

ВАВИЛОВСКИЙ

ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

2025 • 29 • 2



Клеточная биология / Генетика растений / Генетика насекомых / Симбиотические системы /
Популяционная генетика животных / Медицинская генетика / Биоинформатика

Глубокоуважаемые коллеги!
Мы рады сообщить, что с 5 по 10 октября 2025 года состоится
Третий международный конгресс “CRISPR-2025”!

На этот раз организаторы конгресса встретят участников в гостеприимном солнечном Ереване (Армения).

Это событие станет площадкой для экспертного обсуждения последних достижений, вызовов и этических аспектов, связанных с использованием широчайшего спектра технологических подходов, направленных на редактирование геномов.

Организаторы:

- Институт цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия),
- Институт химической биологии и фундаментальной медицины (Новосибирск, Россия),
- Российско-армянский университет (Ереван, Армения),
- Институт молекулярной биологии НАН РА (Ереван, Армения)
- Сургутский государственный университет (Сургут, Россия).

Партнеры: BIOCAD, Фонд научно-технологического развития Югры.

Предыдущие конгрессы, проведённые в 2018-м и 2023-м годах в Новосибирске, продемонстрировали востребованность и актуальность формата мероприятия.

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

Именно поэтому по сложившейся традиции мы предлагаем широкий спектр направлений, которые будут обсуждаться на конгрессе “CRISPR-2025”:

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

Традиционно участники конгресса представляют передовые разработки и фундаментальные исследования в области CRISPR, их применение в медицине, сельском хозяйстве, эволюционной и палеобиологии.

Предстоящий конгресс станет пространством для взаимодействия учёных, врачей и представителей индустрии, обмена идеями и эффективного сотрудничества.

В программе

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

Для всех желающих познакомиться с армянскими традициями оргкомитет готовит интересную культурную программу.

Приглашаем постоянных и новых участников: учёных, врачей, студентов и представителей бизнеса.

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



Сетевое издание

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

doi 10.18699/vjgb-25-20

Учредители

Сибирское отделение Российской академии наук

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

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

Н.А. Колчанов – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Россия)

И.Н. Леонова – д-р биол. наук (Россия)

Н.Б. Рубцов – д-р биол. наук, профессор (Россия)

В.К. Шумный – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Россия)

Ответственный секретарь

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

Редакционная коллегия

Е.Е. Андронов – канд. биол. наук (Россия)

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

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

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

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

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

А. Бёрнер – д-р наук (Германия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция)

И.Н. Лебедев – д-р биол. наук, проф. (Россия)

Л.А. Лутова – д-р биол. наук, проф. (Россия)

Б. Люгтенберг – д-р наук, проф. (Нидерланды)

В.Ю. Макеев – чл.-кор. РАН, д-р физ.-мат. наук (Россия)

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

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

С.Р. Мурсалимов – канд. биол. наук (Россия)

Л.Ю. Новикова – д-р с.-х. наук (Россия)

Е.К. Потокина – д-р биол. наук (Россия)

В.П. Пузырев – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)

Д.В. Пышный – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)

И.Б. Рогозин – канд. биол. наук (США)

А.О. Рувинский – д-р биол. наук, проф. (Австралия)

Е.Ю. Рыкова – д-р биол. наук (Россия)

Е.А. Салина – д-р биол. наук, проф. (Россия)

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

И.А. Тихонович – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Е.К. Хлесткина – д-р биол. наук, проф. РАН (Россия)

Э.К. Хуснутдинова – д-р биол. наук, проф. (Россия)

М. Чен – д-р биол. наук (Китайская Народная Республика)

Ю.Н. Шавруков – д-р биол. наук (Австралия)

Р.И. Шейко – чл.-кор. НАНБ, д-р с.-х. наук (Беларусь)

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

Н.К. Янковский – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Online edition

VAVILOVSKII ZHURNAL GENETIKI I SELEKTSII

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

*Founded in 1997**8 issues a year*

doi 10.18699/vjgb-25-20

Founders

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

The Vavilov Society of Geneticists and Breeders

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

Клеточная биология

- 175 **ОБЗОР**
Трехмерные модели культур клеток: способы получения и характеристика основных моделей. М.М. Абдурахманова, А.А. Леонтьева, Н.С. Васильева, Е.В. Кулигина, А.А. Нуштаева
- 189 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Изогенная линия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток ICGi036-A-1 от пациента с семейной гиперхолестеринемией, созданная путем коррекции патогенного варианта гена *LDLR* с.530C>T. А.С. Зуева, А.И. Шевченко, С.П. Медведев, Е.А. Елисафенко, А.А. Слепцов, М.С. Назаренко, Н.А. Тюян, С.М. Закиян, И.С. Захарова

Генетика растений

- 200 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Содержание витамина С и профиль экспрессии генов метаболизма аскорбата в зеленых листьях и отбеленной части ложного стебля гибридов F₁ лука-порея (*Allium porrum* L.). М.А. Филюшин, Т.М. Середин, А.В. Щенникова, Е.З. Кочева
- 210 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Морфологическая изменчивость и генетическая структура *Miscanthus sinensis* (Poaceae), культивируемого в лесостепи Западной Сибири. О.В. Дорогина, И.Н. Кубан, Г.А. Зуева, Е.В. Жмудь, О.Ю. Васильева

Генетика насекомых

- 219 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Характеристика трех митохондриальных геномов комаров рода *Aedes* (Diptera: Culicidae) подрода *Stegomyia*. А.Г. Бега, И.И. Горячева, А.В. Москаев, Б.В. Андрианов
- 230 **ОБЗОР**
Цитогенетика насекомых в эпоху хромосомных сборок полных геномов. В.А. Лухтанов, Е.А. Паженкова

Симбиотические системы

- 238 **ОБЗОР**
Аквапорины и их роль в растительно-микробных системах. Т.Р. Кудряшова, А.А. Крюков, А.И. Горенкова, А.П. Юрков
- 248 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Транскриптомный анализ признака симбиотической отзывчивости у гороха посевного (*Pisum sativum* L.). Д.О. Кузьмина, Е.А. Зорин, А.С. Сулима, Д.А. Романюк, М.Л. Гордон, А.И. Жернаков, О.А. Кулаева, Г.А. Ахтемова, О.Ю. Штарк, И.А. Тихонович, В.А. Жуков (на англ. языке)

Популяционная генетика животных

- 259 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Исправление таксономической ошибки в базе данных GenBank поднимает новый вопрос относительно межродовых отношений у саланксовых рыб (Osmeriformes: Salangidae). Е.С. Балакирев (на англ. языке)
- 268 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Таксономическое разнообразие микробных сообществ холодного сероводородного источника Безымянный (Прибайкальский район, Республика Бурятия). Т.Г. Банзаракцаева, Е.В. Лаврентьева, В.Б. Дамбаев, И.Д. Ульзетуева, В.В. Хахинов

Медицинская генетика

- 279 **ОБЗОР**
Терапия муковисцидоза: от симптомов к причине заболевания. Т.Н. Киреева, Д.И. Жигалина, Н.А. Скрыбин
- 290 **ОБЗОР**
Роль ретроэлементов в развитии болезни Паркинсона. Р.Н. Мустафин
- 301 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Генетические варианты генов *DLK1*, *KISS1R*, *MKRN3* у девочек с преждевременным половым созреванием. Е.А. Саженова, О.Ю. Васильева, Е.А. Фонова, М.Б. Канканам Патиранаге, А.Ю. Самбялова, Е.Е. Храмова, Л.В. Рычкова, С.А. Васильев, И.Н. Лебедев

Биоинформатика

- 310 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Идентификация грибных болезней земляники садовой на основе анализа гиперспектральных изображений методами машинного обучения. А.Ф. Чешкова
- 320 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
CropGene: программный комплекс анализа геномных и транскриптомных данных сельскохозяйственных растений. А.Ю. Пронозин, Д.И. Каретников, Н.А. Шмаков, М.Е. Бочарникова, С.Д. Афонникова, Д.А. Афонников, Н.А. Колчанов

Cell biology

- 175 **REVIEW**
3D cell culture models: how to obtain and characterize the main models.
M.M. Abdurakhmanova, A.A. Leonteva, N.S. Vasilieva, E.V. Kuligina, A.A. Nushtaeva
- 189 **ORIGINAL ARTICLE**
Isogenic induced pluripotent stem cell line ICGi036-A-1 from a patient with familial hypercholesterolaemia, derived by correcting a pathogenic variant of the gene *LDLR* c.530C>T. *A.S. Zueva, A.I. Shevchenko, S.P. Medvedev, E.A. Elisaphenko, A.A. Sleptcov, M.S. Nazarenko, N.A. Tmoyan, S.M. Zakian, I.S. Zakharova*

Plant genetics

- 200 **ORIGINAL ARTICLE**
Vitamin C content and profile of ascorbate metabolism gene expression in green leaves and bleached parts of the pseudostem of leek (*Allium porrum* L.) F₁ hybrids.
M.A. Filyushin, T.M. Seredin, A.V. Shchennikova, E.Z. Kochieva
- 210 **ORIGINAL ARTICLE**
Morphological variability and genetic structure of *Miscanthus sinensis* (Poaceae) cultivated in the forest-steppe of Western Siberia. *O.V. Dorogina, I.N. Kuban, G.A. Zueva, E.V. Zhmud, O.Yu. Vasilyeva*

Insect genetics

- 219 **ORIGINAL ARTICLE**
Mitochondrial genome variation of mosquito species in the subgenus *Stegomyia* of the genus *Aedes* (Diptera: Culicidae).
A.G. Bega, I.I. Goryacheva, A.V. Moskaev, B.V. Andrianov
- 230 **REVIEW**
Cytogenetics of insects in the era of chromosome-level genome assemblies.
V.A. Lukhtanov, E.A. Pazhenkova

Symbiotic systems

- 238 **REVIEW**
Aquaporins and their role in plant-microbial systems. *T.R. Kudriashova, A.A. Kryukov, A.I. Gorenkova, A.P. Yurkov*
- 248 **ORIGINAL ARTICLE**
Transcriptomic analysis of the symbiotic responsivity trait in pea (*Pisum sativum* L.).
D.O. Kuzmina, E.A. Zorin, A.S. Sulima, D.A. Romanyuk, M.L. Gordon, A.I. Zhernakov, O.A. Kulaeva, G.A. Akhtemova, O.Y. Shtark, I.A. Tikhonovich, V.A. Zhukov

Population genetics of animals

- 259 **ORIGINAL ARTICLE**
Correction of GenBank's taxonomic entry error raises a new issue regarding intergeneric relationships among salangid fishes (Osmeriformes: Salangidae).
E.S. Balakirev
- 268 **ORIGINAL ARTICLE**
Taxonomic diversity of microbial communities in the cold sulfur spring Bezymyanny (Pribaikalsky district, Republic of Buryatia). *T.G. Banzaraksava, E.V. Lavrentyeva, V.B. Dambaev, I.D. Ulzetueva, V.V. Khakhinov*

Medical genetics

- 279 **REVIEW**
Cystic fibrosis therapy: from symptoms to the cause of the disease.
T.N. Kireeva, D.I. Zhigalina, N.A. Skryabin
- 290 **REVIEW**
The role of retroelements in Parkinson's disease development. *R.N. Mustafin*
- 301 **ORIGINAL ARTICLE**
Genetic variants of the *DLK1*, *KISS1R*, *MKRN3* genes in girls with precocious puberty. *E.A. Sazhenova, O.Yu. Vasilyeva, E.A. Fonova, M.B. Kankanam Pathiranage, A.Yu. Sambyalova, E.E. Khramova, L.V. Rychkova, S.A. Vasilyeva, I.N. Lebedev*

Bioinformatics

- 310 **ORIGINAL ARTICLE**
Identification of fungal diseases in strawberry by analysis of hyperspectral images using machine learning methods.
A.F. Cheshkova
- 320 **ORIGINAL ARTICLE**
CropGene: a software package for the analysis of genomic and transcriptomic data of agricultural plants.
A.Yu. Pronozin, D.I. Karetnikov, N.A. Shmakov, M.E. Bocharnikova, S.D. Afonnikova, D.A. Afonnikov, N.A. Kolchanov

doi 10.18699/vjgb-25-21

Трехмерные модели культур клеток: способы получения и характеристика основных моделей

М.М. Абдурахманова ¹, А.А. Леонтьева ^{2, 1}, Н.С. Васильева ^{2, 1}, Е.В. Кулигина ¹, А.А. Нуштаева ^{2, 1} ¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия² Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия nushtaeva.anna@gmail.com

Аннотация. В течение многих лет золотым стандартом в исследованиях злокачественных новообразований являлись культуры опухолевых клеток *in vitro*, ксенотрансплантаты *in vivo* или генетически модифицированные модели животных. К настоящему времени арсенал инструментов современных медико-биологических исследований пополнился трехмерными клеточными моделями (3D-культуры). 3D-культуры воспроизводят тканеспецифичные характеристики топологии ткани, что делает их релевантными тканевыми моделями с точки зрения клеточной дифференцировки, метаболизма и развития лекарственной устойчивости. Благодаря своему потенциалу такие модели уже применяются многими исследовательскими группами как для фундаментальных, так и для трансляционных исследований, и их использование позволяет значительно сократить количество экспериментов на животных, например, в области онкологии. В литературе 3D-культуры классифицируют по технике формирования (с каркасом/без каркаса), условиям культивирования (статические/динамические), а также по клеточной организации и функциям. По клеточной организации 3D-культуры разделяют на «сфероидные модели», «органойды», «органы-на-чипе» и «микроткани». При этом каждая из моделей имеет свои характерные особенности, которые необходимо учитывать при использовании модели в эксперименте. Наиболее простые 3D-культуры – это «сфероидные модели», представляющие собой плавающие сферические агрегаты клеток. Более сложной 3D-моделью является «органойд» – самоорганизующаяся трехмерная структура, сформированная из стволовых клеток, способных к самообновлению и дифференцировке в составе модели. Микрофлюидные системы «орган-на-чипе» – это чипы, имитирующие *in vitro* основные физические и биологические процессы в органах и тканях в динамике. «Сфероиды» и «органойды» за счет объединения различных типов клеток в единую структуру могут быть основой для формирования «микроткани» – гибридной 3D-модели, воспроизводящей специфический тканевый фенотип и содержащей тканеспецифичные компоненты внеклеточного матрикса. В данном обзоре представлена краткая история развития метода культивирования клеток *in vitro* в 3D-формате, описаны основные характеристики и перспективы применения «сфероидных моделей», «органойдов», «органов-на-чипе» и «микротканей» для исследований в области иммуноонкологии солидных опухолей.

Ключевые слова: агрегация клеток; 3D-культуры клеток; сфероиды; органойды; орган-на-чипе; микроткань; культивирование клеточных 3D-моделей

Для цитирования: Абдурахманова М.М., Леонтьева А.А., Васильева Н.С., Кулигина Е.В., Нуштаева А.А. Трехмерные модели культур клеток: способы получения и характеристика основных моделей. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(2):175-188. doi 10.18699/vjgb-25-21

Финансирование. Написание разделов Введение, Особенности 3D-культур опухолевых клеток: «сфероидная модель», «органойд», «орган-на-чипе» и «микроткань» и Заключение (авторы: А.А. Леонтьева, Н.С. Васильева, А.А. Нуштаева) выполнено за счет средств проекта, реализуемого в рамках государственной программы федеральной территории «Сириус» «Научно-технологическое развитие федеральной территории «Сириус» (Соглашение № 27-03 от 27.09.2024); написание разделов Сохранение тканеспецифичной характеристики клеток *in vitro* и Культивирование клеток в 3D-моделях (авторы М.М. Абдурахманова и Е.В. Кулигина), а также Лицензированный доступ в BioRender для подготовки рисунков выполнены за счет гранта Российского научного фонда № 24-14-00390, <http://rscf.ru/project/24-14-00390/>.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Владимиру Александровичу Рихтеру (заведующему лабораторией биотехнологии ИХБФМ СО РАН). Все рисунки были созданы на сайте BioRender.com.

3D cell culture models: how to obtain and characterize the main models

М.М. Abdurakhmanova ¹, А.А. Leonteva ^{2, 1}, N.S. Vasilieva ^{2, 1}, E.V. Kuligina ¹, А.А. Nushtaeva ^{2, 1} ¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia² Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Krasnodar Region, Russia nushtaeva.anna@gmail.com

Abstract. For many years, the gold standard in the study of malignant tumors has been the *in vitro* culture of tumor cells, *in vivo* xenografts or genetically modified animal models. Meanwhile, three-dimensional cell models (3D cultures) have been added to the arsenal of modern biomedical research. 3D cultures reproduce tissue-specific features of tissue topology. This makes them relevant tissue models in terms of cell differentiation, metabolism and the development of drug resistance. Such models are already being used by many research groups for both basic and translational research, and may substantially reduce the number of animal studies, for example in the field of oncological research. In the current literature, 3D cultures are classified according to the technique of their formation (with or without a scaffold), cultivation conditions (static or dynamic), as well as their cellular organization and function. In terms of cellular organization, 3D cultures are divided into "spheroid models", "organoids", "organ-on-a-chip" and "microtissues". Each of these models has its own unique features, which should be taken into account when using a particular model in an experiment. The simplest 3D cultures are spheroid models which are floating spherical cell aggregates. An organoid is a more complex 3D model, in which a self-organizing 3D structure is formed from stem cells (SCs) capable of self-renewal and differentiation within the model. Organ-on-a-chip models are chips of microfluidic systems that simulate dynamic physical and biological processes found in organs and tissues *in vitro*. By combining different cell types into a single structure, spheroids and organoids can act as a basis for the formation of a microtissue – a hybrid 3D model imitating a specific tissue phenotype and containing tissue-specific extracellular matrix (ECM) components. This review presents a brief history of 3D cell culture. It describes the main characteristics and perspectives of the use of "spheroid models", "organoids", "organ-on-a-chip" models and "microtissues" in immune oncology research of solid tumors.

Key words: cell aggregation; 3D cell cultures; spheroids; organoids; organ-on-a-chip; microtissue; 3D cell model culturing

For citation: Abdurakhmanova M.M., Leonteva A.A., Vasilieva N.S., Kuligina E.V., Nushtaeva A.A. 3D cell culture models: how to obtain and characterize the main models. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(2):175-188. doi 10.18699/vjgb-25-21

Введение

В середине XX в. были сформированы основные принципы культивирования клеток растений и животных *in vitro* и созданы диплоидные клеточные линии человека (Jedrzejczak-Silicka, 2017). В конце XX–начале XXI в. были разработаны методы 3D-культивирования клеток, позволяющие конструировать клеточные модели, которые более точно воспроизводят среду, в которой клетки находятся в тканях организма (Edmondson et al., 2014). В последние десятилетия методы 3D-культивирования опухолевых клеток активно развиваются. В сравнении с 2D-культурами современные клеточные 3D-модели максимально приближены к животным моделям и первичной опухоли *in vivo* по следующим характеристикам: апикально-базальная полярность клеток в составе 3D-модели; уровень экспрессии генов клеток, отвечающих за физиологическое функционирование клеток; гетерогенность клеточного состава; способность секретировать белки внеклеточного матрикса (ВКМ) и факторы роста; лекарственная устойчивость модели и др.

Исследователи классифицируют 3D-культуры клеток в соответствии с их пространственной структурой (Maliszewska-Olejniczak et al., 2019) и выделяют «сфероидные модели», «органойды», «органы-на-чипе» и «микроткани». В публикуемых работах термины «сфероид», «органойд» и «микроткань» могут ошибочно использоваться как синонимы (Simian, Bissell, 2017). Однако следует учитывать, что все перечисленные модели имеют разные или лишь частично совпадающие источники клеток, протоколы конструирования и области применения и не являются взаимозаменяемыми. Причины, по которым термины «сфероидная модель», «органойд» и «микроткань» необходимо разделять, описаны в данном обзоре. Также здесь представлена краткая история развития методов 3D-культивирования клеток *in vitro* с акцентом

на ключевые особенности клеточных 3D-моделей, обуславливающие применение наиболее физиологически релевантной модели для исследований иммунологии солидных опухолей.

Сохранение тканеспецифичной характеристики клеток *in vitro*

Первые попытки создать клеточную 3D-модель были предприняты в 1956 г.: Арон Артур Москона получил агрегаты клеток – 3D-структуры (Moscona, 1956). Москона показал, что гистологически различные типы диссоциированных клеток при совместном культивировании способны агрегировать между собой и формировать трехмерную структуру.

Радиобиолог Роберт Сазерленд с коллегами ввели термин «сфероид» для структур, описанных Арном Москона. Они сконструировали многоклеточные сфероиды из клеток легкого китайского хомячка (линия V79). По строению сферические клеточные агрегаты напоминали узелки, наблюдаемые в карциномах животных и человека. Кривая роста агрегатов клеток *in vitro* была аналогична кривой роста трансплантатов у мышей. Морфологический анализ структур показал, что сфероиды имеют внешнюю зону, содержащую множество делящихся клеток, промежуточную зону, которая плохо насыщается кислородом и питательными веществами и содержит малое количество клеток в состоянии митоза, и зону некротизированных клеток. На основании этих результатов авторы сделали вывод, что многоклеточные сфероиды, полученные в ходе эксперимента, могут быть использованы в качестве модели *in vitro*, позволяющей оценить рост опухоли (Sutherland, 1988).

Термин «органойд» начали использовать в литературе в 1950-х годах, однако в то время структуры, обозначаемые этим термином, не имели ничего общего с 3D-культурами

клеток. Например, Уильям Дьюри и Жозефина Доэрти в своем исследовании 1954 г. «Ядерные и цитоплазматические органоиды в живой клетке» под органоидом подразумевали внутриклеточные структуры, а именно органеллы клетки (Duryee, Doherty, 1954). Также термин «органоид» употребляли для обозначения опухолей или аномальных клеточных разрастаний как синоним тератомы (Wolter, 1967). Развитие методов культивирования органоидов как клеточных 3D-структур берет начало с 1975 г. Джеймс Г. Рейнвальд и Говард Грин описали первую 3D-модель, включающую нормальные кератиноциты человека и фибробласты мышцы линии 3T3. В стратифицированном эпидермисе деление клеток ограничивалось базальным слоем растущих клонов, тогда как поверхностные слои состояли из терминально дифференцирующихся кератиноцитов, которые постепенно формировали ороговевающий слой. Дальнейшее культивирование данных структур позволило получить «листы эпидермиса», выращенные из небольшого количества первичных кератиноцитов (Rheinwald, Green, 1975). Хотя термин «органоид» не применялся в этом исследовании, Рейнвальд и Грин были первыми, кто восстановил 3D-структуру ткани *in vitro*, и уже с 1980 г. в исследованиях, посвященных 3D-культурам, возникает термин «органоид».

Кроме того, в 1980-х годах группа под руководством Мины Джахан Бисселл в своих работах показала важную роль ВКМ в развитии опухоли. Клетки первичной культуры молочной железы мыши культивировали на подложке из белков базальной мембраны (БМ), полученной из саркомы мышей Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). При таком культивировании клетки молочной железы формируют протоки и просветы, напоминающие секреторные альвеолы, и при этом в 90 % клеток детектируется экспрессия β -казеина (Li et al., 1987). Это исследование стимулировало развитие методов создания 3D-моделей с учетом ВКМ. Впервые сочетание слов «3D-модели культур клеток» применили Мэри Хелен Барселлос-Хофф с соавторами (Barcellos-Hoff et al., 1989) и Оле Петерсен с коллегами (Petersen et al., 1992) при анализе клеток молочной железы на подложке из БМ EHS. С использованием этой модели молочной железы человека группа под руководством Барселлос-Хофф исследовала альвеолярный морфогенез, а группа под руководством Петерсен смогла описать характер роста и дифференцировку нормальных и злокачественных эпителиальных клеток.

До 2005 г. термин «органоид» служил для обозначения небольших фрагментов органов, состоящих в основном из эпителиальных клеток, отделенных механически и/или ферментативно от стромальной ткани и выращенных в различных гелях (Fata et al., 2007). Однако в последнее десятилетие этим термином часто обозначают самые различные 3D-структуры (Nikonogova et al., 2023). В 2012 г. на консорциуме по стволовым клеткам желудочно-кишечного тракта для клеточных моделей толстого и тонкого кишечника была утверждена следующая номенклатура: «органоид» – 3D-культура, состоящая из нескольких типов клеток, например клеток эпителиального и мезенхимального происхождения; «сфероид» – сферическая 3D-культура, включающая клетки только одного типа (Guryanov, 2016).

