1192613
- Álvarez I., Capote J., Traoré A., Fonseca N., Pérez K., Cuervo M., Fernández I., Goyache F. Mitochondrial analysis sheds light on the origin of hair sheep. *Anim Genet*. 2013;44(3):344-347. doi 10.1111/j.1365-2052.2012.02398.x
- Arbuckle B.S., Atici L. Initial diversity in sheep and goat management in Neolithic South-Western Asia. *Levant*. 2013;45(2):219-235. doi 10.1179/0075891413Z.00000000026
- Atağ G., Kaptan D., Yüncü E., Başak Vural K., Mereu P., Pirastru M., Barbato M., ... Togan İ., Günther T., Özer F., Hadjisterkotis E., Somel M. Population genomic history of the endangered Anatolian and Cyprian mouflons in relation to worldwide wild, feral, and domestic sheep lineages. *Genome Biol Evol*. 2024;16(5):evae090. doi 10.1093/gbe/evae090
- Atlija M., Arranz J.J., Martínez-Valladares M., Gutiérrez-Gil B. Detection and replication of QTL underlying resistance to gastrointestinal nematodes in adult sheep using the ovine 50K SNP array. *Genet Sel Evol*. 2016;48:4. doi 10.1186/s12711-016-0182-4
- Auxiette G., Hachem L. Farm, Hunt, Feast, Celebrate. Animals and Society in Neolithic Bronze and Iron Age Northern France. Leiden: Sidestone Press, 2021
- Barbato M., Hailer F., Orozco-terWengel P., Kijas J., Mereu P., Cabras P., Mazza R., Pirastru M., Bruford M.W. Genomic signatures of adaptive introgression from European mouflon into domestic sheep. *Sci Rep*. 2017;7(1):7623. doi 10.1038/s41598-017-07382-7
- Barbato M., Masseti M., Pirastru M., Columbano N., Scali M., Vignani R., Mereu P. Islands as time capsules for genetic diversity conservation: the case of the Giglio island mouflon. *Diversity*. 2022; 14(8):609. doi 10.3390/d14080609
- Becker C., Benecke N., Grabundžija A., Küchelmann H.-C., Pollock S., Schier W., Schoch C., Schrakamp I., Schütt B., Schumacher M. The textile revolution. Research into the origin and spread of wool production between the Near East and Central Europe. *eTopoi J Ancient Stud*. 2016;6:102-151
- Brigand R., Dubouloz J., Weller O. Colonization dynamics of LBK farmers in Europe under geostatistics test. *Documenta Praehistorica*. 2022;49:2-45. doi 10.4312/dp.49.12
- Cai D., Tang Z., Yu H., Han L., Ren X., Zhao X., Zhu H., Zhou H. Early history of Chinese domestic sheep indicated by ancient DNA analysis of Bronze Age individuals. *J Archaeol Sci*. 2011;38(4): 896-902. doi 10.1016/j.jas.2010.11.019
- Caiye Z., Song S., Li M., Huang X., Luo Y., Fang S. Genome-wide DNA methylation analysis reveals different methylation patterns in Chinese indigenous sheep with different type of tail. *Front Vet Sci*. 2023;10:1125262. doi 10.3389/fvets.2023.1125262
- Cao Y.H., Xu S.S., Shen M., Chen Z.H., Gao L., Lv F.H., Xie X.L., ... Kantanen J., Bruford M.W., Lenstra J.A., Kijas J., Li M.H. Historical introgression from wild relatives enhanced climatic adaptation and resistance to pneumonia in sheep. *Mol Biol Evol*. 2021;38(3): 838-855. doi 10.1093/molbev/msaa236
- Chataigner C., Badalyan R., Arimura M. The Neolithic of the Caucasus. Oxford Handbooks Online, 2014. doi 10.1093/oxfordhb/9780199935413.013.13
- Chen Z.H., Xu Y.X., Xie X.L., Wang D.F., Aguilar-Gómez D., Liu G.J., Li X., ... Periasamy K., Coltman D.W., Lenstra J.A., Nielsen R., Li M.H. Whole-genome sequence analysis unveils different origins of European and Asiatic mouflon and domestication-related genes in sheep. *Commun Biol*. 2021;4(1):1307. doi 10.1038/s42003-021-02817-4
- Cheng H., Zhang Z., Wen J., Lenstra J.A., Heller R., Cai Y., Guo Y., ... Zhang L., Billah M., Wang X., Liu M., Jiang Y. Long divergent haplotypes introgressed from wild sheep are associated with distinct morphological and adaptive characteristics in domestic sheep. *PLoS Genet*. 2023;19(2):e1010615. doi 10.1371/journal.pgen.1010615
- Chessa B., Pereira F., Arnaud F., Amorim A., Goyache F., Mainland I., Kao R.R., ... Ajmone-Marsan P., Bruford M.W., Kantanen J., Spencer T.E., Palmarini M. Revealing the history of sheep domestication using retrovirus integrations. *Science*. 2009;324(5926):532-536. doi 10.1126/science.1170587
- Ciani E., Lasagna E., D'Andrea M., Alloggio I., Marroni F., Ceccobelli S., Delgado Bermejo J.V., Sarti F.M., Kijas J., Lenstra J.A., Pilla F; International Sheep Genomics Consortium. Merino and Merino-derived sheep breeds: a genome-wide intercontinental study. *Genet Sel Evol*. 2015;47(1):64. doi 10.1186/s12711-015-0139-z
- Ciani E., Mastrangelo S., Da Silva A., Marroni F., Ferencaković M., Ajmone-Marsan P., Baird H., ... Simčić M., Stepanek O., Curik I., Cubric-Curik V., Lenstra J.A. On the origin of European sheep as revealed by the diversity of the Balkan breeds and by optimizing population-genetic analysis tools. *Genet Sel Evol*. 2020;52(1):25. doi 10.1186/s12711-020-00545-7