Для внесения ясности в номенклатуру клеточных моделей для других тканей в октябре 2016 г. Европейской организацией молекулярной биологии была проведена встреча «Органоиды», где принято решение обозначать термином «органоид» разные структуры, в зависимости от системы органов (Simian, Bissell, 2017). Например, в области биологии молочных желез «органоид» – это первичный эксплантат эпителиальных протоков, помещенных в гели ВКМ. И наоборот, в исследованиях по биологии кишечника к органоидам могут относиться клональные производные первичных эпителиальных СК, выращенных без мезенхимы, либо эпителиально-мезенхимальные культуры, происходящие из эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) (Shamir, Ewald, 2014).

Таким образом, разработанные и описанные в XIX–XX веках методы культивирования фрагментов тканей заложили основу для развития технологии культивирования клеток вне организма. Сформулированные принципы культивирования клеток позволили сделать важные открытия в области регенеративной медицины, трансплантологии, биотехнологии и биофармацевтики (Simian, Bissell, 2017) (рис. 1).

Особенности 3D-культур опухолевых клеток: «сфероидная модель», «органоид», «орган-на-чипе» и «микроткань»

С развитием подходов 3D-культивирования появляются такие термины, как «агрегаты», «сфероиды», «сфера», «опухолесфера», «онкосфера», «органоид» или «органотипический сфероид». Нередко их ошибочно используют в качестве синонимов. Однако данные модели различаются по составу питательной среды, поверхности культивирования, плотности клеток, времени, необходимому для формирования, а также по типам клеток в составе модели (Rodrigues et al., 2024). При этом неточности в терминах могут вводить в заблуждение относительно объекта, на котором проводились исследования (Nikonogova et al., 2023). Например, Сейед Али Каримифард с коллегами применяют термины «органоид» и «маммосфера» в отношении клеточной 3D-структуры из опухолевых клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 (Karimifard et al., 2024). Согласно номенклатуре клеточных 3D-структур, «органоид» и «маммосферу» относят к разным 3D-моделям (Ponti et al., 2005; Gilazieva et al., 2020). Авторы данного исследования ссылаются на публикацию (Moradi-Mehr et al., 2023), в которой сконструированные «маммосферы» описываются как органоидная модель. Однако авторы последней работы не описывают полученную ими модель как «органоид», а употребляют термины «3D-культура клеток MCF-7» или «маммосфера».

Мы предполагаем, что путаница в терминологии связана с новизной и скоростью развития области 3D-культивирования клеток, а также со стремлением следовать научным тенденциям. Важность использования соответствующей терминологической номенклатуры обсуждалась также в научном обзоре (Nikonogova et al., 2023). Несмотря на многочисленные попытки введения номенклатуры, исследователи довольно непоследовательно оперируют терминологией, и поэтому необходимо вводить номен-

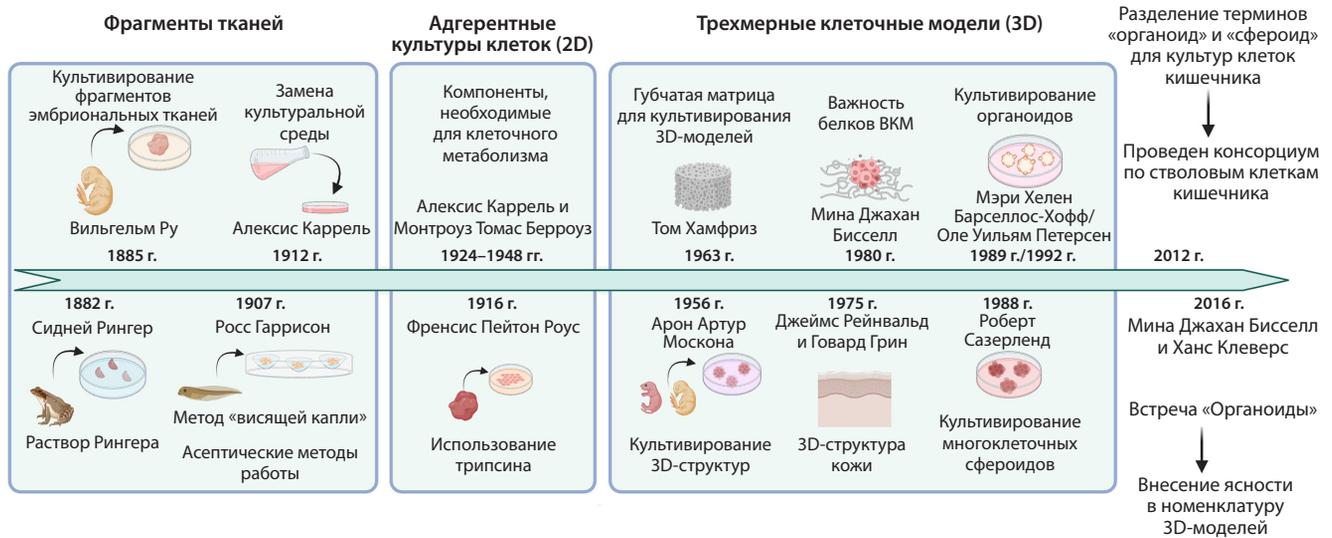


Рис. 1. Хронология ключевых событий в области культивирования клеток: от фрагментов тканей к 2D- и 3D-клеточным моделям.

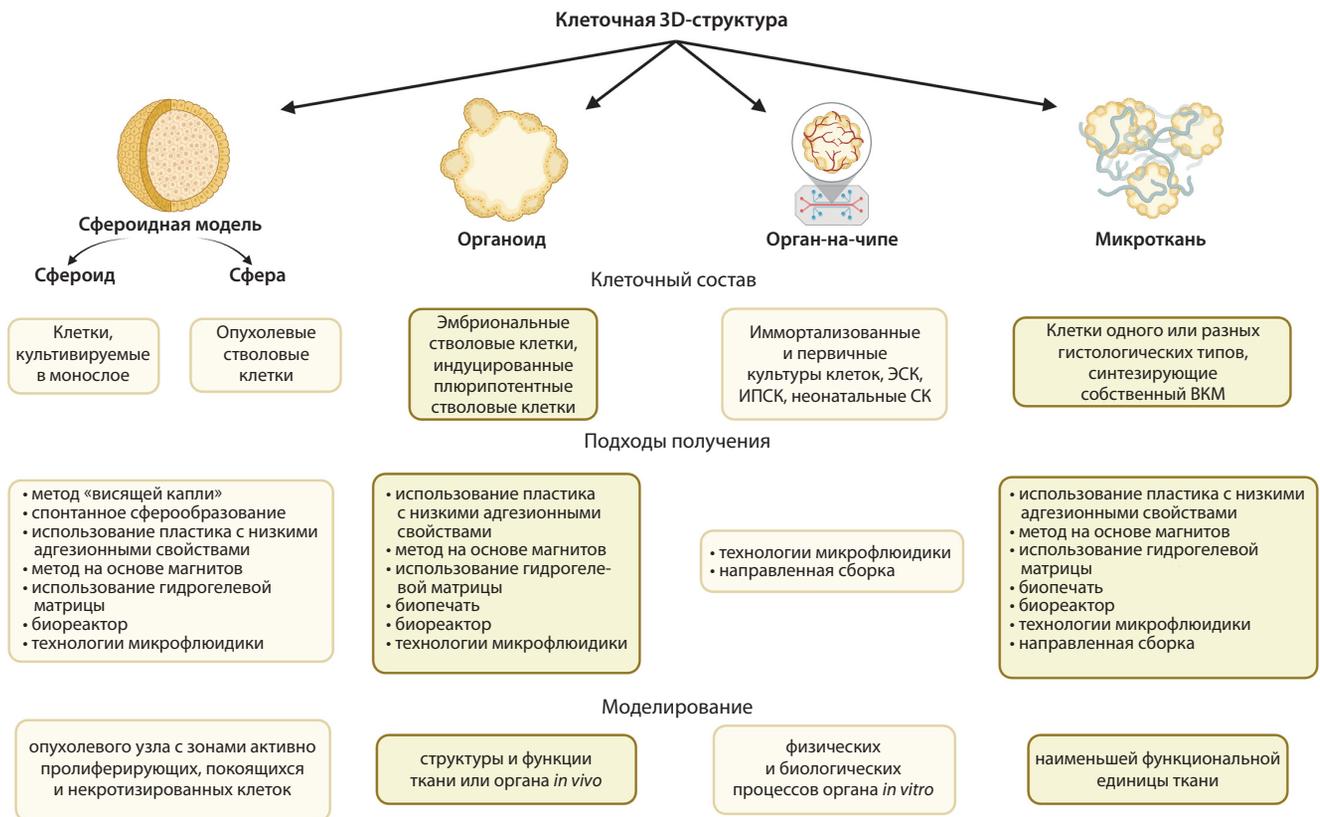


Рис. 2. Методы получения и характерные особенности клеточных 3D-структур: «сфероидной модели», «органойда», «органа-на-чипе» или «микроткани».

клатуру клеточных моделей в научном сообществе, в том числе и среди ученых РФ (Kang et al., 2021; Paşca et al., 2022) (рис. 2).

Сфероидные модели

Среди сфероидных моделей наиболее распространены «сферы» и «сфероиды» (Maliszewska-Olejniczak et al., 2019). К сферам относят туморосферы и тканевые опухо-

левые «сферы». Туморосферы описывают как опухолевые клетки, образующие 3D-кластеры из суспензии клеток в неадгезивных условиях. Опухолевые стволовые клетки (ОСК), которые ассоциируют с инициацией опухоли, обладают потенциалом к самообновлению и пролиферации, а также способностью формировать 3D-структуры при культивировании *in vitro* (Weiswald et al., 2015). Поскольку сферообразующие клетки являются стволовыми,

они способны дифференцироваться во все субпопуляции нестволовых клеток, имеющиеся в исходной клеточной культуре. Таким образом, туморосфера – это смесь ОСК и дифференцированных клеток (Maliszewska-Olejniczak et al., 2019), в то время как тканевые опухолевые «сферы» получают из образца опухолевой ткани пациента. Образец ткани диссоциируют, что позволяет опухолевым клеткам мигрировать из фрагментов в виде скоплений клеток и/или отдельных клеток, образуя плотные, компактные скопления или агрегаты клеток. Однако эта сфероидная модель ограничена исследованием только в области ОСК, поскольку она не может воспроизвести множественность других типов клеток в опухоли, а также сама плохо воспроизводится, так как некоторые ОСК остаются недифференцированными (Valent et al., 2012).

Сфероиды – это агрегаты клеток сферической формы, образующиеся в суспензии одиночных клеток гомо- или гетерогенного клеточного типа. Формирование такой модели происходит за счет способности клеток к гомотипической межклеточной адгезии, дополненной отсутствием адгезии клеток к пластику культурального флакона (Sakalem et al., 2021). Такая 3D-модель может быть получена как из клеток одной линии, так и из клеток различных линий, культивируемых совместно, и позволяет оценить способность клеток к спонтанной самоорганизации, синтезу белков ВКМ и формированию специфического микроокружения (Verjans et al., 2018). Сфероид похож на неваккуляризованный опухолевый узел, имитирует центральную зону гипоксии, внутреннюю зону покоящихся клеток и внешнюю зону активно пролиферирующих клеток и удобен как модель при исследовании злокачественных новообразований.

Основная область применения: в биологических исследованиях в качестве модели опухоли *in vitro*; для тестирования лекарственных средств; как основа для тканевой инженерии (Daly et al., 2021; Hsu et al., 2021; Corgnac et al., 2022; George et al., 2022; Nushtaeva et al., 2022; Vasileva et al., 2022).

Преимущества и недостатки сфероидной модели

Одним из преимуществ сфероидных моделей является отсутствие потребности в экзогенном ВКМ (Nushtaeva et al., 2022). Такие модели воспроизводят биохимические реакции исходной родительской опухоли (George et al., 2022) и межклеточные взаимодействия (Corgnac et al., 2022). Кроме того, сфероидные модели могут быть использованы как строительные блоки для органов-на-чипе и микротканей (Corgnac et al., 2022).

Однако важно учитывать, что в зависимости от метода получения, длительности культивирования и размера сфероидов также может увеличиваться некротическая область, ограничивая исследователей, например, при тестировании лекарственных препаратов (Verjans et al., 2018). Не все линии клеток способны формировать сфероидные модели (Ivascu, Kubbies, 2007), и существует ограниченная доступность клеточных линий, полученных из нормальных или минимально трансформированных тканей (Gunti et al., 2021; Han et al., 2021). Кроме того, требуется детальный подбор факторов роста для формирования и поддержания сфероидной модели.

Перспективы применения сфероидных моделей для исследований иммунологических и онкологических заболеваний

За последнее десятилетие иммунотерапия стала перспективным инструментом в онкотерапии (Bandara et al., 2024). Несмотря на это, эффективность иммунотерапии часто зависит от гистогенеза опухоли и особенностей организма пациента. Это говорит о необходимости создания улучшенных моделей доклинического скрининга, которые более точно воспроизводят биологию опухолей *in vivo*.

Сфероидные модели можно либо выращивать только из опухолевых клеток, либо совместно культивировать с различными типами клеток, такими как фибробласты, эндотелиальные и иммунные клетки, чтобы имитировать перекрестные помехи между различными клеточными компартментами опухолей пациентов (Абдурахманова и др., 2022; Heinrich et al., 2024). Хотя сфероиды не имеют сосудистой сети и клеточной гетерогенности первичной опухоли, их профили экспрессии генов и формирование некротического ядра делают их похожими на опухоли пациентов (Heinrich et al., 2024). В настоящее время это востребованная модель для оценки иммунотерапевтических стратегий благодаря ее относительно низкой стоимости и высокой воспроизводимости (Boucherit et al., 2020).

Сфероидные модели могут быть использованы для тестирования подходов иммунотерапии, в частности для оценки эффективности терапевтических антител и скрининга лекарств для усиления инфильтрации иммунных клеток и противоопухолевых эффектов против солидных опухолей. Например, в исследовании Мелани Гротц (Grotz et al., 2024) гетеротипическая сфероидная модель рака молочной железы была выбрана для оценки влияния высокоаффинного лиганда белка активации фибробластов на поведение наивных Т-клеток. В результате показано, что нацеливание на белок активации фибробластов актуально для иммунотерапии и эффективной активации Т-клеток в микроокружении опухоли. Сфероидные модели подходят для проверки эффективности подхода терапии с помощью химерного антигенного рецептора (CAR). Протестировав CAR Т-клетки, нацеленные на нефункциональный пуринаргический рецептор P2X7, Вероника Бандара с коллегами обнаружили, что такой подход усиливает противоопухолевый ответ в сфероидной модели рака яичника (Bandara et al., 2024). Известно применение сфероидных моделей для оценки роли и функций наноразмерных биомолекул. Так, Лилите Садовска и ее коллеги разработали клеточную 3D-модель рака предстательной железы для изучения воздействия внеклеточных везикул (ВВ) на иммунные клетки человека (Sadovska et al., 2018). В результате было показано, что большинство ВВ остаются связанными на поверхности В-клеток, а часть ВВ проникает в Т-клетки посредством макропиноцитоза.

Помимо генерации сфероидов, полученных из опухолевых клеток, существует другой подход, который заключается в разработке сфероидов, полученных из иммунных клеток. Макрофаги формируют сфероиды и могут сохранять жизнеспособность в течение как минимум 16 дней в 3D-культуре (Burchett et al., 2024). Танака с коллегами смогли продемонстрировать, что макрофаги имеют тенденцию к поляризации в сторону противоопухолевого

фенотипа M1, противопоставляя его проопухолевому фенотипу M2 в состоянии сфероиды (Tanaka et al., 2018).

Чтобы точно имитировать состав опухоли и исследовать функциональные свойства иммунных клеток, необходимо усовершенствовать существующие сфероидные модели. Например, вводить новые типы клеток в сфероид количественно точным образом. Кроме того, соотношения клеток в модели должны соответствовать тому, что демонстрирует опухоль. Это требует обширного изучения клеточного состава опухоли перед созданием модели. Наиболее полная гетеротипическая сфероидная модель была представлена в исследовании Марселя Генриха (Heinrich et al., 2024). Авторы подобрали количество и соотношение опухолевых клеток глиобластомы, микроглии и астроцитов для воссоздания реалистичной модели опухоли головного мозга. Включение как астроцитов, так и микроглии в гетеротипическую модель значительно увеличивало рост модели, а также продемонстрировало, что астроциты играют решающую роль в инвазии клеток глиобластомы. Помимо того, астроциты и микроглия способствуют созданию плотного физического барьера, защищающего модель опухоли от инфильтрации макромолекул или иммунных клеток.

Органоиды

Значительную часть клеточных 3D-культур называют органоидами, поскольку в условиях имитации 3D-среды организма *in vitro* клетки могут спонтанно самоорганизовываться, формируя сложные гистологические структуры, подобные структурам в органах, из которых они произошли. Например, клетки молочной железы, культивируемые в 3D-формате, способны образовать структуры, подобные разветвленным протокам (Lee et al., 2007). В настоящее время под термином «органойд» понимают искусственную 3D-структуру, полученную из СК и состоящую из органоспецифических клеток, способных к самоорганизации и отражающих структуру и функции органа *in vivo*. Такая модель может быть получена из ЭСК, ИПСК либо из неонатальных СК (Sakalem et al., 2021; George et al., 2022) и обеспечивает релевантные представления о функциональности и дифференцировке тканей. Обычно органоиды состоят из различных типов клеток, происходящих из разных зародышевых листков, и, как правило, имеют более высокий порядок самоорганизации по сравнению со сфероидом (Nikonogova et al., 2023).

При описании органоидов используют также термин «ассамблоиды» – объединяющиеся органоиды, сформированные из клеток разных органов или разных областей органа (Eke et al., 2022). Такая модель должна имитировать морфофункциональные единицы соответствующих тканей *in vivo*.

Основная область применения: медико-биологические исследования, тестирование лекарственных средств, тканевая инженерия и трансплантационная терапия (Kassis et al., 2019; Hofer, Lutolf, 2021; Mesci et al., 2022; Miao et al., 2022).

Преимущества и недостатки органоидов

Изменяя процедуру выделения клеток и комбинацию факторов роста при культивировании, ученые могут соз-

давать органоиды, состоящие как из нормальных, так и из онкотрансформированных клеток (Ivascu, Kubbies, 2007; Daly et al., 2021; Hsu et al., 2021; Cognac et al., 2022), что является мощным инструментом при скрининге противоопухолевых лекарственных средств. Клеточные модели органоидов можно культивировать в течение длительного времени, генетически модифицировать и криоконсервировать, сохраняя их фенотипические и функциональные характеристики. Однако необходимо учитывать, что формирование сложной структуры в модели органоида обычно занимает от двух до трех месяцев в зависимости от типа ткани и требует определенных факторов роста (Gunti et al., 2021).

Перспективы применения органоидов для исследований иммунологических и онкологических заболеваний

Использование органоидов, полученных от пациента, в персонализированной иммунотерапии рака показало большие перспективы. Такие органоиды сохраняют генетические и функциональные характеристики исходных опухолей, что позволяет адаптировать иммунотерапевтические стратегии к уникальному профилю онкологического заболевания каждого пациента (Noorintan et al., 2024).

В исследовании (Forsythe et al., 2021) с применением персонализированных органоидных моделей проводилось доклиническое изучение иммунотерапии при лечении рака аппендикса. Органоиды опухоли пациента были получены с использованием несортированных опухолевых клеток с обогащением и без обогащения иммунными клетками пациента, полученными из периферической крови, селезенки или лимфатических узлов, для терапии ингибиторами PD-1 (программируемый белок клеточной смерти 1) и активатором Т-клеток. Авторы показали цитотоксическую эффективность в подгруппе иммуноусиленных органоидов рака аппендикса из первичных опухолей как низкой, так и высокой степени злокачественности. Это исследование демонстрирует потенциал иммунотерапии при раке аппендикса и полезность иммунокомпетентных органоидов при отборе пациентов для клинических испытаний при редких видах рака.

Включение 3D-моделей для прогнозирования клинических ответов на скрининговые препараты оказалось более эффективным, чем использование традиционных адгезивных культур, поскольку именно 3D-модели в большей степени воспроизводят особенности первичной опухоли. Чжоу с коллегами разработали стандартизированный протокол для создания системы опухоль–органойд–Т-клетки с органоидами опухоли молочной железы и первичными опухолеспецифическими CD8⁺ Т-клетками. Эта система облегчает высокопроизводительный скрининг лекарственных препаратов с использованием органоидов опухолей молочной железы мышей, а также позволяет проводить более точное прогнозирование терапевтических ответов на противораковые препараты (Zhou et al., 2021). Авторы показали, что современные эпигенетические ингибиторы повышают презентацию антигена, опосредованную главным комплексом гистосовместимости класса I (МНС I) на клетках опухоли молочной железы. Кроме того, лечение

ингибитором гистондеацетилазы BML-210 существенно сенсibiliзировало клетки опухоли молочной железы к ингибитору PD-1.

Разработка систем совместного культивирования первичного опухолевого эпителия, включающих дополнительные клеточные компоненты без искусственного добавления, является сложной задачей. Нил со своей группой успешно создали органоиды, полученные из опухолевого эпителия, сохраняющие собственные иммунные клетки, что отражает разнообразие микроокружения опухоли пациента (Neal et al., 2018). В персонализированных органоидах наблюдались популяции инфильтрирующих CD3+ Т-клеток, экспрессирующих PD-1; цитотоксических Т-клеток; Т-хелперов; В-клеток; NK-клеток и различное количество макрофагов. Этот метод получения персонализированных органоидов, сохраняющий иммунную структуру, имеет большие перспективы для моделирования персонализированной иммунотерапии *in vitro*.

Шнальцгер с коллегами разработали органоиды из клеток толстой кишки, полученных от пациента для изучения цитотоксичности CAR NK-клеток, направленных на антиген EpCAM (молекула клеточной адгезии) (Schnalzger et al., 2019). CAR NK-EpCAM эффективно лизировали опухолевые клетки в первые сутки совместного культивирования. Авторы утверждают, что полученные ими органоиды представляют собой чувствительную, персонализированную платформу *in vitro* для оценки эффективности иммунотерапии на основе CAR.

Тем не менее, насколько бы сложными ни были модели органоидов, они не обеспечивают физиологическое представление организации ткани *in vivo*. В этих моделях отсутствует сосудистая система, а следовательно, и диффузия лекарств, клеточных продуктов, и их проникновение внутрь органоида ограничены.

Орган-на-чипе

Технология «орган-на-чипе» произвела революцию в области биомедицинских исследований, предоставив передовые платформы для моделирования сложных систем органов в условиях *in vitro*. «Орган-на-чипе» – это технология культивирования клеток в потоке жидкости для имитации искусственного органа или их системы, что позволяет воспроизводить структурные и функциональные характеристики органов и их взаимодействие. Данная технология применима для изучения механизмов заболеваний, реакций систем организма на терапевтические агенты и профилей их токсичности (Doost, Srivastava, 2024).

Модель «орган-на-чипе» представляет собой небольшие микрофлюидные устройства в виде чипов, изготовленных из биосовместимых материалов, которые благодаря сети микрокамер, микроканалов и ламинарного потока позволяют культивировать клетки в условиях, подобных средам *in vivo* (Doost, Srivastava, 2024). Такая модель может быть получена из ЭСК, ИПСК или из неонатальных СК, а также иммортализованных и первичных культур клеток (Singh et al., 2022). Кроме того, микрофлюидные технологии можно объединить со сфероидной моделью и/или органоидами для формирования гибридной модели (Wei et al., 2023).

Основная область применения: медико-биологические исследования, тестирование лекарственных средств, тканевая инженерия (Azizgolshani et al., 2021; Lohasz et al., 2021).

Преимущества и недостатки модели «орган-на-чипе»

Органы-на-чипе позволяют полностью контролировать микрофлюидные системы и регулирование клеточных процессов в исследовании, имитируя динамические физиологические процессы человека, такие как дыхание, перистальтика и кровообращение (Alver et al., 2024).