- Crockford S.J. Animal domestication and heterochronic speciation: the role of thyroid hormone. In: Minugh-Purvis N., McNamara K. (Eds) *Human Evolution through Developmental Change*. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2002;122-153
- Daly K.G., Mullin V.E., Hare A.J., Halpin Á., Mattiangeli V., Teasdale M.D., Rossi C., ... Zeder M., Atıcı L., Mashkour M., Peters J., Bradley D.G. Ancient genomics and the origin, dispersal, and development of domestic sheep. *Science*. 2025;387(6733):492-497. doi 10.1126/science.adn2094
- Darwin C.R. *The Variation of Animals and Plants under Domestication*. London: John Murray, 1875
- Demirci S., Koban Baştanlar E., Dağtaş N.D., Pişkin E., Engin A., Ozer F., Yüncü E., Doğan S.A., Togan I. Mitochondrial DNA diversity of modern, ancient and wild sheep (*Ovis gmelinii anatolica*) from Turkey: new insights on the evolutionary history of sheep. *PLoS One*. 2013;8(12):e81952. doi 10.1371/journal.pone.0081952
- Deng J., Xie X.L., Wang D.F., Zhao C., Lv F.H., Li X., Yang J., ... Lenstra J.A., Han J.L., Zhang H.P., Li L., Li M.H. Paternal origins and migratory episodes of domestic sheep. *Curr Biol*. 2020;30(20):4085-4095.e6. doi 10.1016/j.cub.2020.07.077
- Dossybayev K., Ualiyeva D., Kapassuly T., Amandykova M., Kozhahmet A., Bekmanov B., Amzeyev R., Naruya S. Genetic diversity and population structure of fat-tailed coarse-wooled sheep breeds *Ovis aries* from Kazakhstan. *Vet Sci*. 2025;12(10):988. doi 10.3390/vetsci12100988
- Dymova M.A., Zadorozhny A.V., Mishukova O.V., Khrapov E.A., Druzhkova A.S., Trifonov V.A., Kichigin I.G., Tishkin A.A., Grushin S.P., Filipenko M.L. Mitochondrial DNA analysis of ancient sheep from Altai. *Anim Genet*. 2017;48(5):615-618. doi 10.1111/age.12569
- Ferencakovic M., Curik I., Pérez-Pardal L., Royo L.J., Cubric-Curik V., Fernández I., Alvarez I., Kostelic A., Sprem N., Krapinec K., Goyache F. Mitochondrial DNA and Y-chromosome diversity in East Adriatic sheep. *Anim Genet*. 2013;44(2):184-192. doi 10.1111/j.1365-2052.2012.02393.x
- Fitak R.R., Mohandesan E., Corander J., Yadamsuren A., Chuluunbat B., Abdelhadi O., Raziq A., Nagy P., Walzer C., Faye B., Burger P.A. Genomic signatures of domestication in Old World camels. *Commun Biol*. 2020;3(1):316. doi 10.1038/s42003-020-1039-5
- Gabbianelli F., Gargani M., Pariset L., Mariotti M., Alhaique F., De Minicis E., Barelli L., Ciammetti E., Redi F., Valentini A. Mitochondrial DNA analysis of medieval sheep (*Ovis aries*) in central Italy reveals the predominance of haplogroup B already in the Middle Ages. *Anim Genet*. 2015;46(3):329-332. doi 10.1111/age.12289
- Ganbold O., Lee S.-H., Seo D., Paek W.K., Manjula P., Munkhbayer M., Lee J.H. Genetic diversity and the origin of Mongolian native sheep. *Livest Sci*. 2019;220:17-25. doi 10.1016/j.livsci.2018.12.007
- Garel M., Marchand P., Bourgoïn G., Santiago-Moreno J., Portanier E., Piegert H., Hadjisterkotis E., Cugnasse J.-M. Mouflon *Ovis gmelini* Blyth, 1841. In: Hackländer K., Zachos F.E. (Eds) *Handbook of the Mammals of Europe*. Springer, 2022;1-35. doi 10.1007/978-3-319-65038-8_34-1
- Gáspárdy A., Berger B., Zabavnik-Piano J., Kovács E., Annus K., Zenke P., Sáfár L., Maróti-Agóts Á. Comparison of mtDNA control region among descendant breeds of the extinct Zaupel sheep revealed haplogroup C and D in Central Europe. *Vet Med Sci*. 2021;7(6):2330-2338. doi 10.1002/vms3.585
- Gáspárdy A., Zenke P., Kovács E., Annus K., Posta J., Sáfár L., Maróti-Agóts Á. Evaluation of maternal genetic background of two Hungarian autochthonous sheep breeds coming from different geographical directions. *Animals (Basel)*. 2022;12(3):218. doi 10.3390/ani12030218
- Gornas N., Weimann C., El Hussien A., Erhardt G. Genetic characterization of local Sudanese sheep breeds using DNA markers. *Small Ruminant Res*. 2011;95:27-33. doi 10.1016/j.smallrumres.2010.08.009
- Guerrini M., Panayides P., Niktoresh Mofrad N., Kassinis N., Ioannou I., Forcina G., Hadjigerou P., Barbanera F. Spatial genetic structure and *Ovis* haplogroup as a tool for an adaptive conservation management of the endangered Cyprus mouflon. *Zoology*. 2021;148:125959. doi 10.1016/j.zool.2021.125959
- Guo J., Du L.X., Ma Y.H., Guan W.J., Li H.B., Zhao Q.J., Li X., Rao S.Q. A novel maternal lineage revealed in sheep (*Ovis aries*). *Anim Genet*. 2005;36(4):331-336. doi 10.1111/j.1365-2052.2005.01310.x
- Hachem L. Animals in LBK society: identity and gender markers. *J Archaeol Sci Rep*. 2018;20:910-921. doi 10.1016/j.jasrep.2017.09.020
- Han J., Yang M., Guo T., Niu C., Liu J., Yue Y., Yuan C., Yang B. Two linked *TBXT* (brachyury) gene polymorphisms are associated with the tailless phenotype in fat-rumped sheep. *Anim Genet*. 2019;50(6):772-777. doi 10.1111/age.12852
- Her C., Rezaei H.R., Hughes S., Naderi S., Duffraisse M., Mashkour M., Naghash H.R., ... Tresset A., Vigne J.D., Taberlet P., Hänni C., Pompanon F. Broad maternal geographic origin of domestic sheep in Anatolia and the Zagros. *Anim Genet*. 2022;53(3):452-459. doi 10.1111/age.13191
- Hiendleder S., Kaupé B., Wassmuth R., Janke A. Molecular analysis of wild and domestic sheep questions current nomenclature and provides evidence for domestication from two different subspecies. *Proc Biol Sci*. 2002;269(1494):893-904. doi 10.1098/rspb.2002.1975
- Horsburgh K.A., Rhines A. Genetic characterization of an archaeological sheep assemblage from South Africa's Western Cape. *J Archaeol Sci*. 2010;37(11):2906-2910. doi 10.1016/j.jas.2010.06.035
- Hu Z., Wu C., Shi Y., Guo H., Zhao X., Yin Z., Yang L., ... Zhou B., Lu D., Wu T., Lin D., Shen H. A genome-wide association study identifies two new lung cancer susceptibility loci at 13q12.12 and 22q12.2 in Han Chinese. *Nat Genet*. 2011;43(8):792-796. doi 10.1038/ng.875
- Ibrahim A., Baliarti E., Budisatria I.G.S., Artama W.T., Widayanti R., Maharani D., Tavares L., Margawati E.T. Genetic diversity and relationship among Indonesian local sheep breeds on Java Island based on mitochondrial cytochrome b gene sequences. *J Genet Eng Biotechnol*. 2023;21(1):34. doi 10.1186/s43141-023-00491-z
- Jackson N., Maddocks I.G., Watts J.E., Scobie D., Mason R.S., Gordon-Thomson C., Stockwell S., Moore G.P.M. Evolution of the sheep coat: the impact of domestication on its structure and development. *Genet Res (Camb)*. 2020;102:e4. doi 10.1017/S0016672320000063
- Jin M., Liu G., Liu E., Wang L., Jiang Y., Zheng Z., Lu J., ... Cao J., Yuan Z., Du L., Wang H., Wei C. Genomic insights into the population history of fat-tailed sheep and identification of two mutations that contribute to fat tail adipogenesis. *J Adv Res*. 2026;80:725-741. doi 10.1016/j.jare.2025.05.011
- Kalaydzhiev G., Palova N., Dundarova H., Lozanova L., Mehandjyski I., Radoslavov G., Hristov P. Mitochondrial diversity and phylogenetic relationship of eight native Bulgarian sheep breeds. *Animals (Basel)*. 2023;13(23):3655. doi 10.3390/ani13233655
- Kalds P., Huang S., Chen Y., Wang X. Ovine *HOXB13*: expanding the gene repertoire of sheep tail patterning and implications in genetic improvement. *Commun Biol*. 2022a;5(1):1196. doi 10.1038/s42003-022-04199-7
- Kalds P., Zhou S., Gao Y., Cai B., Huang S., Chen Y., Wang X. Genetics of the phenotypic evolution in sheep: a molecular look at diversity-driving genes. *Genet Sel Evol*. 2022b;54(1):61. doi 10.1186/s12711-022-00753-3
- Kamalakkannan R., Kumar S., Bhavana K., Prabhu V.R., Machado C.B., Singha H.S., Sureshgoopi D., Vijay V., Nagarajan M. Evidence for independent domestication of sheep mtDNA lineage A in India and introduction of lineage B through Arabian sea route. *Sci Rep*. 2021;11(1):19733. doi 10.1038/s41598-021-97761-y
- Kaptan D., Atağ G., Vural K.B., Morell Miranda P., Akbaba A., Yüncü E., Buluktaev A., ... Geigl E.M., Togan İ.Z., Günther T., Somel M., Özer F. The population history of domestic sheep revealed by paleogenomes. *Mol Biol Evol*. 2024;41(10):msae158. doi 10.1093/molbev/msae158
- Karlsson A.C., Fallahshahroudi A., Johnsen H., Hagenblad J., Wright D., Andersson L., Jensen P. A domestication related mutation in the thyroid stimulating hormone receptor gene (*TSHR*) modulates photope-