Одно из ограничений технологии «орган-на-чипе» заключается в необходимости использовать материал, который не влияет на компоненты клеточной среды и поддерживает стабильную жидкостную связь. Поскольку объем ламинарной жидкости небольшой, то поверхностные эффекты доминируют над объемным эффектом. Кроме того, ламинарный поток присутствует на пересечении нескольких жидкостей, соответственно, жидкости могут не смешиваться должным образом (Danku et al., 2022).

Перспективы применения «органа-на-чипе» для исследований иммунологических и онкологических заболеваний

Кровяные и лимфатические сосуды играют важную роль в иммунологических процессах, перемещая иммунные клетки между органами, тканями и лимфатической системой. Технология применения микрофлюидных чипов воспроизводит ключевые сложные и динамические характеристики опухоли, такие как васкуляризация и экстравазация, улучшая доклинические модели в развитии иммунотерапии рака (Doost, Srivastava, 2024). Большинство моделей «органов-на-чипе» содержат параллельные каналы для включения опухолевых клеток в гидрогель и иммунные клетки, встроенные в гидрогель или перфузируемые из бокового канала. Выбор конструкции микрофлюидной модели обычно определяется исследуемым вопросом, поскольку пропускная способность, динамические характеристики (например, поток) и возможности молекулярного считывания сильно различаются между моделями (Chernyavska et al., 2023). Так, Шабнам Джейбоуэй с коллегами использовали в микрофлюидном чипе сфероиды, сформированные из клеток рака молочной железы, для оценки гетерогенности опухоли пациента и анализа миграционного и инвазивного потенциала (Jeibouei et al., 2024). В результате было установлено, что повышение уровня экспрессии HER2 и маркера макрофагов M2a, а также жесткость белков ВКМ являются важными факторами, влияющими на миграцию и инвазию опухолевых клеток. В другом исследовании была реконструирована гетеротипическая модель HER2+-опухоли молочной железы для оценки эффекта моноклональных антител (Nguyen M. et al., 2018). Авторы культивировали в многокамерном чипе опухолевые, эндотелиальные клетки, мононуклеары крови и опухоль-ассоциированные фибробласты. Эта модель позволила протестировать моноклональные антитела в сложной 3D-системе, которая допускает перфузию растворимых молекул, учитывая гетерогенность опухоли (Nguyen M. et al., 2018).

В отличие от адаптивных иммунных клеток, врожденным иммунным клеткам не нужны МНС для своей активации. Сложность значительно возрастает, когда адаптивные иммунные клетки должны использоваться в эксперименте, учитывая молекулы МНС, в присутствии других типов клеток с несоответствием МНС (Magenau et al., 2016). Поэтому крайне важно разрабатывать иммунокомпетентные модели «органов-на-чипе», чтобы лучше понять, как иммунные клетки взаимодействуют с органами в состоянии здоровья и болезни. В своем исследовании Ирина Вейт с коллегами создали персонализированные модели «органов-на-чипе» рака легкого с их аутологичными первичными опухолевыми, стромальными фибробластами и иммунными клетками, выделенными из образцов опухоли, и измерили реакцию на лечение анти-PD-1 (Veith et al., 2024). Микрофлюидная модель способна была воспроизводить зависящие от стромы механизмы устойчивости к иммунотерапии, и интеграция аутологичных иммуносупрессивных опухоль-ассоциированных клеток в модели ухудшила реакцию на анти-PD-1 терапию.

Хотя органы-на-чипе могут воспроизводить большинство характеристик отдельных органов и физиологических условий потока, они не способны улавливать динамические взаимодействия между несколькими органами (Kumar et al., 2024). Кроме того, органы-на-чипе по-прежнему включают не все органоспецифичные клетки. Модель требует дальнейшего усовершенствования, например с интеграцией в нее органоидов. Группа немецких ученых создала модель для инфузии, рекрутинга и инфильтрации CAR T-клеток в солидные опухоли, объединив подходы «органов-на-чипе» и «органоиды», полученные от пациента. Модель использовали для исследования различных схем лечения дазатинибом в качестве фармакологического переключателя безопасности для контроля CAR T-клеток во время терапии. Подход позволил провести *in vitro* оценку безопасности и эффективности с учетом особенностей пациента (Maulana et al., 2024).

Микроткань

«Микроткань» – гибридная клеточная 3D-модель, которая имеет специфический тканевый фенотип и содержит тканеспецифичные компоненты ВКМ. Микроткани формируются при агрегации суспензии клеток друг к другу и/или к окружающему их ВКМ и компактизации, увеличивающей плотность 3D-структуры (Euckmans, Chen, 2017). Сформировать микроткань возможно при получении модели «сфероидов» или «органоидов» как из одного типа клеток, так и из гистологически различных типов клеток (Eke et al., 2022), а также при интеграции в модель «орган-на-чипе». При таком подходе микроткани могут представлять собой сферические многоклеточные агрегаты, созданные для воспроизведения наименьшей функциональной единицы ткани или органа. Во время самоорганизации клетки синтезируют свой собственный ВКМ, восстанавливают клеточные контакты и, таким образом, воспроизводят специфические тканевые функции и интегрированные клеточные ответы на стимулы окружающей среды. Хотя в составе микроткани формируется среда, позволяющая определенным типам клеток максимально полно имитировать их нативное поведение *in vivo*, многие

ткани в организме испытывают значительную механическую нагрузку, которая изменяет структуру матрикса и функцию клеток, что сложно воспроизвести в 3D-модели (Euckmans, Chen, 2017).

Основная область применения: медико-биологические исследования, тестирование лекарственных средств, тканевая инженерия и трансплантационная терапия (Wang Y. et al., 2020; Zhang et al., 2022).

Преимущества и недостатки микроткани

Микроткани позволяют воссоздать сложную нативную архитектуру тканей *in vivo*, в том числе имитацию сосудистой сети, взаимодействия клетка-клетка и клетка-ВКМ (Eke et al., 2022). С использованием микроткани моделируются патологические процессы для персонализированного скрининга и разработки лекарственных средств. Однако следует учитывать низкую скорость сборки для имитации макромасштабных тканей, построение сценария клеточной эволюции в 3D-измерении, приводящей к появлению функции, а не формирование конечной функциональной структуры. Кроме того, источники исходных клеток могут оказывать влияние на достоверность и воспроизводимость модели (Eke et al., 2022; Schot et al., 2023; Wang O. et al., 2023).

Перспективы применения микроткани для исследований иммунологических и онкологических заболеваний

Микроткань представляет собой биомиметическую модель *in vitro*, сформированную из сфероидов и/или органоидов в качестве биологических строительных блоков для разработки тканей и органов с помощью как простых подходов 3D-культивирования, так и инновационных инженерных систем (Burdis et al., 2022). Преимущество модели заключается в том, что организация ткани может быть полностью спроектирована, а сборка модели регулируется химически или механически для получения желаемой структуры ткани.

Клаудия Мартинс и коллеги разработали гетеротипическую модель микроткани глиобластомы на основе сфероидной модели для оценки противоопухолевых нанопрепаратов (Martins et al., 2023). Полученная модель имитировала организацию опухоли, продукцию внеклеточного матрикса и демонстрировала цитокиновую сигнатуру. Макрофаги в составе микроткани поляризовались в фенотип M1/M2 в соответствии с нанотерапией доцетакселом. В исследовании Казуаки Ниномия и Тацухико Таниучи с использованием био-3D-принтера со сфероидной укладкой на Кензан (микроигльчатая матрица) была собрана микроткань путем точного укладывания сфероидов из нормальных и раковых клеток. Данная модель впервые позволила неинвазивно наблюдать динамическое поведение инвазии раковых клеток (Ninomiya, Taniuchi, 2024). Инья Вальдхауэр с коллегами разработали гетеротипические 3D-модели микротканей для изучения активности новых противоопухолевых иммуноотерапевтических препаратов на основе ИЛ-2 (Waldhauer et al., 2013). Модель микроткани на основе клеток опухоли/фибробластов/лимфоцитов позволяет контролировать проникновение антител и их нацеливание на компоненты опухоли и стромы, изучать

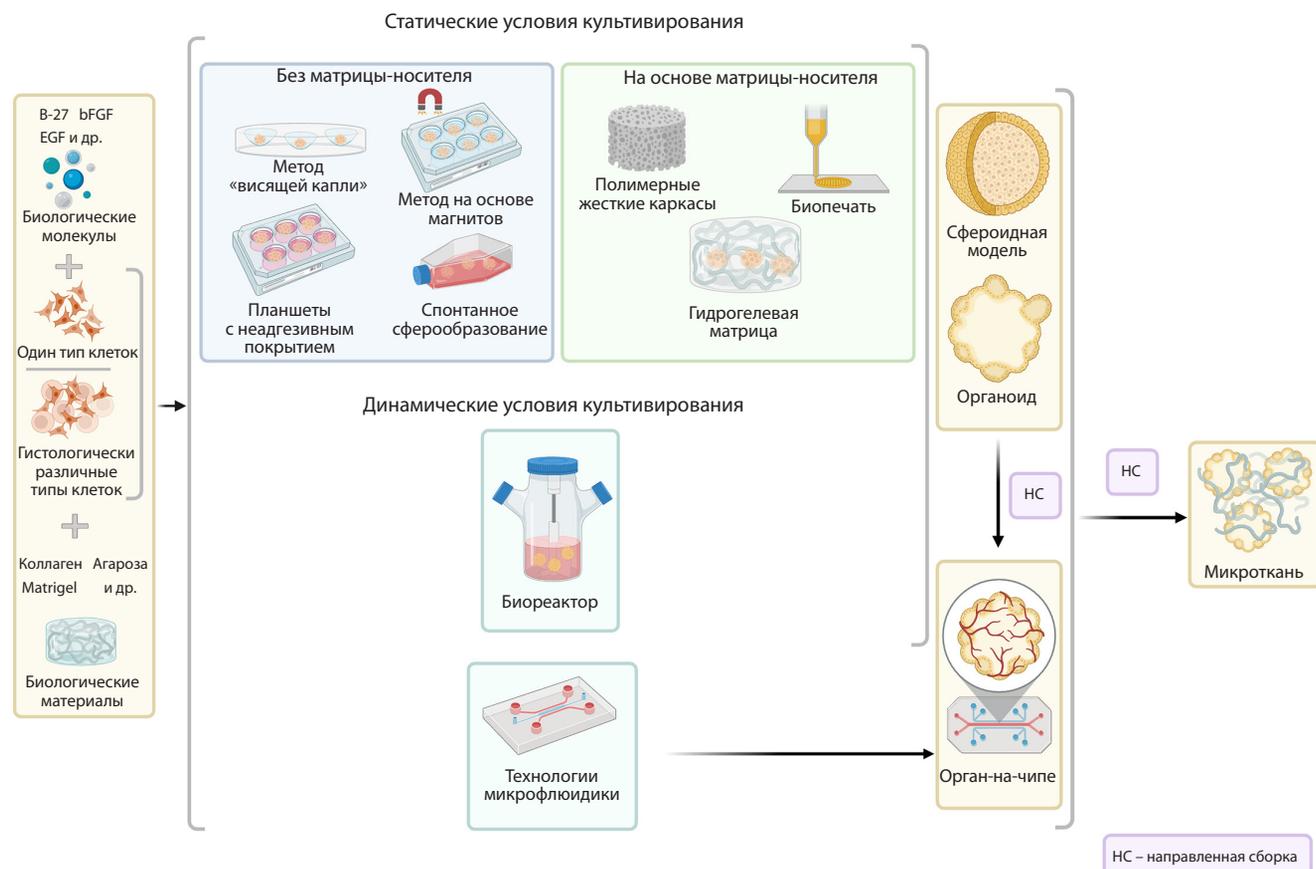


Рис. 3. Методы получения 3D-структур.

взаимодействие опухолевых клеток с иммунными клетками в системе, которая больше напоминает микросреду опухоли *in vivo*. Гьюсик Хонг с коллегами, используя системы биопечати и микрожидкостной эмульгации, сконструировали микротканную сфероидную модель с дольчатой структурой и реализацией функций печени (Hong et al., 2021). Структурированные микротканые сфероиды с выраженной васкуляризацией показали улучшенную секрецию альбумина и мочевины.

Таким образом, использование подхода микроткани предполагает комбинацию уже существующих 3D-моделей для расширения воспроизведения реалистичных особенностей ткани в области иммунологии опухолей и остается многообещающей моделью при разработке стратегий иммунотерапии.

Культивирование клеток в 3D-моделях

Условия культивирования в трехмерных системах должны обеспечивать клетки всеми физическими и химическими условиями, необходимыми для имитации среды *in vivo*. В настоящее время существует множество методов культивирования клеток в составе 3D-структур (рис. 3). При выборе способа получения 3D-клеточной структуры необходимо учитывать следующие критерии:

1) клеточный состав: моно- (Troitskaya et al., 2021) или гетерогенная клеточная модель (Arora et al., 2022; Nushataeva et al., 2022);

2) способ формирования 3D-модели: с использованием специальных матриц-носителей (Sulaiman et al., 2020) или без их использования (Nushataeva et al., 2022);

3) условия культивирования: статические (Arora et al., 2022) или динамические (Coluccio et al., 2019).

Некоторые преимущества и недостатки методов получения основных 3D-моделей приведены в таблице.

Заключение

По сравнению с клетками адгезивных культур, клетки в 3D-структурах моделируют межклеточные взаимодействия, организованные в пространстве, и клеточную гетерогенность, что в совокупности более полно отражает организацию тканей *in vivo* (Eke et al., 2022). В данном обзоре рассмотрены нюансы терминологии в области 3D-клеточного моделирования, основные подходы к получению моделей, а также перспективы их использования в биомедицинских исследованиях.

Трехмерные «сфероидные модели» и «органониды» дают возможность приблизиться к архитектуре и функциональности ткани, из которой они происходят. Однако, несмотря на преимущества этих моделей, которые позволяют учитывать часть микросреды, такой как стромальные и иммунные клетки, им все еще не хватает динамики среды, свойственной условиям *in vivo*. Микрофлюидные технологии «органов-на-чипе» в области онкологии объединяют преимущества трехмерной культуры в контролируемой и

Преимущества и недостатки способов культивирования основных 3D-моделей

Название подхода	3D-модель	Суть метода	Преимущества	Недостатки	Литературный источник
Метод «висящей капли»	Сфероидная модель, микроткань	Капля суспензии клеток помещается на крышку культурального планшета, крышка переворачивается, в результате чего клетки скапливаются на границе раздела воздух-жидкость и формируют 3D-структуру	<ul style="list-style-type: none"> • Возможность работать с небольшим количеством клеток без использования дорогостоящих реагентов • Получение большого количества 3D-культур • Возможен контроль размера модели 	<ul style="list-style-type: none"> • Объем капли ограничен необходимостью сохранения поверхностного натяжения • Гетерогенность размеров получаемых сфероидов • Не подходит для длительного культивирования • Дорого при использовании специализированных планшетов 	Higgins et al., 2010; Nguyen O.P. et al., 2021
Спонтанное сферообразование	Сфероидная модель	Спонтанное сферообразование стволовоподобных клеток при культивировании клеток в 2D-формате	<ul style="list-style-type: none"> • Получение 3D-модели без специального оборудования, материалов и факторов роста • Селективное культивирование СК • Недорогой метод 	<ul style="list-style-type: none"> • Гетерогенность размеров 3D-моделей • Отсутствие возможности получения одиночных 3D-моделей • Отсутствие возможности контроля размера модели 	Chen et al., 2021; Troitskaya et al., 2021
Использование пластика с низкими адгезионными свойствами	Сфероидная модель, органоид, микроткань	Вынужденная агрегация клеток в 3D-модель при культивировании в планшетах, дно лунок которых покрыто биополимерами, предотвращающими адгезию клеток к поверхности пластика	<ul style="list-style-type: none"> • Возможность получения одиночных моделей • Возможно сокультивирование различных типов клеток • Возможен контроль размера модели • Недорогой метод 	<ul style="list-style-type: none"> • Дорого при использовании специализированных планшетов • Невозможно контролировать однородность модели 	Jeong et al., 2020; Chen et al., 2021
Методы на основе магнитов	Сфероидная модель, органоид, микроткань	Монослой клеток инкубируют с суспензией магнитных наночастиц. Агрегация клеток с дальнейшим формированием 3D-модели происходит под действием магнитной силы	<ul style="list-style-type: none"> • Быстрая агрегация клеток • Возможен контроль размера модели • Возможно сокультивирование различных типов клеток 	<ul style="list-style-type: none"> • Гетерогенность клеточных агрегатов по форме и размерам • Дорогостоящий метод 	Caleffi et al., 2021; Gaitán-Salvatella et al., 2021
Использование гидрогелевой матрицы	Сфероидная модель, органоид, микроткань	Гидрогель используют как подложку, предотвращающую адгезию клеток к поверхности, или клетки смешивают с гидрогелем	<ul style="list-style-type: none"> • Нетоксичность субстрата • Простота манипуляций • Возможность длительного культивирования • Возможен контроль размера модели 	<ul style="list-style-type: none"> • Неоднородность состава и размеров 3D-моделей • непригоден для клеток с высоким инвазивным потенциалом • Низкая стабильность и возможная иммуногенность гидрогелевой матрицы 	Ravi et al., 2016; Badea et al., 2019
Биопечать	Микроткань	Пространственная организация клеток, имитирующая архитектуру ткани или органа, формируется при послойном нанесении материала, используемого для биопечати. Способы клеточной печати: экструзионный, струйный, лазерный, биопечать под давлением	<ul style="list-style-type: none"> • Процесс может быть автоматизирован • Возможность контроля размера модели 	<ul style="list-style-type: none"> • Дорогостоящий и технологически сложный метод 	Sun et al., 2021; Eke et al., 2022
Биореактор	Сфероидная модель, органоид	Суспензия клеток, помещенная в специальную камеру, подвергается непрерывному перемешиванию для предотвращения адгезии клеток к поверхности. Внутри биореактора происходит постоянная циркуляция питательных веществ и удаление продуктов метаболизма клеток	<ul style="list-style-type: none"> • Получение большого количества 3D-моделей на промышленном уровне 	<ul style="list-style-type: none"> • Дорогостоящий метод • Невозможно контролировать однородность модели • Скорость вращения сосуда может повлиять на физиологические реакции клеток • Отсутствие возможности контроля размера модели 	Di Buduo et al., 2021; Khan et al., 2021

Окончание таблицы

Название подхода	3D-модель	Суть метода	Преимущества	Недостатки	Литературный источник
Технологии микрофлюидики	Органоид, сфероидная модель, орган-на-чипе, микроткань	Основа: чип с каналами, в которых поддерживается постоянное ламинарное течение, а перенос осуществляется за счет диффузии	<ul style="list-style-type: none"> Использование минимального количества клеток и реагентов Контроль размера 3D-модели Быстрое формирование модели за счет постоянной перфузии Клетки минимально подвержены гипоксии за счет используемых в чипе материалов, проницаемых для кислорода, и факторов роста 	<ul style="list-style-type: none"> Сложность сбора клеток для анализа Требуется дорогое оборудование 	Bircsak et al., 2021; Nair et al., 2021
Направленная сборка	Орган-на-чипе, микроткань	Формообразование модели в желаемую структуру происходит за счет химической связи, физических взаимодействий или биологической адгезии между клетками в сфероидах или органоидах	<ul style="list-style-type: none"> Контроль состава и размера модели Подходит для тканей, богатых матриксом (кости, хрящи) 	<ul style="list-style-type: none"> Низкая воспроизводимость Сложность восстановления полной архитектуры ткани 	Kim et al., 2018; Eke et al., 2022

динамической среде. Помимо этого, сфероиды и органоиды выступают в роли строительных блоков и формируют микроткань, которая воссоздает сложности нативной архитектуры ткани *in vivo* (Eke et al., 2022).

Трехмерные клеточные модели представляют собой информативный инструмент при исследовании механизмов развития и прогрессирования заболеваний, а также выявления новых биомаркеров, поскольку максимально приближены к первичной опухоли на клеточном и молекулярно-генетическом уровне. Кроме того, такие модели служат релевантной доклинической *in vitro* платформой для разработки лекарственных препаратов и реализации потенциала персонализированной медицины.

Список литературы / References

Абдурахманова М.М., Ермаков М.С., Рихтер В.А., Коваль О.А., Нуштаева А.А. Оптимизация подходов к формированию гетерогенных трехмерных моделей рака молочной железы. *Гены и клетки*. 2022;17(4):91-103. doi 10.23868/gc425244 [Abdurakhmanova M.M., Ermakov M.S., Richter V.A., Koval O.A., Nushtaeva A.A. The optimization of methods for the establishment of heterogeneous three-dimensional cellular models of breast cancer. *Genes and Cells*. 2022;17(4):91-103. doi 10.23868/gc425244 (in Russian)]

Alver C.G., Drabbe E., Agarwal A., Ishahak M. Roadblocks confronting widespread dissemination and deployment of Organs on Chips. *Nat Commun*. 2024;15:5118. doi 10.1038/s41467-024-48864-3

Arora L., Kalia M., Dasgupta S., Singh N., Verma A.K., Pal D. Development of a multicellular 3D tumor model to study cellular heterogeneity and plasticity in NSCLC tumor microenvironment. *Front Oncol*. 2022;12:881207. doi 10.3389/fonc.2022.881207

Azizgolshani H., Coppeta J.R., Vedula E.M., Marr E.E., Cain B.P., Luu R.J., Lech M.P., Kann S.H., Mulhern T.J., Tandon V., Tan K., Haroutunian N.J., Keegan P., Rogers M., Gard A.L., Baldwin K.B., de Souza J.C., Hoefler B.C., Bale S.S., Kratchman L.B., Zorn A., Patterson A., Kim E.S., Petrie T.A., Wiellette E.L., Williams C., Isenberg B.C., Charest J.L. High-throughput organ-on-chip platform

with integrated programmable fluid flow and real-time sensing for complex tissue models in drug development workflows. *Lab Chip*. 2021;21(8):1454-1474. doi 10.1039/d1lc00067e

Badea M.A., Balas M., Hermenean A., Ciceu A., Herman H., Ionita D., Dinischiotu A. Influence of matrigel on single- and multiple-spheroid cultures in breast cancer research. *SLAS Discov*. 2019;24(5):563-578. doi 10.1177/2472555219834698

Bandara V., Niktaras V.M., Willett V.J., Chapman H., Lokman N.A., Macpherson A.M., Napoli S., Gundsambuu B., Foeng J., Sadlon T.J., Coombs J., McColl S.R., Barry S.C., Oehler M.K., Ricciardelli C. Engineered CAR-T cells targeting the non-functional P2X purinoceptor 7 (P2X7) receptor as a novel treatment for ovarian cancer. *Clin Transl Immunol*. 2024;13(5):e1512. doi 10.1002/cti2.1512

Barcellos-Hoff M.H., Aggeler J., Ram T.G., Bissell M.J. Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane. *Development*. 1989;105(2):223-235. doi 10.1242/dev.105.2.223

Bircsak K.M., DeBiasio R., Miedel M., Asebahi A., Reddinger R., Saleh A., Shun T., Verneti L.A., Gough A. A 3D microfluidic liver model for high throughput compound toxicity screening in the OrganoPlate®. *Toxicology*. 2021;450:152667. doi 10.1016/j.tox.2020.152667

Boucherit N., Gorvel L., Olive D. 3D tumor models and their use for the testing of immunotherapies. *Front Immunol*. 2020;11:603640. doi 10.3389/fimmu.2020.603640

Burchett A., Siri S., Li J., Lu X., Datta M. Novel 3-D macrophage spheroid model reveals reciprocal regulation of immunomechanical stress and mechano-immunological response. *Cell Mol Bioeng*. 2024;17(5):329-344. doi 10.1007/s12195-024-00824-z

Burdis R., Chariyev-Prinz F., Browe D.C., Freeman F.E., Nulty J., McDonnell E.E., Eichholz K.F., Wang B., Brama P., Kelly D.J. Spatial patterning of phenotypically distinct microtissues to engineer osteochondral grafts for biological joint resurfacing. *Biomaterials*. 2022;289:121750. doi 10.1016/j.biomaterials.2022.121750

Caleffi J.T., Aal M.C.E., Gallindo H.O.M., Caxali G.H., Crulhas B.P., Ribeiro A.O., Souza G.R., Delella F.K. Magnetic 3D cell culture: state of the art and current advances. *Life Sci*. 2021;1(286):120028. doi 10.1016/j.lfs.2021.120028

Chen Q., Cui L., Guan Y., Zhang Y. Diels-alder cross-linked, washing-free hydrogel films with ordered wrinkling patterns for multicellular

- spheroid generation. *Biomacromolecules*. 2021;22(8):3474-3485. doi 10.1021/acs.biomac.1c00570
- Chernyavska M., Masoudnia M., Valerius T., Verdurmen W.P.R. Organ-on-a-chip models for development of cancer immunotherapies. *Cancer Immunol Immunother*. 2023;72(12):3971-3983. doi 10.1007/s00262-023-03572-7
- Coluccio M.L., Perozziello G., Malara N., Parrotta E., Zhang P., Gentile F., Limongi T., Raj P.M., Cuda G., Candeloro P., Di Fabrizio E. Microfluidic platforms for cell cultures and investigations. *Microelectron Eng*. 2019;208:14-28. doi 10.1016/j.mee.2019.01.004
- Corgnac S., Damei I., Gros G., Caidi A., Terry S., Chouaib S., Deloger M., Mami-Chouaib F. Cancer stem-like cells evade CD8⁺CD103⁺ tumor-resident memory T (T_{RM}) lymphocytes by initiating an epithelial-to-mesenchymal transition program in a human lung tumor model. *J Immunother Cancer*. 2022;10(4):e004527. doi 10.1136/jitc-2022-004527
- Daly A.C., Davidson M.D., Burdick J.A. 3D bioprinting of high cell-density heterogeneous tissue models through spheroid fusion within self-healing hydrogels. *Nat Commun*. 2021;12(1):753. doi 10.1038/s41467-021-21029-2
- Danku A.E., Dulf E., Braicu C., Jurj A., Berindan-Neagoe I. Organ-on-a-chip: a survey of technical results and problems. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:840674. doi 10.3389/fbioe.2022.840674
- Di Buduo C.A., Laurent P.A., Zaninetti C., Lordier L., Soprano P.M., Ntai A., Barozzi S., La Spada A., Biunno I., Raslova H., Bussel J.B., Kaplan D.L., Balduini C.L., Pecci A., Balduini A. Miniaturized 3D bone marrow tissue model to assess response to Thrombopoietin-receptor agonists in patients. *eLife*. 2021;10:e58775. doi 10.7554/eLife.58775
- Doost N.F., Srivastava S.K. A comprehensive review of organ-on-a-chip technology and its applications. *Biosensors*. 2024;14(5):225. doi 10.3390/bios14050225
- Duryee W.R., Doherty J.K. Nuclear and cytoplasmic organoids in the living cell. *Ann NY Acad Sci*. 1954;58(7):1210-1231. doi 10.1111/j.1749-6632.1954.tb45904.x
- Edmondson R., Broglie J.J., Adcock A.F., Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*. 2014;12(4):207-218. doi 10.1089/adt.2014.573
- Eke G., Vaysse L., Yao X., Escudero M., Carri A., Trevisiol E., Vieu C., Dani C., Casteilla L., Malaquin L. Cell aggregate assembly through microengineering for functional tissue emergence. *Cells*. 2022;11(9):1394. doi 10.3390/cells11091394
- Eyckmans J., Chen C.S. 3D culture models of tissues under tension. *J Cell Sci*. 2017;130(1):63-70. doi 10.1242/jcs.198630
- Fata J.E., Mori H., Ewald A.J., Zhang H., Yao E., Werb Z., Bissell M.J. The MAPK^{ERK-1,2} pathway integrates distinct and antagonistic signals from TGF α and FGF7 in morphogenesis of mouse mammary epithelium. *Dev Biol*. 2007;306(1):193-207. doi 10.1016/j.ydbio.2007.03.013
- Forsythe S.D., Erali R.A., Sasikumar S., Laney P., Shelkey E., D'Agostino R., Jr., Miller L.D., Shen P., Levine E.A., Soker S., Votanopoulos K.I. Organoid platform in preclinical investigation of personalized immunotherapy efficacy in appendiceal cancer: feasibility study. *Clin Cancer Res*. 2021;27(18):5141-5150. doi 10.1158/1078-0432.CCR-21-0982
- Gaitán-Salvatella I., López-Villegas E.O., González-Alva P., Susate-Olmos F., Álvarez-Pérez M.A. Case report: formation of 3D osteoblast spheroid under magnetic levitation for bone tissue engineering. *Front Mol Biosci*. 2021;8:672518. doi 10.3389/fmolb.2021.672518
- George J., Chen Y., Abdelfattah N., Yamamoto K., Gallup T.D., Adamson S.I., Rybinski B., Srivastava A., Kumar P., Lee M.G., Baskin D.S., Jiang W., Choi J.M., Flavahan W., Chuang J.H., Kim B.Y.S., Xu J., Jung S.Y., Yun K. Cancer stem cells, not bulk tumor cells, determine mechanisms of resistance to SMO inhibitors. *Cancer Res Commun*. 2022;2(6):402-416. doi 10.1158/2767-9764.CRC-22-0124
- Gilazieva Z., Ponomarev A., Rutland C., Rizvanov A., Solovyeva V. Promising applications of tumor spheroids and organoids for personalized medicine. *Cancers (Basel)*. 2020;12(10):2727. doi 10.3390/cancers12102727
- Grotz M., van Gijzel L., Bitsch P., Carrara S.C., Kolmar H., Garg S. Mimicking the immunosuppressive impact of fibroblasts in a 3D multicellular spheroid model. *Front Drug Discov*. 2024;4:1427407. doi 10.3389/fddsv.2024.1427407
- Gunti S., Hoke A.T.K., Vu K.P., London N.R. Organoid and spheroid tumor models: techniques and applications. *Cancers (Basel)*. 2021;13(4):874. doi 10.3390/cancers13040874
- Guryanov M.I. Organized frequency structure of electrocardiogram during long-duration ventricular fibrillation under experimental conditions. *Sovremennye Tehnologii v Medicine = Modern Technologies in Medicine*. 2016;8(3):37-48. doi 10.17691/stm2016.8.3.04
- Han S.J., Kwon S., Kim K.S. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. *Cancer Cell Int*. 2021;21(1):152. doi 10.1186/s12935-021-01853-8
- Heinrich M.A., Huynh N.T., Heinrich L., Prakash J. Understanding glioblastoma stromal barriers against NK cell attack using tri-culture 3D spheroid model. *Heliyon*. 2024;10(3):e24808. doi 10.1016/j.heliyon.2024.e24808
- Higgins C.A., Richardson G.D., Ferdinando D., Westgate G.E., Jahoda C.A.B. Modelling the hair follicle dermal papilla using spheroid cell cultures. *Exp Dermatol*. 2010;19(6):546-548. doi 10.1111/j.1600-0625.2009.01007.x
- Hofer M., Lutolf M.P. Engineering organoids. *Nat Rev Mater*. 2021;6(5):402-420. doi 10.1038/s41578-021-00279-y
- Hong G., Kim J., Oh H., Yun S., Kim C.M., Jeong Y., Yun W., Shim J., Jang I., Kim C., Jin S. Production of multiple cell-laden microtissue spheroids with a biomimetic hepatic-lobule-like structure. *Adv Mater*. 2021;33(36):e2102624. doi 10.1002/adma.202102624
- Hsu T.W., Lu Y.J., Lin Y.J., Huang Y.T., Hsieh L.H., Wu B.H., Lin Y.C., Chen L.C., Wang H.W., Chuang J.C., Fang Y.Q., Huang C.C. Transplantation of 3D MSC/HUVEC spheroids with neuroprotective and proangiogenic potentials ameliorates ischemic stroke brain injury. *Biomaterials*. 2021;272:120765. doi 10.1016/j.biomaterials.2021.120765
- Ivascu A., Kubbies M. Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids. *Int J Oncol*. 2007;31(6):1403-1413. doi 10.3892/ijo.31.6.1403
- Jedrzejszak-Silicka M. History of cell culture. In: *New Insights into Cell Culture Technology*. InTech, 2017. doi 10.5772/66905
- Jeibouei S., Khazraie A., Hojat A., Reza A. Human-derived Tumor-On-Chip model to study the heterogeneity of breast cancer tissue. *Biomater Adv*. 2024;162:213915. doi 10.1016/j.bioadv.2024.213915
- Jeong H.S., Park C.Y., Kim J.H., Joo H.J., Choi S.C., Choi J.H., Lim I.R., Park J.H., Hong S.J., Lim D.S. Cardioprotective effects of genetically engineered cardiac stem cells by spheroid formation on ischemic cardiomyocytes. *Mol Med*. 2020;26(1):15. doi 10.1186/s10020-019-0128-8
- Kang S.M., Kim D., Lee J.H., Takayama S., Park J.Y. Engineered microsystems for spheroid and organoid studies. *Adv Healthc Mater*. 2021;10(2):e2001284. doi 10.1002/adhm.202001284
- Karimifard S.A., Salehzadeh-Yazdi A., Taghizadeh-Tabarsi R., Akbari-Birgani S. Mechanical effects modulate drug resistance in MCF-7-derived organoids: insights into the wnt/ β -catenin pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2024;695:149420. doi 10.1016/j.bbrc.2023.149420
- Kassis T., Hernandez-Gordillo V., Langer R., Griffith L.G. OrgaQuant: human intestinal organoid localization and quantification using deep convolutional neural networks. *Sci Rep*. 2019;9(1):12479. doi 10.1038/s41598-019-48874-y
- Khan I., Prabhakar A., Delepine C., Tsang H., Pham V., Sur M. A low-cost 3D printed microfluidic bioreactor and imaging chamber for live-organoid imaging. *Biomicrofluidics*. 2021;15(2):024105. doi 10.1063/5.0041027

- Kim T.Y., Kofron C.M., King M.E., Markes A.R., Okundaye A.O., Qu Z., Mende U., Choi B.R. Directed fusion of cardiac spheroids into larger heterocellular microtissues enables investigation of cardiac action potential propagation via cardiac fibroblasts. *PLoS One*. 2018;13(5):e0196714. doi 10.1371/journal.pone.0196714
- Kumar S., Wei G., Aggarwal N. Organ-on-chip technology: opportunities and challenges. *Biotechnol Notes*. 2024;5:8-12. doi 10.1016/j.biotno.2024.01.001
- Lee G.Y., Kenny P.A., Lee E.H., Bissell M.J. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nat Methods*. 2007;4(4):359-365. doi 10.1038/nmeth1015
- Li M.L., Aggeler J., Farson D.A., Hatier C., Hassell J., Bissell M.J. Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84(1):136-140. doi 10.1073/pnas.84.1.136
- Lohasz C., Loretan J., Sterker D., Görlach E., Renggli K., Argast P., Frey O., Wiesmann M., Wartmann M., Rausch M., Hierlemann A. A microphysiological cell-culturing system for pharmacokinetic drug exposure and high-resolution imaging of arrays of 3D microtissues. *Front Pharmacol*. 2021;12:785851. doi 10.3389/fphar.2021.785851
- Magenau J., Runaas L., Reddy P. Advances in understanding the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2016;173(2):190-205. doi 10.1111/bjh.13959
- Maliszewska-Olejniczak K., Brodaczewski K.K., Bielecka Z.F., Solarek W., Kornakiewicz A., Szczylik C., Porta C., Czarnecka A.M. Development of extracellular matrix supported 3D culture of renal cancer cells and renal cancer stem cells. *Cytotechnology*. 2019;71(1):149-163. doi 10.1007/s10616-018-0273-x
- Martins C., Pacheco C., Moreira-Barbosa C., Marques-Magalhães Â., Dias S., Araújo M., Oliveira M.J., Sarmiento B. Glioblastoma immuno-endothelial multicellular microtissue as a 3D *in vitro* evaluation tool of anti-cancer nano-therapeutics. *J Control Release*. 2023;353:77-95. doi 10.1016/j.jconrel.2022.11.024
- Maulana T.I., Teufel C., Cipriano M., Roos J., Lazarevski L., van den Hil F.E., Scheller L., Orlova V., Koch A., Hudecek M., Alb M., Loskill P. Breast cancer-on-chip for patient-specific efficacy and safety testing of CAR-T cells. *Cell Stem Cell*. 2024;31(7):989-1002.e9. doi 10.1016/j.stem.2024.04.018. Epub 2024 May 15. PMID 38754430
- Mesci P., de Souza J.S., Martin-Sancho L., Macia A., Saleh A., Yin X., Snethlage C., Adams J.W., Avansini S.H., Herai R.H., Almenar-Queralt A., Pu Y., Szeto R.A., Goldberg G., Bruck P.T., Papes F., Chanda S.K., Muotri A.R. SARS-CoV-2 infects human brain organoids causing cell death and loss of synapses that can be rescued by treatment with Sofosbuvir. *PLoS Biol*. 2022;20(11):e3001845. doi 10.1371/journal.pbio.3001845
- Miao X., Wang C., Chai C., Tang H., Hu J., Zhao Z., Luo W., Zhang H., Zhu K., Zhou W., Xu H. Establishment of gastric cancer organoid and its application in individualized therapy. *Oncol Lett*. 2022;24(6):447. doi 10.3892/ol.2022.13567
- Moradi-Mehr S., Khademy M., Akbari-Birgani S., Kafian H., Lalenejad M., Abdollahpour D., Moghimi M. Comparative evaluation of the therapeutic strategies using a minimal model of luminal-A breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2023;666:107-114. doi 10.1016/j.bbrc.2023.05.028
- Moscona A. Development of heterotypic combinations of dissociated embryonic chick cells. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1956;92(2):410-416. doi 10.3181/00379727-92-22495
- Nair A.L., Mesch L., Schulz I., Becker H., Raible J., Kiessling H., Werner S., Rothbauer U., Schmees C., Busche M., Trennheuser S., Fricker G., Stelzle M. Parallelizable microfluidic platform to model and assess *in vitro* cellular barriers: technology and application to study the interaction of 3D tumor spheroids with cellular barriers. *Biosensors*. 2021;11(9):314. doi 10.3390/bios11090314
- Neal J.T., Li X., Zhu J., Giangarra V., Grzeskowiak C.L., Ju J., Liu I.H., Chiou S.H., Salahudeen A.A., Smith A.R., Deutsch B.C., Liao L., Zemek A.J., Zhao F., Karlsson K., Schultz L.M., Metzner T.J., Nadauld L.D., Tseng Y.Y., Alkhairey S., Oh C., Keskula P., Mendoza-Villanueva D., De La Vega F.M., Kunz P.L., Liao J.C., Leppert J.T., Sunwoo J.B., Sabatti C., Boehm J.S., Hahn W.C., Zheng G.X.Y., Davis M.M., Kuo C.J. Organoid modeling of the tumor immune resource organoid modeling of the tumor immune microenvironment. *Cell*. 2018;175(7):1972-1988.e16. doi 10.1016/j.cell.2018.11.021
- Nguyen M., De Ninno A., Mencattini A., Mermet-Meillon F., Fornabaio G., Evans S.S., Cossutta M., Khira Y., Han W., Sirven P., Pelon F., Di Giuseppe D., Bertani F.R., Gerardino A., Yamada A., Descroix S., Soumelis V., Mechta-Grigoriou F., Zalzman G., Camonis J., Martinelli E., Businaro L., Parrini M.C. Dissecting effects of anti-cancer drugs and cancer-associated fibroblasts by on-chip reconstitution of immunocompetent tumor microenvironments. *Cell Rep*. 2018;25(13):3884-3893. doi 10.1016/j.celrep.2018.12.015
- Nguyen O.P., Misun P.M., Lohasz C., Lee J., Wang W., Schroeder T., Hierlemann A. An immunocompetent microphysiological system to simultaneously investigate effects of anti-tumor natural killer cells on tumor and cardiac microtissues. *Front Immunol*. 2021;12:781337. doi 10.3389/fimmu.2021.781337
- Nikonorova V.G., Chrishtop V.V., Mironov V.A., Prilepskii A.Y. Advantages and potential benefits of using organoids in nanotoxicology. *Cells*. 2023;12(4):610. doi 10.3390/cells12040610
- Ninomiya K., Taniuchi T. Assembly of a tumor microtissue by stacking normal and cancer spheroids on Kenzan using a bio-3D printer to monitor dynamic cancer cell invasion in the microtissue. *Biochem Eng J*. 2024;212:109536. doi 10.1016/j.bej.2024.109536
- Noorintan S.T., Angelius C., Torizal F.G. Organoid models in cancer immunotherapy: bioengineering approach for personalized treatment. *Immuno*. 2024;4(4):312-324. doi 10.3390/immuno4040020
- Nushtaeva A.A., Savinkova M.M., Ermakov M.S., Varlamov M.E., Novak D.D., Richter V.A., Koval O.A. Breast cancer cells in 3D model alters their sensitivity to hormonal and growth factors. *Cell Tissue Biol*. 2022;16(6):555-567. doi 10.1134/S1990519X22060050
- Paşca S.P., Arlotta P., Bateup H.S., Camp J.G., Cappello S., Gage F.H., Knoblich J.A., Kriegstein A.R., Lancaster M.A., Ming G.L., Muotri A.R., Park I.H., Reiner O., Song H., Studer L., Temple S., Testa G., Treutlein B., Vaccarino F.M. A nomenclature consensus for nervous system organoids and assembloids. *Nature*. 2022;609(7929):907-910. doi 10.1038/s41586-022-05219-6
- Petersen O.W., Rønnow-Jessen L., Howlett A.R., Bissell M.J. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89(19):9064-9068. doi 10.1073/pnas.89.19.9064
- Ponti D., Costa A., Zaffaroni N., Pratesi G., Petrangolini G., Coradini D., Pilotti S., Pierotti M.A., Daidone M.G. Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*. 2005;65(13):5506-5511. doi 10.1158/0008-5472.CAN-05-0626
- Ravi M., Kaviya S.R., Paramesh V. Culture phases, cytotoxicity and protein expressions of agarose hydrogel induced Sp2/0, A549, MCF-7 cell line 3D cultures. *Cytotechnology*. 2016;68(3):429-441. doi 10.1007/s10616-014-9795-z
- Rheinwald J.G., Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinized colonies from single cell is. *Cell*. 1975;6(3):331-343. doi 10.1016/S0092-8674(75)80001-8
- Rodrigues D.B., Reis R.L., Pirraco R.P. Modelling the complex nature of the tumor microenvironment: 3D tumor spheroids as an evolving tool. *J Biomed Sci*. 2024;31(1):13. doi 10.1186/s12929-024-00997-9
- Sadovska L., Zandberga E., Sagini K., Jekabsons K., Riekstina U., Kalniņa Z., Llorente A., Linē A. A novel 3D heterotypic spheroid model for studying extracellular vesicle-mediated tumour and immune cell communication. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;495(2):1930-1935. doi 10.1016/j.bbrc.2017.12.072
- Sakalem M.E., De Sibio M.T., da Costa F.A.D.S., de Oliveira M. Historical evolution of spheroids and organoids, and possibilities of use in life sciences and medicine. *Biotechnol J*. 2021;16(5):e2000463. doi 10.1002/biot.202000463

- Schnalzger T.E., De Groot M.H.P., Zhang C., Mosa M.H., Michels B.E., Röder J., Darvishi T., Wels W.S. 3D model for CAR-mediated cytotoxicity using patient-derived colorectal cancer organoids. *EMBO J.* 2019;38(12):e100928. doi 10.15252/embj.2018100928
- Schot M., Araújo-Gomes N., Van Loo B., Kamperman T., Leijten J. Scalable fabrication, compartmentalization and applications of living microtissues. *Bioact Mater.* 2023;19:392-405. doi 10.1016/j.bioactmat.2022.04.005
- Shamir E.R., Ewald A.J. Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(10):647-664. doi 10.1038/nrm3873
- Simian M., Bissell M.J. Organoids: a historical perspective of thinking in three dimensions. *J Cell Biol.* 2017;216(1):31-40. doi 10.1083/jcb.201610056
- Singh D., Mathur A., Arora S., Roy S., Mahindroo N. Applied surface science advances journey of organ on a chip technology and its role in future healthcare scenario. *Appl Surf Sci Adv.* 2022;9:100246. doi 10.1016/j.apsadv.2022.100246
- Sulaiman S., Chowdhury S.R., Fauzi M.B., Rani R.A., Mohamadyahaya N.H., Tabata Y., Hiraoka Y., Idrus R.B.H., Hwei N.M. 3D culture of MSCs on a gelatin microsphere in a dynamic culture system enhances chondrogenesis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8):2688. doi 10.3390/ijms21082688
- Sun M., Liu A., Yang X., Gong J., Yu M., Yao X., Wang H., He Y. 3D cell culture – can it be as popular as 2D cell culture? *Adv Nano-Biomed Res.* 2021;1(5):2000066. doi 10.1002/anbr.202000066
- Sutherland R.M. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science.* 1988;240(4849):177-184. doi 10.1126/science.2451290
- Tanaka Y., Nishikawa M., Mizukami Y., Kusamori K., Ogino Y., Nishimura S., Shimizu K., Konishi S., Takahashi Y., Takakura Y. Control of polarization and tumoricidal activity of macrophages by multicellular spheroid formation. *J Control Release.* 2018;270:177-183. doi 10.1016/j.jconrel.2017.12.006
- Troitskaya O., Novak D., Nushtaeva A., Savinkova M., Varlamov M., Ermakov M., Richter V., Koval O. EGFR transgene stimulates spontaneous formation of MCF7 breast cancer cells spheroids with partly loss of HER3 receptor. *Int J Mol Sci.* 2021;22(23):12937. doi 10.3390/ijms222312937
- Valent P., Bonnet D., De Maria R., Lapidot T., Copland M., Melo J.V., Chomienne C., Ishikawa F., Schuringa J.J., Stassi G., Huntly B., Herrmann H., Soulier J., Roesch A., Schuurhuis G.J., Wöhrer S., Arock M., Zuber J., Cerny-Reiterer S., Johnsen H.E., Andreeff M., Eaves C. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(11):767-775. doi 10.1038/nrc3368
- Vasileva N.S., Kuligina E.V., Dymova M.A., Savinovskaya Y.I., Zinchenko N.D., Ageenko A.B., Mishinov S.V., Dome A.S., Stepanov G.A., Richter V.A., Semenov D.V. Transcriptome changes in glioma cells cultivated under conditions of neurosphere formation. *Cells.* 2022;11(19):3106. doi 10.3390/cells11193106
- Veith I., Nurmik M., Mencattini A., Damei I., Lansche C., Brosseau S., Gropplero G., Corgnac S., Filippi J., Poté N., Guenzi E., Chassac A., Mordant P., Tosello J., Sedlik C., Piaggio E., Girard N., Camonis J., Shirvani H., Mami-Chouaib F., Mehta-Grigoriou F., Descroix S., Martinelli E., Zalcman G., Parrini M.C. Assessing personalized responses to anti-PD-1 treatment using patient-derived lung tumor-on-chip. *Cell Rep Med.* 2024;5(5):101549. doi 10.1016/j.xcrm.2024.101549
- Verjans E.T., Doijen J., Luyten W., Landuyt B., Schoofs L. Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: worth the effort? *J Cell Physiol.* 2018;233(4):2993-3003. doi 10.1002/jcp.26052
- Waldhauer I., Morra L., Lehmann S., Agarkova I., Zumstein P., Kelm J.M., Umana P., Klein C., Bacac M. Abstract LB-264: development of 3D microtissue models to study the activity of novel tumor-targeted immunotherapeutics. *Cancer Res.* 2013;73(8_Supplement):LB-264. doi 10.1158/1538-7445.AM2013-LB-264
- Wang O., Han L., Lin H., Tian M., Zhang S., Duan B., Chung S., Zhang C., Lian X., Wang Y., Lei Y. Fabricating 3-dimensional human brown adipose microtissues for transplantation studies. *Bioact Mater.* 2023;22:518-534. doi 10.1016/j.bioactmat.2022.10.022
- Wang Y., Kankala R.K., Zhang J., Hao L., Zhu K., Wang S., Zhang Y.S., Chen A. Modeling endothelialized hepatic tumor microtissues for drug screening. *Adv Sci.* 2020;7(21):2002002. doi 10.1002/adv.202002002
- Wei W., Cardes F., Hierlemann A., Modena M.M. 3D *in vitro* blood-brain-barrier model for investigating barrier insults. *Adv Sci.* 2023;10(11):e2205752. doi 10.1002/adv.202205752
- Weiswald L.B., Bellet D., Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia.* 2015;17(1):1-15. doi 10.1016/j.neo.2014.12.004
- Wolter J.R. Proliferating pigment epithelium: producing a simple organoid structure in the subretinal space of a human eye. *Arch Ophthalmol.* 1967;77(5):651-654. doi 10.1001/archophth.1967.00980020653016
- Zhang J., Li C., Meng F., Guan Y., Zhang T., Yang B., Ren Z., Liu X., Li D., Zhao J., Zhao J., Wang Y., Peng J. Functional tissue-engineered microtissue formed by self-aggregation of cells for peripheral nerve regeneration. *Stem Cell Res Ther.* 2022;13(1):3. doi 10.1186/s13287-021-02676-0
- Zhou Z., Van der Jeught K., Fang Y., Yu T., Li Y., Ao Z., Liu S., Zhang L., Yang Y., Eyvani H., Cox M.L., Wang X., He X., Ji G., Schneider B.P., Guo F., Wan J., Zhang X., Lu X. An organoid-based screen for epigenetic inhibitors that stimulate antigen presentation and potentiate T-cell-mediated cytotoxicity. *Nat Biomed Eng.* 2021;5(11):1320-1335. doi 10.1038/s41551-021-00805-x