- riodic response and reproduction in chickens. *Gen Comp Endocrinol.* 2016;228:69-78. doi 10.1016/j.ygcen.2016.02.010
- Koshkina O., Deniskova T., Dotsev A., Kunz E., Selionova M., Medugorac I., Zinovieva N. Phylogenetic analysis of russian native sheep breeds based on mtDNA sequences. *Genes (Basel).* 2023;14(9):1701. doi 10.3390/genes14091701
- Kyselý R. The size of domestic cattle, sheep, goats and pigs in the Czech Lengyel and Eneolithic periods: temporal variations and their causes. *Archaeofauna.* 2016;25:33-78. doi 10.15366/archaeofauna.2016.25.003
- Landi V., Lasagna E., Ceccobelli S., Martinez A., Santos-Silva F., Vega-Pla J.L., Panella F., ... Dunner S., Da Gama L.T., Barba C., Delgado J.V., Sarti F.M. An historical and biogeographical assessment of European Merino sheep breeds by microsatellite markers. *Small Ruminant Res.* 2019;177:76-81. doi 10.1016/j.smallrumres.2019.06.018
- Larsson M.N.A., Morell Miranda P., Pan L., Başak Vural K., Kaptan D., Rodrigues Soares A.E., Kivikero H., Kantanen J., Somel M., Özer F., Johansson A.M., Storå J., Günther T. Ancient sheep genomes reveal four millennia of North European short-tailed sheep in the Baltic sea region. *Genome Biol Evol.* 2024;16(6):evae114. doi 10.1093/gbe/evae114
- Li J.Z., Absher D.M., Tang H., Southwick A.M., Casto A.M., Ramachandran S., Cann H.M., Barsh G.S., Feldman M., Cavalli-Sforza L.L., Myers R.M. Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation. *Science.* 2008;319(5866):1100-1104. doi 10.1126/science.1153717
- Li R., Yang P., Li M., Fang W., Yue X., Nanaei H.A., Gan S., Du D., Cai Y., Dai X., Yang Q., Cao C., Deng W., He S., Li W., Ma R., Liu M., Jiang Y. A Hu sheep genome with the first ovine Y chromosome reveal introgression history after sheep domestication. *Sci China Life Sci.* 2021;64(7):1116-1130. doi 10.1007/s11427-020-1807-0
- Li X., Yang J., Shen M., Xie X.L., Liu G.J., Xu Y.X., Lv F.H., ... Kijas J.W., Bruford M.W., Periasamy K., Wang X.H., Li M.H. Whole-genome resequencing of wild and domestic sheep identifies genes associated with morphological and agronomic traits. *Nat Commun.* 2020;11(1):2815. doi 10.1038/s41467-020-16485-1
- Liu J., Ding X., Zeng Y., Yue Y., Guo X., Guo T., Chu M., ... Sun X., Niu C., Yang B., Guo J., Yuan C. Genetic diversity and phylogenetic evolution of Tibetan sheep based on mtDNA D-loop sequences. *PLoS One.* 2016;11(7):e0159308. doi 10.1371/journal.pone.0159308
- Luo Y., Zhang M., Guo Z., Wijayanti D., Xu H., Jiang F., Lan X. Insertion/Deletion (InDel) variants within the sheep fat-deposition-related *PDGFD* gene strongly affect morphological traits. *Animals (Basel).* 2023;13(9):1485. doi 10.3390/ani13091485
- Luong N.N., Ha H.T.T., Huy N.X., Loi B.V., Van N.H., Quang H.T., Loc N.H. Characterizing the Phan Rang sheep: a first look at the Y chromosome, mitochondrial DNA, and morphometrics. *Animals (Basel).* 2024;14(14):2020. doi 10.3390/ani14142020
- Lv F.-H., Peng W.-F., Yang J., Zhao Y.-X., Li W.-R., Liu M.-J., Ma Y.-H., ... Iso-Touru T., Bruford M.W., Kantanen J., Han J.L., Li M.H. Mitogenomic meta-analysis identifies two phases of migration in the history of eastern Eurasian sheep. *Mol Biol Evol.* 2015;32(10):2515-2533. doi 10.1093/molbev/msv139
- Lv F.-H., Cao Y.H., Liu G.J., Luo L.Y., Lu R., Liu M.J., Li M.H., ... Kantanen J., Coltman D.W., Bruford M.W., Lenstra J.A., Li M.H. Whole-genome resequencing of worldwide wild and domestic sheep elucidates genetic diversity, introgression, and agronomically important loci. *Mol Biol Evol.* 2022;39(2):msab353. doi 10.1093/molbev/msab353
- Machová K., Málková A., Vostrý L. Sheep post-domestication expansion in the context of mitochondrial and Y chromosome haplogroups and haplotypes. *Genes (Basel).* 2022;13(4):613. doi 10.3390/genes13040613
- McManus C., Pimentel D., Junqueira V.S., Pimentel F., Peripolli V. The importance of sheep genetics and diversity: a bibliometric review. *Trop Anim Health Prod.* 2025;57(5):261. doi 10.1007/s11250-025-04503-7
- Meadows J.R., Li K., Kantanen J., Tapio M., Sipos W., Pardeshi V., Gupta V., Calvo J.H., Whan V., Norris B., Kijas J.W. Mitochondrial sequence reveals high levels of gene flow between breeds of domestic sheep from Asia and Europe. *J Hered.* 2005;96(5):494-501. doi 10.1093/jhered/esi100
- Meadows J.R., Cemal I., Karaca O., Gootwine E., Kijas J.W. Five ovine mitochondrial lineages identified from sheep breeds of the near East. *Genetics.* 2007;175(3):1371-1379. doi 10.1534/genetics.106.068353
- Mereu P., Pirastru M., Sanna D., Bassu G., Naitana S., Leoni G.G. Phenotype transition from wild mouflon to domestic sheep. *Genet Sel Evol.* 2024;56:1. doi 10.1186/s12711-023-00871-6
- Mereu P., Pirastru M., Morell Miranda P., Atağ G., Basak Vural K., Wilkens B., Rodrigues Soares A.E., ... Hadjisterkotis E., Somel M., Özer F., Günther T., Leoni G.G. Revised phylogeny of mouflon based on expanded sampling of mitogenomes. *PLoS One.* 2025;20(5):e0323354. doi 10.1371/journal.pone.0323354
- Michailidou S., Kyritsi M., Pavlou E., Tsourekis A., Argiriou A. Genetic diversity, population structure, and historical gene flow patterns of nine indigenous Greek sheep breeds. *Biology.* 2025;14(7):845. doi 10.3390/biology14070845
- Molae V., Bazzucchi M., De Mia G.M., Otard V., Abdollahi D., Rosati S., Lühken G. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses in Germany and Iran suggests their expansion with domestic sheep. *Sci Rep.* 2020;10(1):2243. doi 10.1038/s41598-020-58990-9
- Muigai A.W.T., Hanotte O. The origin of African sheep: archaeological and genetic perspectives. *Afr Archaeol Rev.* 2013;30:39-50. doi 10.1007/s10437-013-9129-0
- Naval-Sanchez M., Nguyen Q., McWilliam S., Porto-Neto L.R., Tellam R., Vuocolo T., Reverter A., ... Muzny D.M., Jhangiani S.N., Cockett N., Daetwyler H., Kijas J. Sheep genome functional annotation reveals proximal regulatory elements contributed to the evolution of modern breeds. *Nat Commun.* 2018;9(1):859. doi 10.1038/s41467-017-02809-1
- Niemi M., Bläuer A., Iso-Touru T., Nyström V., Harjula J., Taavitsainen J.P., Stora J., Lidén K., Kantanen J. Mitochondrial DNA and Y-chromosomal diversity in ancient populations of domestic sheep (*Ovis aries*) in Finland: comparison with contemporary sheep breeds. *Genet Sel Evol.* 2013;45(1):2. doi 10.1186/1297-9686-45-2
- Pedrosa S., Uzun M., Arranz J.-J., Gutiérrez-Gil B., San Primitivo F., Bayón Y. Evidence of three maternal lineages in Near Eastern sheep supporting multiple domestication events. *Proc Biol Sci.* 2005;272(1577):2211-2217. doi 10.1098/rspb.2005.3204
- Pereira F., Davis S.J., Pereira L., McEvoy B., Bradley D.G., Amorim A. Genetic signatures of a Mediterranean influence in Iberian Peninsula sheep husbandry. *Mol Biol Evol.* 2006;23(7):1420-1426. doi 10.1093/molbev/msl007
- Poplin F. Origine du Mouflon de Corse dans une nouvelle perspective paléontologique: par marronnage. *Ann Genet Sel Anim.* 1979;11(2):133-143. doi 10.1186/1297-9686-11-2-133 (in French)
- Portanier E., Chevret P., Gélín P., Benedetti P., Sanchis F., Barbanera F., Kaerle C., Queney G., Bourgoin G., Devillard S., Garel M. New insights into the past and recent evolutionary history of the Corsican mouflon (*Ovis gmelini musimon*) to inform its conservation. *Conserv Genet.* 2022;23:91-107. doi 10.1007/s10592-021-01399-2
- Racimo F., Woodbridge J., Fyfe R.M., Sikora M., Sjögren K.-G., Kristiansen K., Vander Linden M. The spatiotemporal spread of human migrations during the European Holocene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020;117(16):8989-9000. doi 10.1073/pnas.1920051117
- Rafia P., Tarang A. Sequence variations of mitochondrial DNA displacement-loop in Iranian indigenous sheep breeds. *Iran J Appl Anim Sci.* 2016;6:363-368
- Resende A., Gonçalves J., Muigai A.W., Pereira F. Mitochondrial DNA variation of domestic sheep (*Ovis aries*) in Kenya. *Anim Genet.* 2016;47(3):377-381. doi 10.1111/age.12412
- Rezaei H.R., Naderi S., Chintauan-Marquier I.C., Jordan S., Taberlet P., Virk A.T., Naghash H.R., Rioux D., Kaboli M., Luikart G., Pompanon F. Evolution and taxonomy of the wild species of the genus *Ovis*