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 02.11.2024. После доработки 28.11.2024. Принята к публикации 28.11.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-22

Изогенная линия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток ICGi036-A-1 от пациента с семейной гиперхолестеринемией, созданная путем коррекции патогенного варианта гена *LDLR* с.530C>T

А.С. Зуева ^{1,2}, А.И. Шевченко ¹, С.П. Медведев ¹, Е.А. Елисафенко ¹, А.А. Слепцов ^{1,3}, М.С. Назаренко ^{1,3},
Н.А. Тмоян ^{1,4}, С.М. Закиян ¹, И.С. Захарова ¹ 

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

⁴ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

 zakharova@bionet.nsc.ru

Аннотация. Семейная гиперхолестеринемия является распространенным моногенным заболеванием, которое характеризуется повышенным содержанием холестерина в плазме крови, приводящим к хроническим заболеваниям сердечно-сосудистой системы с высоким риском и ранним проявлением развития патологий, вызванных атеросклеротическими поражениями кровеносных сосудов. Образование атеросклеротических бляшек при семейной гиперхолестеринемии в основном обусловлено патогенными вариантами гена рецептора липопротеинов низкой плотности *LDLR* (low-density lipoprotein receptor), играющего важную роль в метаболизме холестерина. В норме липопротеины низкой плотности, переносящие холестерин, связываются с рецептором *LDLR* на поверхности клеток печени и выводятся из кровотока путем интернализации гепатоцитами. При семейной гиперхолестеринемии происходит нарушение функционирования рецептора и значительное снижение интернализации липопротеинов низкой плотности. Это приводит к их накоплению в субэндотелиальном пространстве внутренней стенки кровеносных сосудов и вызывает атерогенез – образование атеросклеротических бляшек. На сегодняшний день не существует эффективных и универсальных подходов к диагностике и лечению семейной гиперхолестеринемии. Актуальным подходом для исследования молекулярно-генетических особенностей заболевания и разработки систем скрининга химических соединений – потенциальных лекарственных препаратов – является создание клеточных моделей на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) пациентов. Целью нашей работы было создание изогенной генетически модифицированной линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток путем коррекции патогенного аллельного варианта с.530C гена *LDLR* в линии ИПСК, полученной ранее от пациента-компаундной гетерозиготы с семейной гиперхолестеринемией. Созданная изогенная клеточная линия ИПСК отличается от исходной только одной скорректированной нуклеотидной заменой, что позволяет исследовать непосредственное влияние данного патогенного генетического варианта на физиологические изменения в релевантных дифференцированных клетках. Для коррекции однонуклеотидных замен использован CRISPR/Cas9-опосредованный метод редактирования оснований. Полученная генетически модифицированная линия ИПСК обладает свойствами плюрипотентности, имеет нормальный кариотип, идентичный исходной линии набор коротких tandemных повторов и может быть использована для формирования дифференцированных производных, необходимых при разработке релевантных клеточных моделей.

Ключевые слова: семейная гиперхолестеринемия; *LDLR*; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; геномное редактирование; изогенные линии клеток

Для цитирования: Зуева А.С., Шевченко А.И., Медведев С.П., Елисафенко Е.А., Слепцов А.А., Назаренко М.С., Тмоян Н.А., Закиян С.М., Захарова И.С. Изогенная линия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток ICGi036-A-1 от пациента с семейной гиперхолестеринемией, созданная путем коррекции патогенного варианта гена *LDLR* с.530C>T. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(2):189-199. doi 10.18699/vjgb-25-22

Финансирование. Работа поддержана грантом РФФИ № 24-15-00346, <https://rscf.ru/project/24-15-00346/>.

Благодарности. Микроскопические исследования выполнены в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦИГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/ckpmabo/>), поддержанном бюджетным проектом Института цитологии и генетики СО РАН FWNR-2022-0015.

Isogenic induced pluripotent stem cell line ICGi036-A-1 from a patient with familial hypercholesterolaemia, derived by correcting a pathogenic variant of the gene *LDLR* c.530C>T

A.S. Zueva ^{1,2}, A.I. Shevchenko ¹, S.P. Medvedev ¹, E.A. Elisaphenko ¹, A.A. Sleptcov ^{1,3}, M.S. Nazarenko ^{1,3},
N.A. Tmoyan ^{1,4}, S.M. Zakian ¹, I.S. Zakharova ¹ 

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

⁴ National Medical Research Center of Cardiology named after academician E.I. Chazov, Moscow, Russia

 zakharova@bionet.nsc.ru

Abstract. Familial hypercholesterolaemia is a common monogenic disorder characterized by high plasma cholesterol levels leading to chronic cardiovascular disease with high risk and often early manifestation due to atherosclerotic lesions of the blood vessels. The atherosclerotic lesions in familial hypercholesterolaemia are mainly caused by pathogenic variants of the low-density lipoprotein receptor (*LDLR*) gene, which plays an important role in cholesterol metabolism. Normally, cholesterol-laden low-density lipoproteins bind to the LDLR receptor on the surface of liver cells to be removed from the bloodstream by internalisation with hepatocytes. In familial hypercholesterolaemia, the function of the receptor is impaired and the uptake of low-density lipoproteins is significantly reduced. As a result, cholesterol accumulates in the subendothelial space on the inner wall of blood vessels, triggering atherogenesis, the formation of atherosclerotic plaques. At present, there are no effective and universal approaches to the diagnosis and treatment of familial hypercholesterolaemia. A relevant approach to study the molecular genetic mechanisms of the disease and to obtain systems for screening chemical compounds as potential drugs is the generation of cellular models based on patient-specific induced pluripotent stem cells. The aim of our work was to derive an isogenic genetically modified induced pluripotent stem cell line by correcting the pathogenic allelic variant c.530C of the *LDLR* gene in the original iPSC previously obtained from a compound heterozygote patient with familial hypercholesterolaemia. The resulting isogenic iPSC line differs from the original by only one corrected nucleotide substitution, allowing us to study the direct effect of this pathogenic genetic variant on physiological changes in relevant differentiated cells. CRISPR/Cas-mediated base editing was used to correct the single nucleotide substitution. The resulting genetically modified iPSC line has pluripotency traits, a normal karyotype, a set of short tandem repeats identical to that in the original line and can be used to obtain differentiated derivatives necessary for the elaboration of relevant cell models.

Key words: familial hypercholesterolaemia; *LDLR*; induced pluripotent stem cells; genome editing; isogenic cell lines

For citation: Zueva A.S., Shevchenko A.I., Medvedev S.P., Elisaphenko E.A., Sleptcov A.A., Nazarenko M.S., Tmoyan N.A., Zakian S.M., Zakharova I.S. Isogenic induced pluripotent stem cell line ICGi036-A-1 from a patient with familial hypercholesterolaemia, derived by correcting a pathogenic variant of the gene *LDLR* c.530C>T. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(2):189-199. doi 10.18699/vjgb-25-22

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения, несмотря на развитие медицинских методов и революционные открытия в области биологии, сердечно-сосудистые заболевания, в большинстве случаев вызванные атеросклеротическими поражениями, остаются ведущей причиной смерти людей во всем мире.

Одним из самых распространенных наследственных заболеваний, приводящих к атеросклерозу, является семейная гиперхолестеринемия (СГХС) (Захарова и др., 2024). Это заболевание, согласно данным Европейского общества атеросклероза, имеет высокую частоту встречаемости: один случай на 250 человек для гетерозиготной формы, один на 300 тыс.–один на 1 млн человек – для гомозиготной (Ежов и др., 2019). Тем не менее течение этого заболевания может быть латентным с затрудненной диагностикой и проявляться острыми сосудистыми катастрофами в виде инфарктов, инсультов и других ишемических поражений, нередко приводящих к летальному исходу (Hopkins et al., 2011; Talmud et al., 2014; Ference et al., 2017). В настоящее время до 70 % предполагаемых

гетерозиготных носителей остаются не диагностированными¹ (Ray et al., 2023).

Семейная гиперхолестеринемия характеризуется ауто-сомно-доминантным типом наследования, что связано с повышенным уровнем холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и высоким риском ранних сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) (Harada-Shiba, 2023). СГХС может проявляться в виде гетеро- и гомозиготной форм. Пациенты с гомозиготной формой данного заболевания обычно демонстрируют раннюю манифестацию ССЗ, и без применения серьезной комплексной терапии продолжительность их жизни не превышает 30 лет (Hopkins et al., 2011). Причиной СГХС являются патогенные аллельные варианты генов, кодирующих ключевые белки, участвующие в клиренсе ЛПНП, опосредованном рецептором липопротеинов низкой плотности LDLR (low-

¹ Информационный портал для больных семейной гиперхолестеринемией <https://familyheart.org/familial-hypercholesterolemia>; информационный портал биотехнологической компании по генетическому тестированию «23andMe» https://www.23andme.com/topics/health-predispositions/fh/?srsltid=AfmBOooDFqM2Usz3G0j9PZg-ng-15q_dvPbcQL6qgCzJ0QodQhslil7

density lipoprotein receptor) (Gu et al., 2024). В 85 % диагностированных случаев данного заболевания патологические состояния обусловлены нарушением в работе гена *LDLR*, кодирующего рецептор липопротеинов низкой плотности на поверхности гепатоцитов (Hendricks-Sturup et al., 2020). Наличие СГХС у пациента редко связано с *de novo* возникшими патогенными аллельными вариантами (Fularski et al., 2024). По этой причине важное значение имеют каскадный генетический скрининг родственников и профилактика атеросклероза у выявленных носителей.

Несмотря на широкую распространенность СГХС, не существует эффективных подходов к лечению. По данным Европейского общества атеросклероза, опубликованным в 2022 г., менее 3 % пациентов в мире достигают целевых показателей по снижению уровня холестерина с помощью применяемых препаратов (Ray et al., 2022; Harada-Shiba, 2023). Отсутствие эффективного лечения связано с нерелевантностью моделей, которые используются как для испытания лекарственных средств, так и для изучения патогенеза заболевания.

Перспективным подходом для исследования молекулярно-генетических основ заболевания является создание изогенных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) от пациентов с СГХС. Ранее мы получили линию ИПСК ICGi036-A от пациента-компаундной гетерозиготы с семейной гиперхолестеринемией. Линия зарегистрирована в Европейском реестре плюрипотентных стволовых клеток hPSCreg с идентификатором RRID:CVCL_B5EJ (Zakharova et al., 2022a). Исходная линия ИПСК ICGi036-A содержит два аллельных варианта гена *LDLR*, представляющих собой миссенс-мутации: с.530C>T (p.Ser177Leu) и с.1054T>C (p.Cys352Arg).

Замена с.530C>T, rs121908026 (p.Ser177Leu) расположена в экзоне 4 гена *LDLR* (Semenova et al., 2020; Meshkov et al., 2021). Данная миссенс-мутация приводит к замене серина на лейцин в кодоне 177 в высококонсервативной последовательности SerAspGlu в лиганд-связывающем домене LDLR (Südhof et al., 1985). Эта замена замедляет транспорт белка LDLR на поверхность клетки, вследствие чего дефектные рецепторы не способны связывать ЛПНП, переносящие холестерин, что приводит к снижению захвата ЛПНП примерно до 6–31 % (Thormachlen et al., 2015). В базах данных аллельный вариант *LDLR*(NM_000527.5):с.530C>T обозначен как патогенный, вызывающий СГХС (ClinVar ID 3686; OMIM:606945.0004; UniProt variants VAR_005327; VarSome <http://varso.me/1dmA>).

Замена с.1054T>C, rs879254769 (p.Cys352Arg) локализована в экзоне 7 гена *LDLR* и кодирует цистеин вместо аргинина в кодоне 352 в домене, подобном эпидермальному фактору роста (Semenova et al., 2020; Meshkov et al., 2021). Аллельный вариант *LDLR*(NM_000527.5):с.1054T>A упоминается в базах как патогенный/вероятно патогенный, вызывающий СГХС (ClinVar ID 251618; VarSome <http://varso.me/0J8J>).

Существуют данные, что аллельные варианты с.530C>T и с.1054T>C *LDLR* могут вызывать СГХС независимо. Например, гетерозиготная замена с.530C>T в гене *LDLR* связана с СГХС в разных странах, таких как Индия, Португалия, Испания, Польша и Чешская Республика

(Bourbon et al., 2008; Palacios et al., 2012; Tichý et al., 2012; Setia et al., 2016; Sharifi et al., 2016). Кроме того, этот аллельный вариант в компаундном гетерозиготном варианте с EX7_EX10del (с.941-?_1186+?del) гена *LDLR* зарегистрирован в Бразилии и в сочетании с с.55G>C (p.Asp19His) гена *ABCG8* – у пациентов с СГХС в Малайзии (Jannes et al., 2015; Mohd Nor et al., 2019).

Аллельный вариант с.1054T>C в гетерозиготном состоянии обнаружен у пациентов с СГХС на Тайване и в России, а в компаундном гетерозиготном варианте с.796G>A (p.Asp266Asn) – у пациента с СГХС в Западной Сибири (Meshkov et al., 2021; Shakhshneider et al., 2021; Huang et al., 2022). Также в одной из наших предыдущих работ подтверждено транс-положение между аллельными вариантами с.530C>T и с.1054T>C в ИПСК ICGi036-A (Nazarenko et al., 2023).

В настоящей работе мы описываем получение и детальную характеристику генетически модифицированной линии ИПСК ICGi036-A-1, изогенной линии ICGi036-A от пациента с СГХС, являющегося компаундной гетерозиготой по патогенному с.530C>T (p.Ser177Leu) и вероятно патогенному с.1054T>C (p.Cys352Arg) аллельным вариантам гена *LDLR*, с использованием метода редактирования оснований. Линия ИПСК со скорректированным аллельным вариантом с.530C>T (p.Ser177Leu) представляет собой модель, на основе которой могут быть получены релевантные клеточные типы для исследования СГХС и создания подходов для разработки лекарственных препаратов для данного заболевания.

Материалы и методы

Клеточные линии. В настоящей работе использованы следующие линии ИПСК человека:

- ICGi036-A (идентификатор в hPSCreg: RRID:CVCL_B5EJ) от пациента-компаундной гетерозиготы с СГХС с двумя аллельными вариантами гена *LDLR*: патогенным с.530C>T (p.Ser177Leu), rs121908026, ClinVar ID 3686, OMIM:606945.0004 и вероятно патогенным с.1054T>C (p.Cys352Arg), rs879254769, ClinVar ID 251618, полученная нами ранее (Zakharova et al., 2022a), – исходная линия ИПСК для создания изогенной генетически модифицированной линии ИПСК;
- ICGi022-A (идентификатор в hPSCreg: RRID:CVCL_ZE02) (Malakhova et al., 2020) – линия ИПСК от здорового донора для контроля маркеров плюрипотентности;
- эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) HuES9 (HVRDe009-A) (идентификатор в hPSCreg: RRID:CVCL_0057) (Cowan et al., 2004) – линия ЭСК от здорового донора для контроля маркеров плюрипотентности.

Культивирование ИПСК и ЭСК. ИПСК и ЭСК культивировали в ростовой среде DMEM/F12, содержащей 15 % заменителя сыворотки KnockOut SR (Thermo Fisher Scientific), 1 мМ глутамина GlutaMax (Thermo Fisher Scientific), 1 % раствора заменимых аминокислот NEAA (Thermo Fisher Scientific), 0.25 мМ 2-меркаптоэтанол (Thermo Fisher Scientific) и 10 нг/мл bFGF (Sci-store). Клетки росли на слое митогически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши. Культивирование ИПСК

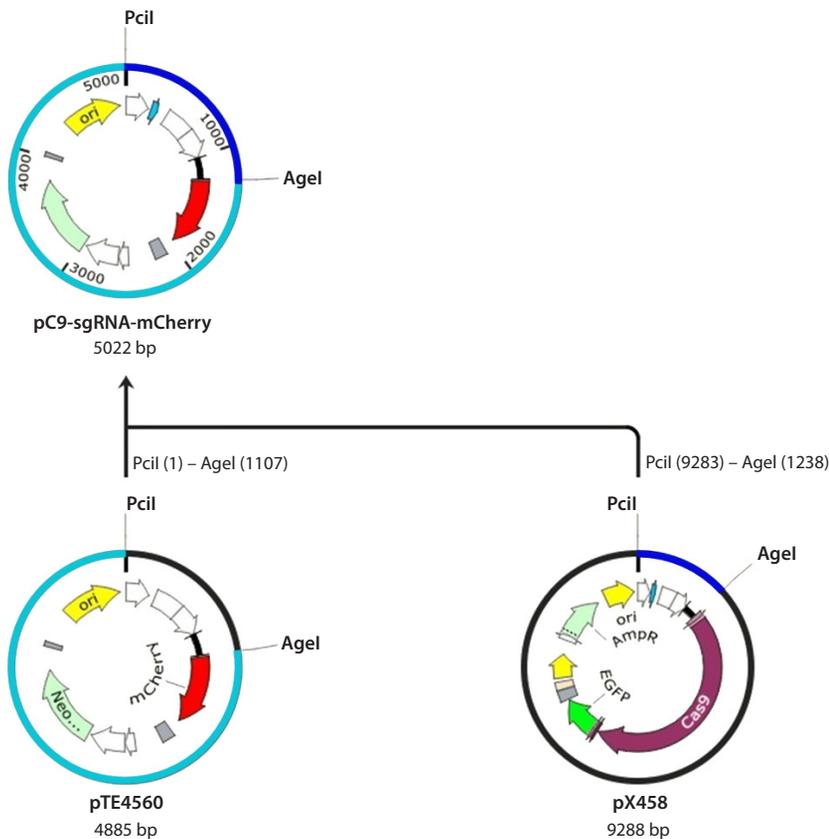


Рис. 1. Схема создания плазмиды pC9-sgRNA-mCherry из плазмид pTE4560 и pX458 в программе SnapGene.

производили в инкубаторе при температуре 37 °C и содержании CO₂ 5%. Пересадку колоний ИПСК и ЭСК осуществляли путем ферментативной дезагрегации с помощью TrypLE (Thermo Fisher Scientific) с добавлением 2 мкМ ROCK-ингибитора тиазовивина (STEMCELL Technologies).

Векторы для генетической коррекции ИПСК. Для встраивания последовательности спейсера направляющей РНК мы создали универсальную плазмиду pC9-sgRNA-mCherry (рис. 1), доставку которой в клетки можно детектировать по флуоресцентному сигналу mCherry.

Для этого были проведены гидролиз эндонуклеазами *PciI* и *AciGI* (SibEnzyme) и последующее объединение при помощи ДНК-лигазы фага Т4 целевых фрагментов ДНК: короткого фрагмента размером 1244 п. н., содержащего последовательность промотора U6 и сайта для клонирования спейсера из плазмиды pX458 (addgene #48138), и длинного фрагмента

размером 3778 п. н., кодирующего ген устойчивости к антибиотику канамицину и последовательность флуоресцентного белка mCherry из плазмиды pTE4560 (addgene #107526). Финальная конструкция плазмиды pC9-sgRNA-mCherry подтверждена рестрикционным анализом и секвенированием по Сэнгеру в Центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/sequest>).

Выбор олигонуклеотидов для направляющих РНК производили с помощью PnB Designer (<https://fgcz-shiny.uzh.ch/PnBDesigner/>) (Siegener et al., 2021).

На 5'-конец выбранных олигонуклеотидов добавляли нуклеотид G, после чего генерировали комплементарную олигонуклеотидную последовательность. Далее на 5'-конец добавляли последовательность 5'-CACC-3', на 5'-конец комплементарной олигонуклеотидной последовательности – 5'-AAAC-3' для последующего встраивания в вектор pC9-sgRNA-mCherry по сайтам рестрикции эндонуклеазы *BpiI* (см. таблицу). Экспрессия направляющей РНК с промотора U6 усиливается при добавлении нуклеотида G сразу после последовательности 5'-CACC-3' перед последовательностью спейсера (Baueer et al., 2015).

Синтез олигонуклеотидов осуществляли в компании «Биоссет» (<https://www.biosset.com/>). Одноцепочечные олигонуклеотиды подвергались фосфорилированию 5'-концов с помощью полинуклеотидкиназы фага Т4 (New England Biolabs) и отжигу для формирования двуцепочечных молекул. Полученные двуцепочечные молекулы с липкими концами встраивали в сайты для спейсеров направляющих РНК предварительно линейаризованной эндонуклеазой *BpiI* плазмиды pC9-sgRNA-mCherry

Последовательности олигонуклеотидов для конструирования направляющих РНК, модифицированных для клонирования в плазмидный вектор

Номер п/п	Название	5'–3' последовательность	Длина, п. н.	PAM
1	c.530C>T_1	cacc GATCCAAGCCATCTTCG CAGT	25	CGG
2	c.530C>T_1r	aaacACTGCGAAGATGGCTTGGAT C	25	CGG
3	c.1054T>C_2	cacc GAAGATGCGAAGGTGAT TTCC	25	GGG
4	c.1054T>C_2r	aaacGGAAATCACCTTCGATCT T C	25	GGG

Примечание. Прописными буквами обозначены олигонуклеотиды для направляющих РНК, подобранные с помощью PnB Designer (<https://fgcz-shiny.uzh.ch/PnBDesigner/>) (Siegener et al., 2021), жирным шрифтом – нуклеотиды, добавленные для повышения уровня экспрессии с промотора U6, строчными буквами – добавленные «липкие концы», буквой “r” – сгенерированные комплементарные олигонуклеотидные последовательности.

с помощью лигазы фага T4. Подтверждение того, что полученные плазмиды содержат встроенные целевые последовательности, производилось секвенированием по Сэнгеру.

Для коррекции целевых однонуклеотидных замен в работе использованы две двухкомпонентные системы плазмид. Система 1 для коррекции замены с.530С>Т состоит из плазмидного вектора хCas9(3.7)-ABE(7.10) (addgene #108382), кодирующего аденин-дезаминазу и никазу хCas9n (редактор адениновых оснований), и плазмиды рC9-sgRNA-mCherry со встроенной последовательностью спейсера направляющей РНК. Система 2 для коррекции замены с.1054Т>С состоит из плазмидного вектора хCas9(3.7)-BE4 (addgene #108381), кодирующего цитозин-дезаминазу, никазу хCas9n (редактор цитидиновых оснований), и плазмиды рC9-sgRNA-mCherry со встроенной последовательностью спейсера направляющей РНК.

Выделение плазмидной ДНК для последующей липофекции осуществляли с помощью набора HiPure Plasmid EF Midi Kit (Magen).

Доставка векторов для коррекции замен с.530С>Т и с.1054Т>С последовательности гена *LDLR*. Доставку плазмид, кодирующих последовательности редакторов оснований и спейсеров направляющих РНК, в ИПСК осуществляли методом липофекции с помощью набора Lipofectamine 3000 Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific) по протоколу производителя, с модификациями. За 24 ч до липофекции ИПСК, культивируемые на подложке из митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши, пересаживали на 3 лунки 12-луночного планшета, покрытые матриксом Matrigel (Corning), в среду с 15 % содержанием заменителя сыворотки koSR (Thermo Fisher Scientific) и 2 мкМ ROCK-ингибитором тиазовивинном (STEMCELL Technologies). Для увеличения эффективности предстоящей липофекции ИПСК во время пересадки дезагрегировали до одноклеточного состояния с помощью TrypLE. Через 4–5 ч после пересадки, проконтролировав, что клетки прикрепились к культуральной поверхности, проводили смену среды на бессывороточную, содержащую тиазовивин, с увеличенным в три раза содержанием bFGF (30 нг/мл). За 2 ч до липофекции производили смену среды на эквивалентную свежую, без тиазовивина.