- (Mammalia, Artiodactyla, Bovidae). *Mol Phylogenet Evol.* 2010; 54(2):315-326. doi 10.1016/j.ympev.2009.10.037
- Ryder M.L. Sheep. In: Manson I.L. (Ed.) *Evolution of Domesticated Animals*. London; New York: Longman Group Limited, 1984;63-84
- Sabatini S., Bergerbrant S., Brandt L.O., Margaryan A., Allentoft M.E. Approaching sheep herds origins and the emergence of the wool economy in continental Europe during the Bronze Age. *Archaeol Anthropol Sci.* 2019;11:4909-4925. doi 10.1007/s12520-019-00856-x
- Salim B., Alasmari S., Mohamed N.S., Ahmed M.A., Nakao R., Hanotte O. Genetic variation and demographic history of Sudan desert sheep reveal two diversified lineages. *BMC Genomics.* 2023;24(1): 118. doi 10.1186/s12864-023-09231-6
- Sandoval-Castellanos E., Hare A.J., Lin A.T., Dimopoulos E.A., Daly K.G., Geiger S., Mullin V.E., ... Burger J., Frantz L., Medugorac I., Bradley D.G., Peters J. Ancient mitogenomes from Pre-Pottery Neolithic Central Anatolia and the effects of a Late Neolithic bottleneck in sheep (*Ovis aries*). *Sci Adv.* 2024;10(15):eadj0954. doi 10.1126/sciadv.adj0954
- Sanna D., Barbato M., Hadjisterkotis E., Cossu P., Decandia L., Trova S., Pirastru M., Leoni G.G., Naitana S., Francalacci P., Masala B., Manca L., Mereu P. The first mitogenome of the Cyprus mouflon (*Ovis gmelini ophion*): new insights into the phylogeny of the genus *Ovis*. *PLoS One.* 2015;10(12):e0144257. doi 10.1371/journal.pone.0144257
- Simon R., Drögemüller C., Lühken G. The complex and diverse genetic architecture of the absence of horns (polledness) in domestic ruminants, including goats and sheep. *Genes (Basel).* 2022;13(5):832. doi 10.3390/genes13050832
- Singh S., Kumar S. Jr., Kolte A.P., Kumar S. Extensive variation and sub-structuring in lineage A mtDNA in Indian sheep: genetic evidence for domestication of sheep in India. *PLoS One.* 2013;8(11): e77858. doi 10.1371/journal.pone.0077858
- Spangler G.L., Rosen B.D., Ilori M.B., Hanotte O., Kim E.S., Sonstegard T.S., Burke J.M., Morgan J.L.M., Notter D.R., Van Tassel C.P. Whole genome structural analysis of Caribbean hair sheep reveals quantitative link to West African ancestry. *PLoS One.* 2017; 12(6):e0179021. doi 10.1371/journal.pone.0179021
- Tapio M., Marzanov N., Ozerov M., Cinkulov M., Gonzarenko G., Kiselyova T., Murawski M., Viinalass H., Kantanen J. Sheep mitochondrial DNA variation in European, Caucasian, and Central Asian areas. *Mol Biol Evol.* 2006;23(9):1776-1783. doi 10.1093/molbev/msl043
- Tarlykov P., Atavliyeva S., Aугanova D., Akhmetollayev I., Loshakova T., Varfolomeev V., Ramankulov Y. Mitochondrial DNA analysis of ancient sheep from Kazakhstan: evidence for early sheep introduction. *Heliyon.* 2021;7(9):e08011. doi 10.1016/j.heliyon.2021.e08011
- Taylor W.T., Pruvost M., Posth C., Rendu W., Krajcarz M.T., Abdykanova A., Brancaleoni G., ... Douka K., Krivoschapkin A., Jeong C., Warinner C., Shnaider S. Evidence for early dispersal of domestic sheep into Central Asia. *Nat Hum Behav.* 2021;5(9):1169-1179. doi 10.1038/s41562-021-01083-y
- Teletchea F., Fontaine P. Levels of domestication in fish: implications for the sustainable future of aquaculture. *Fish Fish.* 2014;15(2): 181-195. doi 10.1111/faf.12006
- Trigo B.B., Utsunomiya A.T.H., Fortunato A.A.A.D., Milanesi M., Torrecilha R.B.P., Lamb H., Nguyen L., ... Bickhart D., Smith T.P.L., Sonstegard T.S., Garcia J.F., Utsunomiya Y.T. Variants at the ASIP locus contribute to coat color darkening in Nellore cattle. *Genet Sel Evol.* 2021;53(1):40. doi 10.1186/s12711-021-00633-2