Непосредственно липофекцию проводили в среде без koSR, без тиазовивина, с 30 нг/мл bFGF. Соотношение количества ДНК (в нг) плазмид-редакторов и плазмид с последовательностями направляющих РНК – 3:1. Перед липофекцией в пробирке 1 смешивали 150 мкл среды Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) и 9 мкл Lipofectamine 3000, в пробирке 2 – 150 мкл среды Opti-MEM, 6 мкл реагента Р 3000, по 125 нг ДНК плазмид рC9-1054_2-mCherry и рC9-530-mCherry, по 375 нг ДНК плазмид хCas9(3.7)-ABE(7.10) и хCas9(3.7)-BE4. Содержимое пробирок 1 и 2 смешивали, инкубировали 15 мин при комнатной температуре. 100 мкл смеси добавляли к 1×10^5 ИПСК, растущих в лунке 12-луночного планшета в 1 мл среды. Через 26 ч после липофекции убирали ростовую среду, добавляли свежую, содержащую 15 % koSR, 30 нг/мл bFGF и тиазовивин. Красный сигнал белка mCherry детектируется посредством инвертированного флуоресцент-

ного микроскопа Nikon TS100 в период с 24 по 48 ч после липофекции.

Отбор и субклонирование полученных клонов ИПСК. Через 48 ч после внесения системы редакторов оснований в ИПСК проводили отбор клонов методом проточной цитометрии по красному сигналу флуоресцентного белка mCherry на приборе Sony MA900. Полученную одноклеточную суспензию ИПСК высаживали на культуральные поверхности с митотически инактивированными эмбриональными фибробластами мыши для последующего субклонирования. Колонии ИПСК, образовавшиеся из отдельных отсортированных клеток, для индивидуального анализа снимали механическим способом, используя стеклянные капилляры, и переносили в отдельные ячейки культурального планшета с предварительно посаженными на них митотически инактивированными эмбриональными фибробластами мыши для культивирования и дальнейшего анализа.

Анализ результатов редактирования замен в последовательности гена *LDLR* в отобранных клонах ИПСК. Результаты коррекции замен с.530С>Т и с.1054Т>С последовательности гена *LDLR* в отобранных клонах ИПСК анализировали методом ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру. Геномную ДНК выделяли из ИПСК с помощью реагента QuickExtract DNA Extraction Solution (Lucigen) согласно инструкции производителя. ПЦР проводили с использованием набора БиоМастер HS-Taq PCR-Color (2×) (Biolabmix) на амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). Параметры программы: 98 °С – 30 с; 98 °С – 15 с, 60 °С – 15 с, 72 °С – 30 с, 35 циклов; 72 °С – 5 мин. Последовательности праймеров приведены в табл. S1 Приложения².

Синтез олигонуклеотидов осуществляли в компании «Биоссет» (<https://www.biosset.com/>). Реакции секвенирования по Сэнгеру выполняли с использованием Big Dye Terminator V. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) и анализировали в ЦКП «Геномика» СО РАН (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/sequest>) на генетическом анализаторе ABI3130XL.

Детекция микоплазмы и эписом. Выявление контаминации микоплазмой и эписомами проводили с помощью ПЦР, как описано ранее (Chopra et al., 1998; Okita et al., 2013). Последовательности праймеров приведены в табл. S1. Параметры программы для детекции эписом: 95 °С – 5 мин; 95 °С – 15 с, 58 °С – 15 с, 72 °С – 20 с, 35 циклов; 72 °С – 5 мин; для детекции микоплазмы: 95 °С – 3 мин; 95 °С – 15 с, 67 °С – 15 с, 72 °С – 20 с, 35 циклов; 72 °С – 5 мин.

Кариотипирование. Анализ кариотипа генетически модифицированных ИПСК проводили на 15-м пассаже по протоколу, описанному ранее, используя DAPI-бэндинг, согласно Международной системе цитогенетической номенклатуры человека (Григорьева и др., 2024).

STR-анализ. Анализ коротких tandemных повторов (STR) выполнен компанией «Геноаналитика» (<https://www.genoanalytica.ru>). Генотипирование исследуемых образцов ДНК осуществляли методом полимеразной цепной реакции с применением набора ПЦР реагентов для

² Таблицы S1–S4 см. по адресу:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx8.pdf>

прямой амплификации COrDIS ЭКСПЕРТ 26 (Россия) согласно протоколу фирмы-производителя, с последующим разделением продуктов амплификации на приборе для проведения капиллярного электрофореза 3130 Genetic Analyzer (HITACHI, Applied Biosystems Group of The Applied Corporation, Япония, США, регистр. удостоверение № ФСЗ 2004/1586). Электрофореграммы продуктов полимеразной цепной реакции можно получить по запросу у авторов.

Количественная ОТ-ПЦР. Для анализа экспрессии генов плюрипотентности РНК выделяли из клеток при помощи реагента Trizol (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя. Для обработки ДНКазой I использовали набор DNA-free (Thermo Fisher Scientific). Обратную транскрипцию РНК осуществляли с использованием набора с обратной транскриптазой M-MuLV (Биолабмикс) и гексамерных праймеров (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу производителя.

Методом ПЦР в режиме реального времени анализировали экспрессию генов плюрипотентности (*OCT4*, *NANOG*, *SOX2*) в генетически модифицированной и исходной изогенной линиях ИПСК с нормировкой на два гена домашнего хозяйства: *ACTB* и *B2M*. Последовательности праймеров приведены в табл. S1. Реакции проводили с использованием набора БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) (Biolabmix) на амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). Параметры программы: 98 °C – 30 с; 98 °C – 15 с, 60 °C – 15 с, 72 °C – 30 с, 35 циклов; 72 °C – 5 мин. Для каждого образца проанализированы три биологические и две технические повторности.

Результаты анализировали в программе qBase+ (CellCarta, <https://cellcarta.com/genomic-data-analysis/>) обобщенным методом $\Delta\Delta C_t$ с учетом эффективности реакции, рассчитанной по результатам построения калибровочной кривой по шести точкам.

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Подготовку клеток и окрашивание антителами выполняли по протоколу, описанному ранее (Vaskova et al., 2015). Клетки фиксировали в 4 % растворе формальдегида в течение 10 мин, затем пермеабелизовали 0.5 % раствором тритона X-100 в течение 30 мин (для поверхностных антигенов данную стадию пропускали) и блокировали 1 % раствором бычьего сывороточного альбумина в 1X PBS. Все процедуры осуществляли при комнатной температуре. Инкубацию с первичными антителами производили в течение ночи при 4 °C. Со вторичными антителами клетки инкубировали в темноте при комнатной температуре 1 ч. Ядра клеток окрашивали DAPI. Снимки препаратов визуализировали на инвертированном флуоресцентном микроскопе Ti-E (Nikon) с использованием программного обеспечения NIS Advanced Research. Список первичных и вторичных антител представлен в табл. S2.

Спонтанная дифференцировка *in vitro*. Для подтверждения сохранения свойств плюрипотентности генетически модифицированных ИПСК проводили спонтанную дифференцировку путем формирования эмбрионидных тел в течение 14 дней. Сформировавшиеся эмбрионидные тельца пересаживались на обработанные плашки Chambered Coverglass (Thermo Fisher Scientific) с матриксом (Corning) и культивировались до достижения 21 дня.

Результаты

В настоящей работе получена генетически модифицированная линия ИПСК ICGi036-A-1 со скорректированным патогенным аллельным вариантом с.530C>T гена *LDLR* от пациента-компаундной гетерозиготы, ассоциированной с СГХС. Для генетической коррекции данного патогенного варианта был использован метод редактирования оснований, для реализации которого сконструирован эписомный вектор pC9-sgRNA-mCherry, содержащий универсальный сайт для клонирования любых спейсеров направляющей РНК CRISPR/Cas-систем и последовательность гена красного флуоресцентного белка mCherry. Использование полученной плазмиды для доставки систем редактирования в клетку позволяет на ранних этапах (24–48 ч) визуализировать результаты трансфекции и, в случае успеха, проводить отбор клеток методом проточной цитометрии.

В полученный универсальный вектор встроены последовательности спейсеров направляющих РНК, выбранные в рамках данной работы. В результате созданы две плазмиды: pC9-530-mCherry – для коррекции патогенной замены с.530C>T гена *LDLR*, и pC9-1054_2-mCherry – для коррекции вероятно патогенной замены с.1054T>C. Полученные плазмиды вместе с плазмидами, кодирующими последовательности аденинового и цитозинового редакторов оснований, доставлены посредством липофекции в ИПСК линии ICGi036-A (Zakharova et al., 2022a). Через 24 и 48 ч в культуре трансфицированных ИПСК детектировались клетки, имеющие красное свечение белка mCherry, что свидетельствует об успешной доставке и функционировании плазмид, кодирующих последовательности спейсеров и флуоресцентного белка в результате липофекции (рис. 2, а).

В результате анализа 96 полученных субклонов методом секвенирования по Сэнгеру выявлен один субклон 130S5, в котором произошла коррекция позиции с.530C>T патогенного аллельного варианта гена *LDLR* до позиции с.530C, соответствующей референсной последовательности гена (см. рис. 2, в). Скорректировать замену с.1054T>C не удалось.

Анализ коротких tandemных повторов (STR) продемонстрировал соответствие полученной линии ИПСК ICGi036-A-1 исходной изогенной линии ICGi036-A и мононуклеарным клеткам пациента по 26 полиморфным локусам (Zakharova et al., 2022a) (табл. S3).

Для того чтобы подтвердить, что полученные генетически модифицированные ИПСК ICGi036-A-1 сохранили свойства самообновления и плюрипотентности, были проанализированы маркеры плюрипотентности и способность ИПСК образовывать производные трех зародышевых листков. В результате иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к транскрипционным факторам *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* и поверхностному антигену SSEA4 продемонстрировано, что все колонии ИПСК 130S5 позитивны по данным маркерам (см. рис. 2, з). Исследование относительной экспрессии генов плюрипотентности *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени подтвердило, что уровень их экспрессии достоверно не отличается от изогенного контроля – исходной линии ICGi036-A (см. рис. 2, д). При этом генетически модифицированная линия ИПСК

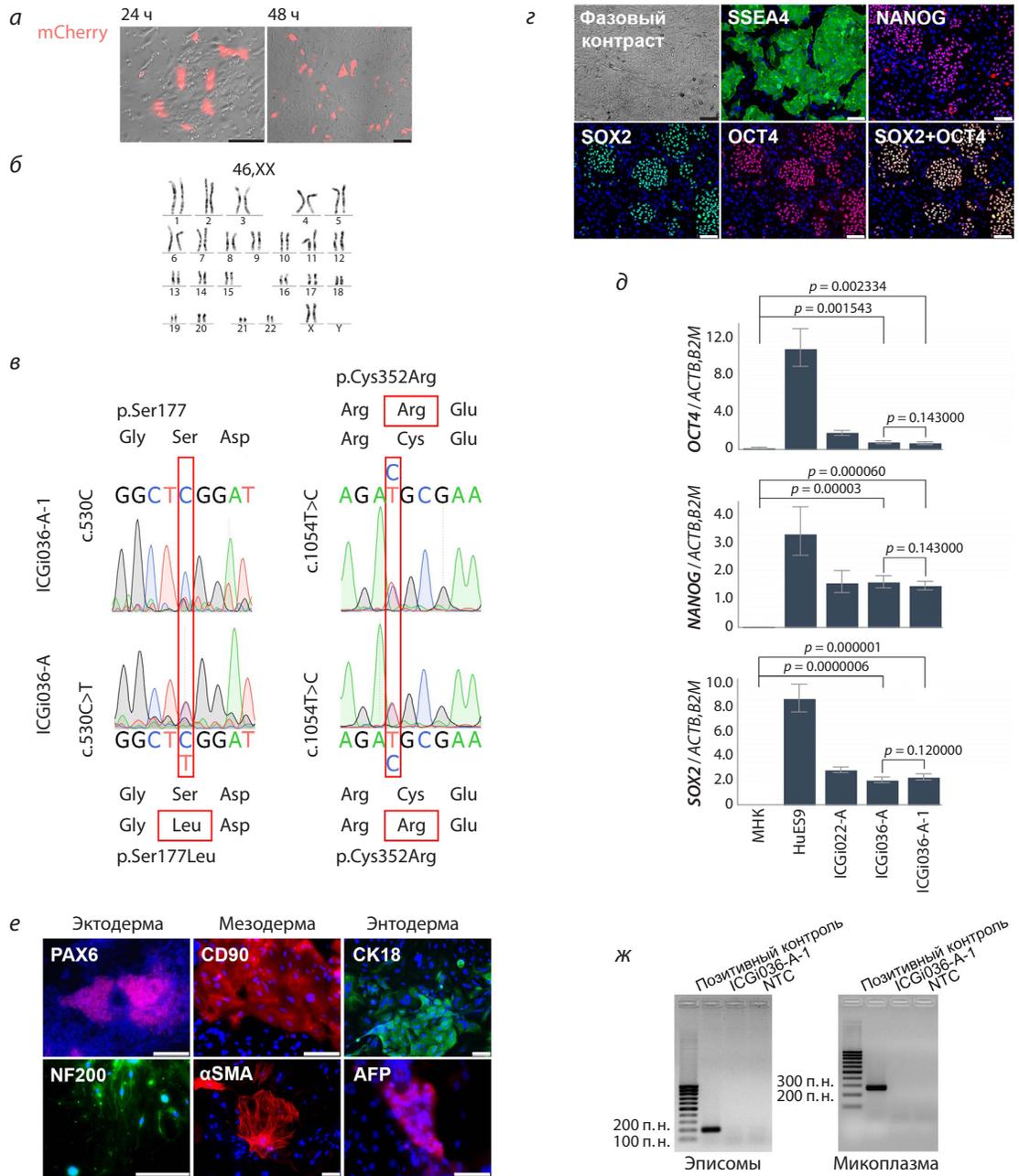


Рис. 2. Характеристика изогенной генетически модифицированной линии ИПСК ICGi036-A-1 со скорректированным патогенным аллельным вариантом c.530C>T.

а – свечение флуоресцентного белка mCherry в ИПСК через 24 и 48 ч после трансфекции; *б* – кариотип полученной линии ИПСК; *в* – хроматограммы, подтверждающие наличие скорректированной до c.530C позиции в линии ICGi036-A-1; *г* – морфология колоний и окраска антителами к маркерам плюрипотентности OCT4, NANOG, SOX2, SSEA4 в полученной линии ICGi036-A-1; *д* – анализ экспрессии генов плюрипотентности OCT4, NANOG, SOX2 методом ПЦР в реальном времени; *е* – подтверждение способности линии ICGi036-A-1 дифференцироваться в производные трех зародышевых листков; *ж* – подтверждение отсутствия эписомных векторов и контаминации микоплазмой в линии ICGi036-A-1. NTC (no template control) – негативный контроль без матрицы. Масштабная линейка на всех изображениях – 100 мкм.

ICGi036-A-1 демонстрирует достоверно более высокий уровень экспрессии генов плюрипотентности по сравнению с мононуклеарными клетками (МНК), из которых получена исходная изогенная линия ИПСК ICGi036-A. Анализ спонтанной дифференцировки линии ICGi036-A-1 выявил наличие гетерогенной популяции клеток, среди которых с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания обнаружены производные, позитивные по характерным

маркерам экто- (PAX6, NF200), мезо- (CD90, αSMA) и энтодермы (CK18, AFP) (см. рис. 2, *е*). Таким образом, полученная генетически модифицированная линия ИПСК проявляет способность давать производные трех первичных зародышевых листков, что является ключевым свойством плюрипотентных стволовых клеток.

Генетически модифицированные ИПСК ICGi036-A-1 имеют нормальный диплоидный кариотип 46,XX (см.

рис. 2, б). Исследование 23 полиморфных локусов коротких tandemных повторов подтвердило идентичность между ИПСК ICGi036-A-1 и исходными изогенными ИПСК ICGi036-A. В полученных ИПСК отсутствуют эпизомные векторы на 10-м пассаже и контаминация микоплазмой на 25-м пассаже (см. рис. 2, ж).

Паспорт полученной клеточной линии приведен в табл. S4.

Обсуждение

Развитие технологий, связанных с получением и применением индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, принесло новые возможности в биологические исследования и биомедицинские разработки. Благодаря доступному малоинвазивному способу получения, неограниченному пролиферативному потенциалу и способности к направленной дифференцировке во все типы клеток взрослого организма, ИПСК используются для разработки релевантных моделей заболеваний человека, высокопроизводительного скрининга лекарственных препаратов и создания высокотехнологичных биомедицинских клеточных продуктов (Cerneckis et al., 2024).

Пациент-специфические клеточные модели на основе дифференцированных производных ИПСК способствуют расширению понимания молекулярно-генетических основ заболеваний и разработке более эффективной таргетной терапии (Brooks et al., 2022). Так, например, ранее нашей группой созданы ИПСК пациентов с семейной гиперхолестеринемией, несущие патогенные аллельные варианты гена рецепторов липопротеинов низкой плотности *LDLR* (Zakharova et al., 2022a–c). С помощью направленной дифференцировки ИПСК мы впервые получили и исследовали эндотелиальные клетки пациентов с СГХС (Zakharova et al., 2024). Оказалось, что эндотелиоциты пациентов, дифференцированные из ИПСК и не подвергавшиеся воздействию окислительного стресса, демонстрируют нарушение функционирования рецепторов *LDLR* и имеют признаки эндотелиальной дисфункции. Полученные данные вносят вклад в понимание молекулярно-генетических механизмов развития атеросклероза при СГХС.

Одним из важнейших направлений биомедицины является сочетание технологий ИПСК и методов редактирования генома. Этот подход позволяет создавать изогенные клеточные модели для нивелирования влияния генетического фона и корректного исследования физиологических изменений, происходящих в релевантных дифференцированных клетках (Niemitz, 2014; Omer et al., 2017; Kawatani et al., 2021; Liang et al., 2022; Wang et al., 2022; Chai et al., 2023; Bonnycastle et al., 2024). Изогенные системы ИПСК могут быть получены как путем внесения изменения в последовательность ДНК клеток здорового донора, так и путем исправления патогенного аллельного варианта в ИПСК пациента с заболеванием (Nandy et al., 2023; Pavlova et al., 2023). В данной работе с использованием CRISPR/Cas9-опосредованного редактирования оснований создана генетически модифицированная линия ICGi036-A-1, изогенная ранее полученной нами линии ИПСК ICGi036-A от пациента-компаундной гетерозиготы по патогенному и вероятно патогенному аллельным вариантам гена *LDLR* с СГХС (Zakharova et al., 2022a).

В генетически модифицированной линии ICGi036-A-1 произошла коррекция патогенного аллельного варианта с.530C>T до референсного с.530C. Линия ИПСК демонстрирует сохранение плюрипотентности, имеет нормальный кариотип и по набору коротких tandemных повторов идентична исходной изогенной линии ИПСК ICGi036-A.

В полученной изогенной линии ИПСК ICGi036-A-1 осталась нескорректированной вторая позиция – с.1054T>C. В настоящее время статус данного аллельного варианта определяется как «патогенный/вероятно патогенный». Исследование дифференцированных производных ИПСК пациента-компаундной гетерозиготы со скорректированной одной позицией с.530C позволит внести вклад в уточнение статуса позиции с.1054T>C.

Для таргетной коррекции однонуклеотидных последовательностей в гене *LDLR* мы применили метод редактирования оснований, обладающий более высокой точностью по сравнению с классической технологией CRISPR-Cas9 и позволяющий генерировать целевые точечные замены последовательности ДНК посредством гидролитического дезаминирования без формирования двуцепочечных разрывов (Hu et al., 2018; Porto et al., 2020). Этот метод ранее успешно применялся для создания изогенных клеточных линий при моделировании ряда заболеваний: болезни Альцгеймера (коррекция последовательности гена *APOE4*), серповидно-клеточной анемии (ген β-глобина), прогерии Хатчинсона–Гилфорда (ген ламина А), наследственного гемохроматоза (*HFE*), некоторых видов рака (ген *TP53*) (Komor et al., 2016; Gaudelli et al., 2017; Koblan et al., 2021; Newby et al., 2021).

С 2022 г. компанией Verve Therapeutics проводится первое клиническое исследование по редактированию оснований в терапевтических целях для лечения СГХС препаратом VERVE-101 (ClinicalTrials.gov ID NCT05398029). В качестве таргетного гена в тестируемом препарате VERVE-101 используется *PCSK9*. Вносимая в этот ген посредством редактирования оснований замена нарушает синтез белка *PCSK9*, что, в свою очередь, нарушает деградацию рецепторов *LDLR* и приводит к снижению концентрации ЛПНП в плазме крови (Rothgangl et al., 2021). Однако в случае патогенных аллельных вариантов *LDLR*, нарушающих синтез рецептора или его выход на клеточную поверхность, таких как с.530C>T и с.1054T>C, данный препарат не будет эффективен для пациентов с СГХС. В этой связи разработка новых клеточных моделей СГХС с применением более безопасных систем редактирования генома клеток остается актуальной задачей.

Полученная нами система изогенных клеточных линий ИПСК пациента с СГХС может быть полезна для исследования особенностей функционирования релевантных дифференцированных производных, например, эндотелиоцитов и гепатоцитов, вовлеченных в проявление данного заболевания, а также для разработки подходов скрининга фармакологических соединений – потенциальных лекарственных препаратов для эффективной терапии семейной гиперхолестеринемии.

В настоящее время имеются примеры клинических исследований ряда препаратов, выбранных с помощью клеточных моделей на основе ИПСК: бокового амиотрофического склероза, прогрессирующей оссифицирующей

фибродисплазии, синдрома Пендред, болезни Альцгеймера (Okano, Morimoto, 2022). Такой подход экономически разумен, поскольку позволяет проводить первую линию скрининга химических соединений без использования менее релевантных и более дорогих животных моделей.

Несмотря на многочисленные преимущества ИПСК для моделирования заболеваний, существует ряд ограничений и проблем, которые необходимо преодолеть в ходе дальнейших исследований. Один из основных недостатков – функциональная незрелость многих получаемых из ИПСК дифференцированных производных (Brooks et al., 2022). В качестве решения данной проблемы развиваются подходы транскриптомного профилирования стадий дифференцированных производных ИПСК и разработки рабочих критериев для оценки зрелости клеточных моделей (Subramanian et al., 2019; Kannan et al., 2021). Другой проблемой является создание воспроизводимых релевантных моделей на основе интеграции нескольких клеточных типов производных ИПСК, отражающих патогенез заболевания в условиях клеточного взаимодействия. Преодоление этой проблемы предполагает использование клеточных органоидов или ассамблеидов (Brooks et al., 2022). Однако это не решает проблему эффективности и воспроизводимости из-за флуктуаций, обусловленных самоорганизацией органоидных систем. В качестве перспективного подхода для повышения воспроизводимости сложных интегрированных клеточных моделей в настоящее время рассматривается технология биопечати с заданным числом жизнеспособных клеток и паттерном их взаимодействия (Renner et al., 2020; Hofer, Lutolf, 2021; Lawlor et al., 2021).

Мы надеемся, что использование полученных нами клеточных моделей на основе изогенных линий ИПСК пациентов с СГХС внесет вклад в более полное понимание механизмов развития заболевания и приблизит возможность разработки более эффективных лекарственных препаратов, повысив результативность лечения, улучшив качество и продолжительность жизни пациентов.

Заключение

В представленной работе мы получили и детально охарактеризовали генетически модифицированную линию ИПСК ICGi036-A-1, изогенную линии пациента с СГХС – компаундной гетерозиготы по патогенному и вероятно патогенному аллельным вариантам гена *LDLR*: с.530C>T (p.Ser177Leu) и с.1054T>C (p.Cys352Arg) соответственно. В полученной линии произошла коррекция позиции с.530C>T до референсной с.530C. Новая линия ИПСК будет использована для создания релевантных клеточных моделей на основе дифференцированных производных, необходимых для исследования проявлений заболевания на отдельных клеточных типах и разработки подходов таргетной терапии семейной гиперхолестеринемии.

Список литературы / References

Григорьева Е.В., Малахова А.А., Яркова Е.С., Минина Ю.М., Вяткин Ю.В., Надточий Ю.А., Хабарова Е.А., Рзаев Д.А., Медведев С.П., Закиян С.М. Создание и характеристика двух линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ICGi052-A и ICGi052-B) от пациента с лобно-височной демен-

цией с паркинсонизмом-17, ассоциированной с патологическим вариантом с.2013T>G в гене *MAPT*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(7):679-687. doi 10.18699/vjgb-24-76

[Grigor'eva E.V., Malakhova A.A., Yarkova E.S., Minina J.M., Vyatkin Y.V., Nadtochy J.A., Khabarova E.A., Rzaev J.A., Medvedev S.P., Zakian S.M. Generation and characterization of two induced pluripotent stem cell lines (ICGi052-A and ICGi052-B) from a patient with frontotemporal dementia with parkinsonism-17 associated with the pathological variant с.2013T>G in the *MAPT* gene. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2024;28(7):679-687. doi 10.18699/vjgb-24-76]

Ежов М.В., Бажан С.С., Ершова А.И., Мешков А.Н., Соколов А.А., Кухарчук В.В., Гуревич В.С., Воевода М.И., Сергиенко И.В., Шахтштейнер Е.В., Покровский С.Н., Коновалов Г.А., Леонтьева И.В., Константинов В.О., Щербакоева М.Ю., Захарова И.Н., Балахоннова Т.В., Филиппов А.Е., Ахмеджанов Н.М., Александрова О.Ю., Липовецкий Б.М. Клинические рекомендации по семейной гиперхолестеринемии. *Атеросклероз*. 2019;15(1):58-98 [Ezhov M.V., Bazhan S.S., Ershova A.I., Meshkov A.N., Sokolov A.A., Kukharchuk V.V., Gurevich V.S., Voevoda M.I., Sergienko I.V., Shakhtshneider E.V., Pokrovsky S.N., Konovalov G.A., Leontyeva I.V., Konstantinov V.O., Sheherbakova M.Yu., Zakharova I.N., Balakhonova T.V., Filippov A.E., Akhmedzhanov N.M., Aleksandrova O.Yu., Lipovetsky B.M. Clinical guidelines for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerоз*. 2019;15(1):58-98 (in Russian)]

Захарова И.С., Шевченко А.И., Закиян С.М. Семейная гиперхолестеринемия: современные сведения и проблемы моделирования. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024; 10(1):5-14. doi 10.18699/letvjgb-2024-10-2

[Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Zakian S.M. Familial hypercholesterolemia: current insight and challenges in its modelling. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;10(1):5-14. doi 10.18699/letvjgb-2024-10-2 (in Russian)]

Bauer D.E., Canver M.C., Orkin S.H. Generation of genomic deletions in mammalian cell lines via CRISPR/Cas9. *J Vis Exp*. 2015; 95:e52118. doi 10.3791/52118

Bonnycastle L.L., Swift A.J., Mansell E.C., Lee A., Winnicki E., Li E.S., Robertson C.C., Parsons V.A., Huynh T., Krilow C., Mohlke K.L., Erdos M.R., Narisu N., Collins F.S. Generation of human isogenic induced pluripotent stem cell lines with CRISPR prime editing. *Cris J*. 2024;7(1):53-67. doi 10.1089/crispr.2023.0066

Bourbon M., Alves A.C., Medeiros A.M., Silva S., Soutar A.K. Familial hypercholesterolaemia in Portugal. *Atherosclerosis*. 2008; 196(2):633-642. doi 10.1016/j.atherosclerosis.2007.07.019

Brooks I.R., Garrone C.M., Kerins C., Kiar C.S., Syntaka S., Xu J.Z., Spagnoli F.M., Watt F.M. Functional genomics and the future of iPSCs in disease modeling. *Stem Cell Rep*. 2022;17(5):1033-1047. doi 10.1016/j.stemcr.2022.03.019

Cerneckis J., Cai H., Shi Y. Induced pluripotent stem cells (iPSCs): molecular mechanisms of induction and applications. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):112. doi 10.1038/s41392-024-01809-0

Chai A.C., Cui M., Chemello F., Li H., Chen K., Tan W., Atmanli A., McAnally J.R., Zhang Y., Xu L., Liu N., Bassel-Duby R., Olson E.N. Base editing correction of hypertrophic cardiomyopathy in human cardiomyocytes and humanized mice. *Nat Med*. 2023;29(2):401-411. doi 10.1038/s41591-022-02176-5

Choppa P.C., Vojdani A., Tagle C., Andrin R., Magtoto L. Multiplex PCR for the detection of *Mycoplasma fermentans*, *M. hominis* and *M. penetrans* in cell cultures and blood samples of patients with chronic fatigue syndrome. *Mol Cell Probes*. 1998;12(5):301-308. doi 10.1006/mcpr.1998.0186

Cowan C.A., Klimanskaya I., McMahon J., Atienza J., Witmyer J., Zucker J.P., Wang S., Morton C.C., McMahon A.P., Powers D., Melton D.A. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med*. 2004;350(13):1353-1356. doi 10.1056/nejmsr040330

- Ference B.A., Ginsberg H.N., Graham I., Ray K.K., Packard C.J., Bruckert E., Hegele R.A., Krauss R.M., Raal F.J., Schunkert H., Watt G.F., Borén J., Fazio S., Horton J.D., Masana L., Nicholls S.J., Nordestgaard B.G., Van De Sluis B., Taskinen M.R., Tokgözoğlu L., Landmesser U., Laufs U., Wiklund O., Stock J.K., Chapman M.J., Catapano A.L. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J.* 2017;38(32):2459-2472. doi 10.1093/eurheartj/ehx144
- Fularski P., Hajdys J., Majchrowicz G., Stabrawa M., Młynarska E., Rysz J., Franczyk B. Unveiling familial hypercholesterolemia – review, cardiovascular complications, lipid-lowering treatment and its efficacy. *Int J Mol Sci.* 2024;25(3):1637. doi 10.3390/ijms25031637
- Gaudelli N.M., Komor A.C., Rees H.A., Packer M.S., Badran A.H., Bryson D.I., Liu D.R. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature.* 2017;551(7681):464-471. doi 10.1038/nature24644
- Gu J., Gupta R.N., Cheng H.K., Xu Y., Raal F.J. Current treatments for the management of homozygous familial hypercholesterolaemia: a systematic review and commentary. *Eur J Prev Cardiol.* 2024; 31(15):1833-1849. doi 10.1093/eurjpc/zwae144
- Harada-Shiba M. Impact of familial hypercholesterolemia diagnosis in real-world data. *J Atheroscler Thromb.* 2023;30(10):1303. doi 10.5551/jat.ED241
- Hendricks-Sturup R.M., Clark-Locascio J., Lu C.Y. A global review on the utility of genetic testing for familial hypercholesterolemia. *J Pers Med.* 2020;10(2):23. doi 10.3390/jpm10020023
- Hofer M., Lutolf M.P. Engineering organoids. *Nat Rev Mater.* 2021; 6(5):402-420. doi 10.1038/s41578-021-00279-y
- Hopkins P.N., Toth P.P., Ballantyne C.M., Rader D.J. Familial hypercholesterolemias: prevalence, genetics, diagnosis and screening recommendations from the national lipid association expert panel on familial hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol.* 2011;5(3):S9. doi 10.1016/j.jacl.2011.03.452
- Hu J.H., Miller S.M., Geurts M.H., Tang W., Chen L., Sun N., Zeina C.M., Gao X., Rees H.A., Lin Z., Liu D.R. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature.* 2018;556(7699):57-63. doi 10.1038/nature26155
- Huang C.C., Niu D.M., Chang M.J. Genetic analysis in a Taiwanese cohort of 750 index patients with clinically diagnosed familial hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb.* 2022;29(5):639-653. doi 10.5551/jat.62773
- Jannes C.E., Santos R.D., de Souza Silva P.R., Turolla L., Gagliardi A.C.M., Marsiglia J.D.C., Chacra A.P., Miname M.H., Rocha V.Z., Filho W.S., Krieger J.E., Pereira A.C. Familial hypercholesterolemia in Brazil: cascade screening program, clinical and genetic aspects. *Atherosclerosis.* 2015;238(1):101-107. doi 10.1016/j.atherosclerosis.2014.11.009
- Kannan S., Farid M., Lin B.L., Miyamoto M., Kwon C. Transcriptomic entropy benchmarks stem cell-derived cardiomyocyte maturation against endogenous tissue at single cell level. *PLoS Comput Biol.* 2021;17(9):e1009305. doi 10.1371/journal.pcbi.1009305
- Kawatani K., Nambara T., Nawa N., Yoshimatsu H., Kusakabe H., Hirata K., Tanave A., Sumiyama K., Banno K., Taniguchi H., Arahori H., Ozono K., Kitabatake Y. A human isogenic iPSC-derived cell line panel identifies major regulators of aberrant astrocyte proliferation in Down syndrome. *Commun Biol.* 2021;4(1):730. doi 10.1038/s42003-021-02242-7
- Koblan L.W., Erdos M.R., Wilson C., Cabral W.A., Levy J.M., Xiong Z.M., Tavarez U.L., Davison L.M., Gete Y.G., Mao X., Newby G.A., Doherty S.P., Narisu N., Sheng Q., Krilow C., Lin C.Y., Gordon L.B., Cao K., Collins F.S., Brown J.D., Liu D.R. *In vivo* base editing rescues Hutchinson-Gilford progeria syndrome in mice. *Nature.* 2021;589(7843):608-614. doi 10.1038/s41586-020-03086-7
- Komor A.C., Kim Y.B., Packer M.S., Zuris J.A., Liu D.R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature.* 2016;533(7603):420-424. doi 10.1038/nature17946
- Lawlor K.T., Vanslambrouck J.M., Higgins J.W., Chambon A., Bishard K., Arndt D., Er P.X., Wilson S.B., Howden S.E., Tan K.S., Li F., Hale L.J., Shepherd B., Pentoney S., Presnell S.C., Chen A.E., Little M.H. Cellular extrusion bioprinting improves kidney organoid reproducibility and conformation. *Nat Mater.* 2021;20(2):260-271. doi 10.1038/s41563-020-00853-9
- Liang Y., Sun X., Duan C., Zhou Y., Cui Z., Ding C., Gu J., Mao S., Ji S., Chan H.F., Tang S., Chen J. Generation of a gene-corrected human iPSC line (CSUASOi004-A-1) from a retinitis pigmentosa patient with heterozygous c.2699G>A mutation in the *PRPF6* gene. *Stem Cell Res.* 2022;64:103572. doi 10.1016/j.scr.2022.102911
- Malakhova A.A., Grigor'eva E.V., Pavlova S.V., Malankhanova T.B., Valetdinova K.R., Vyatkin Y.V., Khabarova E.A., Rzaev J.A., Zakian S.M., Medvedev S.P. Generation of induced pluripotent stem cell lines ICGi021-A and ICGi022-A from peripheral blood mononuclear cells of two healthy individuals from Siberian population. *Stem Cell Res.* 2020;48:101952. doi 10.1016/j.scr.2020.101952
- Meshkov A., Ershova A., Kiseleva A., Zotova E., Sotnikova E., Petukhova A., Zharikova A., Malyshev P., Rozhkova T., Blokhina A., Limonova A., Ramensky V., Divashuk M., Khasanova Z., Bukaeva A., Kurilova O., Skirko O., Pokrovskaya M., Mikova V., Snigir E., Akinshina A., Mitrofanov S., Kashtanova D., Makarov V., Kukhar-chuk V., Boytsov S., Yudin S., Drapkina O. The *LDLR*, *APOB*, and *PCSK9* variants of index patients with familial hypercholesterolemia in Russia. *Genes.* 2021;12(1):66. doi 10.3390/genes12010066
- Mohd Nor N.S., Al-Khateeb A.M., Chua Y.A., Mohd Kasim N.A., Mohd Nawawi H. Heterozygous familial hypercholesterolaemia in a pair of identical twins: a case report and updated review. *BMC Pediatr.* 2019;19(1):106. doi 10.1186/s12887-019-1474-y/tables/2
- Nandy K., Babu D., Rani S., Joshi G., Ijee S., George A., Palani D., Premkumar C., Rajesh P., Vijayanand S., David E., Murugesan M., Velayudhan S.R. Efficient gene editing in induced pluripotent stem cells enabled by an inducible adenine base editor with tunable expression. *Sci Rep.* 2023;13(1):21953. doi 10.1038/s41598-023-42174-2
- Nazarenko M.S., Sleptcov A.A., Zarubin A.A., Salakhov R.R., Shevchenko A.I., Tmoyan N.A., Elisaphenko E.A., Zubkova E.S., Zheltysheva N.V., Ezhov M.V., Kukhar-chuk V.V., Parfyonova Y.V., Zakian S.M., Zakharova I.S. Calling and phasing of single-nucleotide and structural variants of the *LDLR* gene using Oxford Nanopore MinION. *Int J Mol Sci.* 2023;24(5):4471. doi 10.3390/ijms24054471
- Newby G.A., Yen J.S., Woodard K.J., Mayuranathan T., Lazzarotto C.R., Li Y., Sheppard-Tillman H., Porter S.N., Yao Y., Mayberry K., Everette K.A., Jang Y., Podracky C.J., Thaman E., Lechavue C., Sharma A., Henderson J.M., Richter M.F., Zhao K.T., Miller S.M., Wang T., Koblan L.W., McCaffrey A.P., Tisdale J.F., Kalfa T.A., Pruett-Miller S.M., Tsai S.Q., Weiss M.J., Liu D.R. Base editing of haematopoietic stem cells rescues sickle cell disease in mice. *Nature.* 2021;595(7866):295-302. doi 10.1038/s41586-021-03609-w
- Niemitz E. Isogenic iPSC-derived models of disease. *Nat Genet.* 2014;46(1):7. doi 10.1038/ng.2864
- Okano H., Morimoto S. iPSC-based disease modeling and drug discovery in cardinal neurodegenerative disorders. *Cell Stem Cell.* 2022; 29(2):189-208. doi 10.1016/j.stem.2022.01.007
- Okita K., Yamakawa T., Matsumura Y., Sato Y., Amano N., Watanabe A., Goshima N., Yamanaka S. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells.* 2013;31(3):458-466. doi 10.1002/stem.1293
- Omer L., Hudson E.A., Zheng S., Hoying J.B., Shan Y., Boyd N.L. CRISPR correction of a homozygous low-density lipoprotein receptor mutation in familial hypercholesterolemia induced pluripotent stem cells. *Hepatol Commun.* 2017;1(9):886-898. doi 10.1002/hep4.1110

- Palacios L., Grandoso L., Cuevas N., Olano-Martín E., Martínez A., Tejedor D., Stef M. Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in Spain. *Atherosclerosis*. 2012;221(1):137-142. doi 10.1016/j.atherosclerosis.2011.12.021
- Pavlova S.V., Shayakhmetova L.S., Pronyaeva K.A., Shulgina A.E., Zakian S.M., Demytyeva E.V. Generation of induced pluripotent stem cell lines ICGi022-A-3, ICGi022-A-4, and ICGi022-A-5 with p.Asn515del mutation introduced in *MYBPC3* using CRISPR/Cas9. *Russ J Dev Biol*. 2023;54:96-103. doi 10.1134/S1062360423010113
- Porto E.M., Komor A.C., Slaymaker I.M., Yeo G.W. Base editing: advances and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2020; 19(12):839-859. doi 10.1038/s41573-020-0084-6
- Ray K.K., Ference B.A., Séverin T., Blom D., Nicholls S.J., Shiba M.H., Almahmeed W., Alonso R., Daccor M., Ezhov M., Olmo R.F., Jankowski P., Lanas F., Mehta R., Puri R., Wong N.D., Wood D., Zhao D., Gidding S.S., Virani S.S., Lloyd-Jones D., Pinto F., Perrel P., Santos R.D. World Heart Federation Cholesterol Roadmap 2022. *Glob Heart*. 2022;17(1):75. doi 10.5334/gh.1154
- Ray K.K., Pillas D., Hadjiphilippou S., Khunti K., Seshasai S.R.K., Vallejo-Vaz A.J., Neasham D., Addison J. Premature morbidity and mortality associated with potentially undiagnosed familial hypercholesterolemia in the general population. *Am J Prev Cardiol*. 2023; 15:100580. doi 10.1016/j.ajpc.2023.100580
- Renner H., Grabos M., Becker K.J., Kagermeier T.E., Wu J., Otto M., Peischard S., Zeuschner D., Tsytysura Y., Disse P., Klingauf J., Leidel S.A., Seebohm G., Schöler H.R., Bruder J.M. A fully automated high-throughput workflow for 3D-based chemical screening in human midbrain organoids. *eLife*. 2020;9:e52904. doi 10.7554/eLife.52904
- Rothgangl T., Dennis M.K., Lin P.J.C., Oka R., Witzigmann D., Villiger L., Qi W., Hruzova M., Kissling L., Lenggenger D., Borrelli C., Egli S., Frey N., Bakker N., Walker J.A., Kadina A.P., Victorov D.V., Pacesa M., Kreutzer S., Kontarakis Z., Moor A., Jinek M., Weissman D., Stoffel M., van Boxtel R., Holden K., Pardi N., Thöny B., Häberle J., Tam Y.K., Semple S.C., Schwank G. *In vivo* adenine base editing of *PCSK9* in macaques reduces LDL cholesterol levels. *Nat Biotechnol*. 2021;39(8):949-957. doi 10.1038/s41587-021-00933-4
- Semenova A.E., Sergienko I.V., García-Giustiniani D., Monserrat L., Popova A.B., Nozadze D.N., Ezhov M.V. Verification of underlying genetic cause in a cohort of Russian patients with familial hypercholesterolemia using targeted next generation sequencing. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2020;7(2):16. doi 10.3390/jcdd7020016
- Setia N., Saxena R., Arora A., Verma I.C. Spectrum of mutations in homozygous familial hypercholesterolemia in India, with four novel mutations. *Atherosclerosis*. 2016;255:31-36. doi 10.1016/j.atherosclerosis.2016.10.028
- Shakhtshneider E., Ivanoshchuk D., Timoshchenko O., Orlov P., Semaev S., Valeev E., Goonko A., Ladygina N., Voevoda M. Analysis of rare variants in genes related to lipid metabolism in patients with familial hypercholesterolemia in Western Siberia (Russia). *J Pers Med*. 2021;11(11):1232. doi 10.3390/jpm11111232
- Sharifi M., Walus-Miarka M., Idziur-Waluś B., Malecki M.T., Sanak M., Whittall R., Li K.W., Futema M., Humphries S.E. The genetic spectrum of familial hypercholesterolemia in south-eastern Poland. *Metabolism*. 2016;65(3):48-53. doi 10.1016/j.metabol.2015.10.018
- Siegner S.M., Karasu M.E., Schröder M.S., Kontarakis Z., Corn J.E. PnB Designer: a web application to design prime and base editor guide RNAs for animals and plants. *BMC Bioinformatics*. 2021; 22(1):101. doi 10.1186/s12859-021-04034-6
- Subramanian A., Sidhom E.H., Emani M., Vernon K., Sahakian N., Zhou Y., Kost-Alimova M., Slyper M., Waldman J., Dionne D., Nguyen L.T., Weins A., Marshall J.L., Rosenblatt-Rosen O., Regev A., Greka A. Single cell census of human kidney organoids shows reproducibility and diminished off-target cells after transplantation. *Nat Commun*. 2019;10(1):5462. doi 10.1038/S41467-019-13382-0
- Südhof T.C., Goldstein J.L., Brown M.S., Russell D.W. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science*. 1985;228(4701):815-822. doi 10.1126/science.2988123
- Talmud P.J., Futema M., Humphries S.E. The genetic architecture of the familial hyperlipidaemia syndromes: rare mutations and common variants in multiple genes. *Curr Opin Lipidol*. 2014;25(4):274-281. doi 10.1097/MOL.000000000000090
- Thormaehlen A.S., Schubert C., Won H.H., Blattmann P., Joggerst-Thomalla B., Theiss S., Asselta R., Duga S., Merlini P.A., Ardisino D., Lander E.S., Gabriel S., Rader D.J., Peloso G.M., Peperkoc R., Kathiresan S., Runz H. Systematic cell-based phenotyping of missense alleles empowers rare variant association studies: a case for *LDLR* and myocardial infarction. *PLoS Genet*. 2015; 11(2):e1004855. doi 10.1371/journal.pgen.1004855
- Tichý L., Freiberger T., Zapletalová P., Soška V., Ravčuková B., Fajkusová L. The molecular basis of familial hypercholesterolemia in the Czech Republic: spectrum of *LDLR* mutations and genotype-phenotype correlations. *Atherosclerosis*. 2012;223(2):401-408. doi 10.1016/j.atherosclerosis.2012.05.014
- Vaskova E.A., Medvedev S.P., Sorokina A.E., Nemudryy A.A., Elisaphenko E.A., Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Kizilova E.A., Zhelezova A.I., Evshin I.S., Sharipov R.N., Minina J.M., Zhdanova N.S., Khegay I.I., Kolpakov F.A., Sukhikh G.T., Pokushalov E.A., Karasov A.M., Vlasov V.V., Ivanova L.N., Zakian S.M. Transcriptome characteristics and X-chromosome inactivation status in cultured rat pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*. 2015;24(24):2912-2924. doi 10.1089/scd.2015.0204
- Wang H., Luo Y., Li J., Guan J., Yang S., Wang Q. Generation of a gene corrected human isogenic iPSC line (CPGHi001-A-1) from a hearing loss patient with the TMC1 p.M418K mutation using CRISPR/Cas9. *Stem Cell Res*. 2022;60:102736. doi 10.1016/j.scr.2022.102736
- Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Tmoyan N.A., Elisaphenko E.A., Zubkova E.S., Sleptcov A.A., Nazarenko M.S., Ezhov M.V., Kukharchuk V.V., Parfyonova Y.V., Zakian S.M. Induced pluripotent stem cell line ICGi036-A generated by reprogramming peripheral blood mononuclear cells from a patient with familial hypercholesterolemia caused due to compound heterozygous p.Ser177Leu/p.Cys352Arg mutations in *LDLR*. *Stem Cell Res*. 2022a;59:102653. doi 10.1016/j.scr.2022.102653
- Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Tmoyan N.A., Elisaphenko E.A., Kalinin A.P., Sleptcov A.A., Nazarenko M.S., Ezhov M.V., Kukharchuk V.V., Parfyonova Y.V., Zakian S.M. Induced pluripotent stem cell line ICGi037-A, obtained by reprogramming peripheral blood mononuclear cells from a patient with familial hypercholesterolemia due to heterozygous p.Trp443Arg mutations in *LDLR*. *Stem Cell Res*. 2022b;60:102703. doi 10.1016/j.scr.2022.102703
- Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Tmoyan N.A., Elisaphenko E.A., Zubkova E.S., Sleptcov A.A., Nazarenko M.S., Ezhov M.V., Kukharchuk V.V., Parfyonova Y.V., Zakian S.M. Induced pluripotent stem cell line ICGi038-A, obtained by reprogramming peripheral blood mononuclear cells from a patient with familial hypercholesterolemia due to compound heterozygous c.1246C>T/c.940+3_940+6del mutations in *LDLR*. *Stem Cell Res*. 2022c;60:102702. doi 10.1016/j.scr.2022.102702
- Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Arssan M.A., Sleptcov A.A., Nazarenko M.S., Zarubin A.A., Zheltysheva N.V., Shevchenko V.A., Tmoyan N.A., Saaya S.B., Ezhov M.V., Kukharchuk V.V., Parfyonova Y.V., Zakian S.M. iPSC-derived endothelial cells reveal *LDLR* dysfunction and dysregulated gene expression profiles in familial hypercholesterolemia. *Int J Mol Sci*. 2024;25(2):689. doi 10.3390/ijms25020689

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 25.11.2024. После доработки 04.12.2024. Принята к публикации 09.12.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-23

Содержание витамина С и профиль экспрессии генов метаболизма аскорбата в зеленых листьях и отбеленной части ложного стебля гибридов F₁ лука-порей (*Allium porrum* L.)