- Vigne J.-D., Carrère I., Briois F., Guilaine J. The early process of mammal domestication in the Near East. New evidence from the Pre-Neolithic and Pre-Pottery Neolithic in Cyprus. *Curr Anthropol.* 2011;52(S4):255-271. doi 10.1086/659306
- Wang D.-F., Orozco-terWengel P., Salehian-Dehkordi H., Esmailizadeh A., Lv F.-H. Genomic analyses of Asiatic mouflon in Iran provide insights into the domestication and evolution of sheep. *Genet Sel Evol.* 2025;57:31. doi 10.1186/s12711-025-00978-y
- Wanjala G., Bagi Z., Kusza S. Meta-analysis of mitochondrial DNA control region diversity to shed light on phylogenetic relationship and demographic history of African sheep (*Ovis aries*) breeds. *Biology (Basel).* 2021;10(8):762. doi 10.3390/biology10080762
- Wilkins A.S. A striking example of developmental bias in an evolutionary process: the “domestication syndrome”. *Evol Dev.* 2020; 22(1-2):143-153. doi 10.1111/ede.12319
- Wilkins A.S., Wrangham R.W., Fitch W.T. The “domestication syndrome” in mammals: a unified explanation based on neural crest cell behavior and genetics. *Genetics.* 2014;197(3):795-808. doi 10.1534/genetics.114.165423
- Wood N.J., Phua S.H. Variation in the control region sequence of the sheep mitochondrial genome. *Anim Genet.* 1996;27(1):25-33. doi 10.1111/j.1365-2052.1996.tb01173.x
- Yang J., Li W.R., Lv F.H., He S.G., Tian S.L., Peng W.F., Sun Y.W., ... Lu H.F., Kantanen J., Han J.L., Li M.H., Liu M.J. Whole-genome sequencing of native sheep provides insights into rapid adaptations to extreme environments. *Mol Biol Evol.* 2016;33(10):2576-2592. doi 10.1093/molbev/msw129
- Yang L., Zhang X., Hu Y., Zhu P., Li H., Peng Z., Xiang H., Zhou X., Zhao X. Ancient mitochondrial genome depicts sheep maternal dispersal and migration in Eastern Asia. *J Genet Genomics.* 2024; 51(1):87-95. doi 10.1016/j.jgg.2023.06.002
- Yurtman E., Özer O., Yüncü E., Dağtaş N.D., Koptekin D., Çakan Y.G., Özkan M., ... Özbal R., Götherström A., Somel M., Togan İ., Özer F. Archaeogenetic analysis of Neolithic sheep from Anatolia suggests a complex demographic history since domestication. *Commun Biol.* 2021;4(1):1279. doi 10.1038/s42003-021-02794-8
- Zeder M.A. Core questions in domestication research. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112(11):3191-3198. doi 10.1073/pnas.1501711112
- Zeder M.A. Out of the Fertile Crescent: the dispersal of domestic livestock through Europe and Africa. In: *Human Dispersal and Species Movement*. Cambridge University Press, 2017;261-303. doi 10.1017/9781316686942.012
- Zhang L., Liang L., Zhang X., Li W.R., Li H., He S. Understanding key genetic make-up of different coat colour in Bayinbuluke sheep through a comparative transcriptome profiling analysis. *Small Ruminant Res.* 2023;226:107028. doi 10.1016/j.smallrumres.2023.107028
- Zhao E., Yu Q., Zhang N., Kong D., Zhao Y. Mitochondrial DNA diversity and the origin of Chinese indigenous sheep. *Trop Anim Health Prod.* 2013;45(8):1715-1722. doi 10.1007/s11250-013-0420-5
- Zhao Y.X., Yang J., Lv F.-H., Hu X.J., Xie X.L., Zhang M., Li W.R., ... Hehua E., Kantanen J., Arjen Lenstra J., Han J.L., Li M.H. Genomic reconstruction of the history of native sheep reveals the peopling patterns of nomads and the expansion of early pastoralism in East Asia. *Mol Biol Evol.* 2017;34(9):2380-2395. doi 10.1093/molbev/msx181

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 09.02.2026. После доработки 12.03.2026. Принята к публикации 12.03.2026.

Прием статей через электронную редакцию на сайте <http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour>
Предварительно нужно зарегистрироваться как автору, затем в правом верхнем углу страницы выбрать «Отправить рукопись». После завершения загрузки материалов обязательно выбрать опцию «Отправить письмо», в этом случае редакция автоматически будет уведомлена о получении новой рукописи.

«Вавиловский журнал генетики и селекции (Vavilov Journal of Genetics and Breeding)»
до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС»/
“The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists”.

Сетевое издание «Вавиловский журнал генетики и селекции (Vavilov Journal of Genetics and Breeding)» – реестровая запись СМЭ Эл № ФС77-85772, зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 14 августа 2023 г.

Издание включено ВАК Минобрнауки России в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, Белый список (уровень 1), Russian Science Citation Index, Российский индекс научного цитирования, ВИНТИ, Web of Science CC, Scopus, PubMed Central, DOAJ, ROAD, Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar.

Открытый доступ к полным текстам:

русскоязычная версия – на сайте <https://vavilovj-icg.ru/>
и платформе Научной электронной библиотеки, elibrary.ru/title_about.asp?id=32440

англоязычная версия – на сайте vavilov.elpub.ru/index.php/jour
и платформе PubMed Central, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/3805/>

При перепечатке материалов ссылка обязательна.

✉ email: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Издатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»,
проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Адрес редакции: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Секретарь по организационным вопросам С.В. Зубова. Тел.: (383)3634977.

Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Тел.: (383)3634963*5218.

Начальник отдела: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: В.Д. Ахметова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич.

Компьютерная графика и верстка: Т.Б. Коняхина, О.Н. Савватеева.

.....
Дата выхода в свет 30.06.2026. Формат 60 × 84 1/8. Уч.-изд. л. 23.6.
.....