М.А. Филюшин , Т.М. Середин, А.В. Щенникова , Е.З. Кочиева 

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

 michel7753@mail.ru

Аннотация. Лук-порей (*Allium porrum* L.) – экономически важная овощная культура семейства Amaryllidaceae с широким спектром лечебных и питательных качеств, в том числе благодаря накоплению витамина С (L-аскорбиновая кислота, аскорбат). Аскорбат – органическое водорастворимое соединение, которое выполняет множество функций в метаболизме клеток растения, в том числе участвует в качестве эффективного антиоксиданта в ответе растительных клеток на биотические и абиотические стрессовые факторы. Метаболизм аскорбата включает биосинтез (преимущественно L-галактозный путь) и рециклинг (восстановление окисленных форм до аскорбата). Генные сети, определяющие метаболизм аскорбата в растениях лука-порей, малоизучены. В настоящей работе гибриды F₁, полученные от 13 скрещиваний образцов лука-порей отечественной и зарубежной селекции, охарактеризованы по всхожести семян, содержанию аскорбата и экспрессии генов биосинтеза (*PGI*, *PMI*, *PMM*, *VTC1b*, *GME1*, *GME2*, *VTC2*, *GPP*, *GaLDH* и *GaLDH*) и рециклинга (*APX1*, *APX2*, *MDHAR1*, *MDHAR4*, *MDHAR5*, *DHAR2*, *GR*) аскорбата в проростках, зеленых листьях и отбеленной части стебля взрослых растений. Также проведен поиск корреляций между уровнем экспрессии генов метаболизма аскорбата и количеством витамина С у лука-порей. Показано, что изучаемым гибридам присуща высокая (89–100 %) всхожесть семян, за исключением гибрида от скрещивания 74 × Аллигатор (55 %). В проростках и зеленых листьях образцов девяти гибридов F₁ выявлен повышенный уровень экспрессии генов *VTC2*, *MDHAR1*, *MDHAR4* и/или *MDHAR5*, что позволило считать эти образцы перспективными с точки зрения возможной стрессоустойчивости. Четыре гибрида, которые характеризовались наименьшим (33 × 30, 74 × Аллигатор) и наибольшим (81 × 95, 36 × 38) содержанием аскорбата в проростках, были выбраны для дальнейшего детального анализа взрослых растений на содержание растворимых сахаров и аскорбата, уровень экспрессии генов метаболизма аскорбата и морфологические характеристики (длина, толщина и масса ложного стебля). Выявлено, что зеленые листья гибридов 36 × 38 и 81 × 95 содержат существенно больше аскорбата, чем 33 × 30 и 74 × Аллигатор. В отбеленных стеблях всех четырех гибридов содержание аскорбата было значительно ниже, чем в зеленых листьях. Образцы 36 × 38 и 81 × 95 отличались также наибольшим количеством растворимых сахаров в отбеленной части ложного стебля, употребляемой в пищу. Гибрид 81 × 95 формировал ложный стебель, превышающий по размеру и массе стебель остальных трех гибридов. В зеленых листьях содержание аскорбата положительно коррелировало с уровнем экспрессии генов рециклинга аскорбата (*APX2*, *MDHAR1*, *MDHAR4*), что может быть использовано в селекции стрессоустойчивых гибридов лука-порей с повышенным содержанием витамина С.

Ключевые слова: лук-порей; *Allium porrum* L.; витамин С; гены биосинтеза аскорбата; гены рециклинга аскорбата; растворимые сахара; экспрессия генов

Для цитирования: Филюшин М.А., Середин Т.М., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Содержание витамина С и профиль экспрессии генов метаболизма аскорбата в зеленых листьях и отбеленной части ложного стебля гибридов F₁ лука-порей (*Allium porrum* L.). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(2):200-209. doi 10.18699/vjgb-25-23

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2022-318 от 20.04.2022 о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Vitamin C content and profile of ascorbate metabolism gene expression in green leaves and bleached parts of the pseudostem of leek (*Allium porrum* L.) F₁ hybrids

М.А. Filyushin , Т.М. Seredin, A.V. Shchennikova , E.Z. Kochieva 

Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

 michel7753@mail.ru

Abstract. Leek (*Allium porrum* L.) is an economically important vegetable crop of the family Amaryllidaceae with a wide range of medicinal and nutritional properties, in part due to the accumulation of vitamin C (L-ascorbic acid, ascorbate). Ascorbate is an organic water-soluble compound, which performs many functions in plant cell metabolism, including as one of an effective antioxidant in plant cell responses to biotic and abiotic stress factors. Ascorbate metabolism includes biosynthesis (mainly the L-galactose pathway) and recycling (reduction of oxidized forms to ascorbate). The gene networks that determine ascorbate metabolism in leek plants are poorly understood. In this work, crosses of leek varieties/lines were carried out. Accessions of F₁ hybrids were characterized for seed germination rate, ascorbate content and expression of ascorbate biosynthesis (*PGI, PMI, PMM, VTC1b, GME1, GME2, VTC2, GPP, GalDH, GalLDH*) and recycling (*APX1, APX2, MDHAR1, MDHAR4, MDHAR5, DHAR2, GR*) genes in seedlings, as well as green leaves and bleached stem parts of the adult plant. A search for correlations between the level of expression of ascorbate metabolism genes and the amount of vitamin C in leeks was also carried out. It was shown that the studied hybrids are characterized by high (89–100 %) seed germination, with the exception of the hybrid from the 74 × Alligator cross (55 %). An increased level of expression of the *VTC2, MDHAR1, MDHAR4* and/or *MDHAR5* genes was detected in the seedlings and green leaves of nine F₁ hybrids, which allowed us to consider these samples promising in terms of possible stress resistance. Four hybrids that were characterized by the lowest (33 × 30, 74 × Alligator) and highest (81 × 95, 36 × 38) ascorbate content in seedlings were selected for a further detailed analysis of adult plants for the content of soluble sugars and ascorbate, gene expression and morphological characteristics (length, thickness and weight of the false stem). It was confirmed that green leaves of the 36 × 38 and 81 × 95 hybrids contain significantly more ascorbate than the 33 × 30 and 74 × Alligator hybrids. In all four hybrids, the ascorbate content was significantly lower in the bleached stems than in the green leaves. Accessions 36 × 38 and 81 × 95 were also characterized by the highest amount of soluble sugars in the bleached part of the false stem used for food. In addition, the false stem formed by the 81 × 95 hybrid was larger and heavier than the stems of the other three hybrids. A direct dependence of ascorbate content on the transcript level of ascorbate recycling genes (*APX2, MDHAR1, MDHAR4*) in green leaves was revealed, which can be used in the breeding of stress-resistant leek hybrids with a high content of vitamin C.

Key words: leek; *Allium porrum* L.; vitamin C; ascorbate biosynthesis genes; ascorbate recycling genes; soluble sugars; gene expression

For citation: Filyushin M.A., Seredin T.M., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Vitamin C content and profile of ascorbate metabolism gene expression in green leaves and bleached parts of the pseudostem of leek (*Allium porrum* L.) F₁ hybrids. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(2):200–209. doi 10.18699/vjgb-25-23

Введение

Виды лука, включая лук-порея (*Allium porrum* L.), обладают широким спектром питательных и лечебных свойств. Лук-порея, также известный как *A. ampeloprasum* var. *porrum* (L.) Gay, считается экономически важной овощной культурой, ценимой не только за пищевые качества, но и за антибактериальные, противораковые, кардиопротекторные и антиоксидантные свойства (Celebi-Toprak, Alan, 2021).

Селекция лука-порея направлена на увеличение длины, толщины, плотности и массы отбеленного стебля, употребляемого в пищу, улучшение его вкусовых и диетических качеств, а также на повышение всхожести семян и устойчивости к стрессовым факторам и стрелкованию (Swamy, Gowda, 2006; Celebi-Toprak, Alan, 2021). Нежный и сладкий вкус луку-порею придают растворимые сахара (5.0–11.2 г/100 г сырой массы) и витамин С (L-аскорбиновая кислота, аскорбат, АК) (0.9–3.6 мг/г сухой массы); при хранении количество АК в отбеленной части ложного стебля повышается более чем в 1.5 раза (Lundegårdh et al., 2008; Grzelak-Błaszczuk et al., 2011; Bernaert et al., 2012; Bernaert, 2013). Оба типа метаболитов играют значимую роль в защитных реакциях растения на стрессовые факторы (Yamada, Osakabe, 2018; Broad et al., 2020; Qi et al., 2020), а витамин С – также в оздоровлении человека (Nemilä, 2017).

Присутствие аскорбата положительно связано и с послеуборочной сохранностью отбеленного стебля, так как, в отличие от репчатого лука, срезаемый стебель лука-порея не находится в состоянии физиологического покоя и

быстро портится (Bernaert, 2013). Кроме того, сигнальные пути, зависящие от количества аскорбата и растворимых сахаров, во многом определяют онтогенез растения (Considine, Foyer, 2014; Yoon et al., 2021) и, следовательно, могут положительно влиять на размеры ложного стебля лука-порея.

Сравнение масляных экстрактов лука-порея и другой не менее популярной луковой культуры – чеснока (*A. sativum* L.) показало превосходство лука-порея по антиоксидантной активности во многом благодаря большим накоплениям витамина С (Lemma et al., 2022). Согласно немногим исследованиям, количество витамина С в зеленых листьях лука-порея может колебаться в пределах 2.8–8.5 и 0.9–3.6 мг/г сухой массы зеленых листьев и в употребляемой в пищу отбеленной части стебля (ложный стебель) соответственно (Lundegårdh et al., 2008; Bernaert et al., 2012).

Витамин С – органическое водорастворимое соединение, которое не синтезируется человеком, но является необходимой частью его рациона и поступает с растительной пищей, где количество аскорбата зависит от вида/сорта, ткани/органа и условий выращивания/хранения растений (Bulley, Laing, 2016). Помимо пользы для человека, в самом растении аскорбат участвует во многих аспектах развития, включая регуляцию клеточного метаболизма, а также представляет собой эффективный антиоксидант, поскольку накапливается в клетке в достаточном количестве и осуществляет тонкую регуляцию присутствия различных свободных радикалов, вступая с ними в реакцию (Arrigoni, De Tullio, 2002).

Значимость аскорбата для растения подчеркивается тем, что его синтез происходит по нескольким уникальным путям, среди которых доминирующим считается L-галактозный путь Смирнова–Уилера, проходящий восемь этапов преобразования исходного субстрата (D-фруктоза-6-Ф) в L-аскорбиновую кислоту (Bulley, Laing, 2016). Цепь биосинтеза включает реакции, катализируемые последовательно глюкозо-6-фосфатизомеразой (PGI), маннозо-6-фосфатизомеразой (PMI), фосфоманномутазой (PMM), GDP-маннозопирофосфорилазой (VTC1), GDP-манноза-3',5'-эпимеразой (GME), GDP-L-галактозофосфорилазой (VTC2, VTC5), L-галактозо-1-фосфатфосфатазой (GPP), L-галактозодегидрогеназой (GalDH) и L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназой (GalLDH) (Bulley, Laing, 2016).

Рециклинг аскорбата происходит следующим образом. При взаимодействии аскорбата с активными формами кислорода, а также под действием аскорбатпероксидаз (APX) и аскорбатоксидаз (АО) аскорбат окисляется и переходит в монодегидроаскорбиновую кислоту (MDHA), которая может распадаться на дегидроаскорбиновую кислоту (DHA) и аскорбат (Bulley, Laing, 2016). Обе окисленные формы, MDHA и DHA, могут восстанавливаться до аскорбата с помощью монодегидроаскорбатредуктазы (MDHAR) и дегидроаскорбатредуктазы (DHAR) соответственно (Bulley, Laing, 2016). Таким образом, концентрация аскорбата в растительной ткани определяется балансом между синтезом витамина С, его рециклингом и катаболизмом окисленных форм.

Генные сети метаболизма аскорбата изучаются на различных видах растений, включая культурные виды. К примеру, показано, что уровень экспрессии гена *VTC2* положительно связан с количеством аскорбата в ткани растения и с устойчивостью растений к абиотическим стрессовым факторам, и данный факт используется в селекции, направленной на увеличение содержания витамина С (Ali et al., 2019; Broad et al., 2020). У модельного вида *Arabidopsis thaliana* L. обнаружен паралог *VTC2* – ген *VTC5*, однако главная роль в определении скорости L-галактозного пути принадлежит именно *VTC2* (Dowdle et al., 2007).

Гены рециклинга аскорбата изучаются больше в аспекте их роли в определении стрессоустойчивости растений. В ответ на различные стрессовые факторы, как абиотические, так и биотические, изменяются уровень экспрессии генов семейства *MDHAR* и активность кодируемых ими ферментов (Letierrier et al., 2005; Dowdle et al., 2007; Gill, Tuteja, 2010; Feng et al., 2014; Lanubile et al., 2015; Zhang et al., 2015; García et al., 2020). Сверхэкспрессия генов *MDHAR* положительно влияет на устойчивость к солевому стрессу (Sultana et al., 2012; Qi et al., 2020). Однако в спелых плодах томата это значительно снижает содержание аскорбата (Haroldsen et al., 2011).

Генные сети, определяющие метаболизм аскорбата в растениях лука-порей (*A. porrum*), малоизучены. Охарактеризованы полиморфизм и профиль экспрессии гена *VTC2*, включая в ответ на холодостресс, а также показана корреляция уровня экспрессии *VTC2* с содержанием аскорбата в зеленых листьях (положительная) и белой части (отрицательная) (Анисимова и др., 2021а, б).

Идентифицированы и изучены три гена *MDHAR*, и выявлена положительная корреляция уровня мРНК *MDHAR4* с содержанием АК в белой части и зеленых листьях растения (Филушин и др., 2021). Других публикаций по анализу генов метаболизма АК у лука-порей не найдено.

Целью настоящей работы стали получение и сравнительная характеристика гибридов F₁ лука-порей от 13 скрещиваний образцов лука-порей отечественной и зарубежной селекции по содержанию витамина С и экспрессии генов биосинтеза (*PGI*, *PMI*, *PMM*, *VTC1b*, *GME1*, *GME2*, *VTC2*, *GPP*, *GalDH* и *GalLDH*) и рециклинга (*APX1*, *APX2*, *MDHAR1*, *MDHAR4*, *MDHAR5*, *DHAR2*, *GR*) аскорбата в проростках, зеленых листьях и отбеленной части стебля взрослых растений. Проведена оценка корреляций между уровнем экспрессии анализируемых генов и количеством витамина С в тканях лука-порей.

Материалы и методы

Для исследования использовали семена гибридов F₁ от 13 скрещиваний (2022 г.) сортов/линий лука-порей отечественной и зарубежной селекции (табл. 1). Семена F₁ высевали (50 шт. от каждого скрещивания) в грунт (экспериментальная установка искусственного климата, ФИЦ Биотехнологии РАН; день/ночь – 16 ч/8 ч, 23 °C/21 °C), оценивали всхожесть и полученное потомство задействовали в анализе.

Надземную часть проростков (30 суток после всходов) гибридов F₁, а также зеленые листья и отбеленный ложный стебель взрослых растений на товарной стадии развития использовали в дальнейшем анализе.

Под товарной стадией развития подразумеваются растения до фазы цветения, рост которых завершен, а длина и диаметр стебля достигли финальных размеров. Образцы растительной ткани растирали в фарфоровой ступке в жидком азоте и использовали для определения содержания (мг/100 г сырой массы) витамина С, сахарозы, глюкозы и фруктозы с помощью наборов Enzytec L-Ascorbic Acid, Enzytec™ Liquid Sucrose/D-Glucose и Enzytec™ Liquid D-Glucose/D-Fructose (R-Biopharm AG, Германия), следуя протоколам, предоставленным производителем. Каждый из типов образца (проросток, зеленый лист или ложный стебель) растирали целиком и хранили при –80 °C, отбирая необходимую навеску для дальнейших анализов (определение концентрации аскорбата и экспрессии генов).

Экспрессию генов L-галактозного пути биосинтеза и пути рециклинга аскорбата определяли с помощью количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Суммарную РНК выделяли из 0.2–0.5 г измельченной ткани с использованием RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Германия). Примеси ДНК удаляли с помощью RNase-free DNase set (QIAGEN) и кДНК синтезировали в системе GoScript Reverse Transcription System (Promega, США). Концентрацию кДНК определяли с применением Qubit® Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, США), Qubit RNA HS Assay Kit (Invitrogen, США) и 3 нг препарата использовали в реакцию ПЦР-РВ. Ген-специфичные праймеры для ПЦР-РВ были разработаны на основе доступных в NCBI геномных/транскриптомных данных *A. porrum* (PRJNA310797) и *A. sativum* (PRJNA606385, PRJNA607255) (табл. 2).

Таблица 1. Список скрещиваний образцов лука-порей

Название скрещивания	Родительская пара	Всхожесть семян F ₁ , %
28 × 30	Голиаф × Веста	100
85 × 99	Килима × Gaуia	98
94 × 113	Электро × Казачок	99
62 × 80	к-2197 × Американский флаг	95
85 × 86	Килима × Balder	100
12 × 13	Herbstreusen × Amarello	100
81 × 95	Winterreusen × Siegfried	100
36 × 38	Слон × Элефант	100
68 × 43	к-2120 × к-2054	89
74 × Аллигатор	к-2042 × Аллигатор	55
38 × 121	Элефант × Матейко	100
68 × 44	к-2120 × к-2026	96
33 × 30	Летний бриз × Веста	100

Таблица 2. Последовательности используемых в работе праймеров для ПЦР-РВ

Ген	Последовательности (5'→3') праймеров (прямой/обратный)
<i>PGI</i>	CCATCGGAATTGGTGGTTCTG/ GTGCAATTTGGTGGTCGATTCC
<i>PMI</i>	CTGCTATTTCCGGCCCTTCTA/ ACATTCATCACCGTGAGCAG
<i>PMM</i>	TTCCTCGAGGTTGGGACAAGA/ TGTATGGCCGACAGTACGCT
<i>VTC1b</i>	TCGCTAACAAAGCCAATGATCCTG/ GCTCTGTCTCCTGAGAACATG
<i>GME1</i>	ACACGATGATTAGTTTCAACATG/ CTTGAGGCTCAGCAGGCCA
<i>GME2</i>	CAGGATTAATGGGGTCAAAGAC/ CTTGAGGCTCAGCAGGCCA
<i>VTC2</i>	GGTGTAAGCGTGTGTATCTG/ TTCCAAACAGCGGGATTGAC
<i>GPP</i>	GGTCACAGAAACTGATAAAGCATG/ CATCAGTAAGTAGAGCAGTGCC
<i>GaLDH</i>	CTACCACACTTGGTGGACAC/ CCTCTGTCCGCAAGGCCTTT
<i>GaLLDH</i>	TGGACTGCTAGGAGCAAGAGT/ GCCTTGCGTTAGCGTCTGA
<i>APX1</i>	GATTTATTGCGGAGAAGAAGTGC/ CAACTCAGCCTTGTGCCTCA
<i>APX2</i>	GAAGGAAATTGAGCGGGCTC/ GAGCCATTTGGGCCACCTG
<i>MDHAR1</i>	CTGGCAGTAAGCGTTCTCCA/ TTTGAACCTTGGCGAGCTTG
<i>MDHAR4</i>	CGCAGGTTATGCAGCTTCTG/ CGCCTACGCAAGTATGAAATGC
<i>MDHAR5</i>	GGGGCTCGCATAGATAAGTTGA/ TCCCACGGACTTATTCAGCC
<i>DHAR2</i>	AGTTCTGCAAGCAAAGCCTGC/ TCCCAGGCCATCTTTGGTTAC
<i>GR</i>	CGGCAAAAGAAAGTTCTCAGAGG/ AGGAGACTGCTCAGTGTGGAA

В реакции задействовали набор «2.5× реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I и ROX» (ООО «Синтол», Россия). ПЦР-РВ проводили на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США) по программе: 5 мин при 95 °С, 40 циклов (15 с при 95 °С; 40 с при 60 °С). Для нормализации экспрессии генов использовали два референса: гены глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*) и *Ubiquitin (UBQ)* (Анисимова и др., 2021а). Анализ выполняли в двух биологических и трех технических повторах. Обработку результатов и корреляционный анализ осуществляли с помощью GraphPad Prism v. 9.5.1 (GraphPad Software Inc., США) (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).

Морфологическую характеристику (длина, толщина и масса отбеленной части (ложный стебель)) растений лука-порей проводили в сентябре 2023 г., используя по 10 образцов каждого анализируемого гибрида. Растения были выращены в коллекционном луковом питомнике (координаты теплицы 55.655182, 37.206576 (Федеральный научный центр овощеводства, Московская область, канд. с.-х. наук Т.М. Середин).

Результаты

В настоящей работе охарактеризовано 13 гибридов F₁, полученных от скрещиваний отечественных и зарубежных сортов/линий лука-порей (см. табл. 1).

В проростках F₁ были определены содержание аскорбата, а также уровень экспрессии генов L-галактозного пути биосинтеза аскорбата и пути его рециклинга (рис. 1 и 2).

Наибольшее количество витамина С обнаружено в проростках от скрещиваний 36 × 38 и 81 × 95, наименьшее – от скрещиваний 33 × 30 и 74 × Аллигатор, тогда как остальные образцы показывали промежуточные значения (5–7.5 мг/100 г сырой массы) (см. рис. 1).

На тепловой карте экспрессии генов синтеза аскорбата образцы 36 × 38 и 81 × 95 заняли соседние позиции в кластере, в котором также присутствовали и образцы со средним (85 × 86, 38 × 121) и наименьшим (74 × Аллигатор)

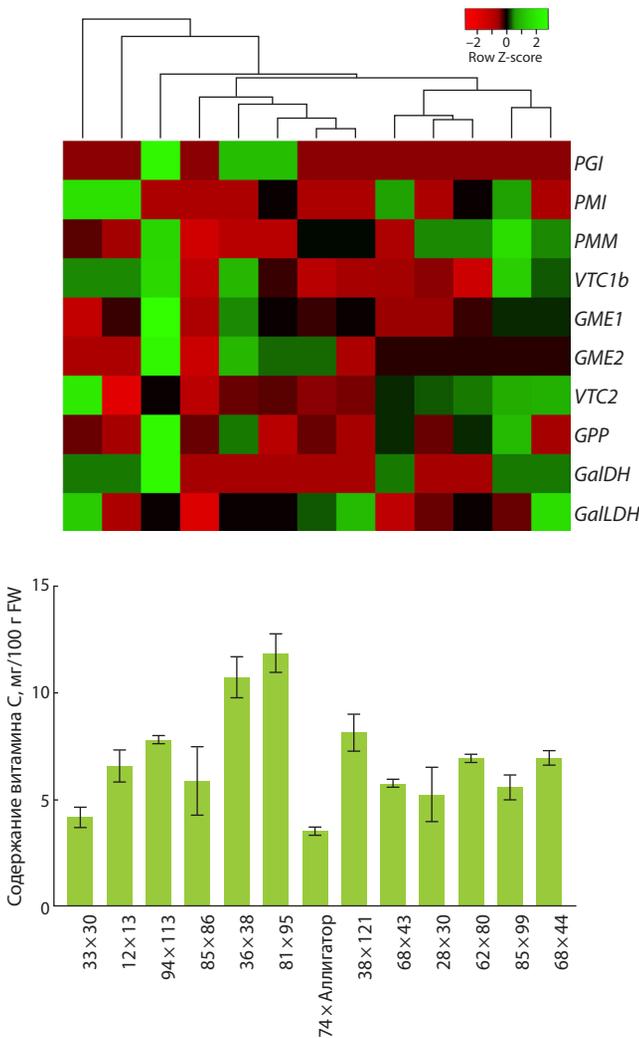


Рис. 1. Тепловая карта экспрессии генов L-галактозного пути биосинтеза аскорбата (*PGI*, *PMI*, *PMM*, *VTC1b*, *GME1*, *GME2*, *VTC2*, *GPP*, *GalDH* и *GalLDH*) и содержание витамина С (мг/100 г сырой массы) в проростках гибридов F₁ от 13 скрещиваний сортов/линий лука-пороя.

содержанием аскорбата. Пять образцов (68 × 43, 28 × 30, 62 × 80, 85 × 99, 68 × 44), характеризовавшихся сходным средним содержанием аскорбата, сформировали отдельный кластер (см. рис. 1).

На тепловой карте экспрессии генов рециклинга аскорбата пары гибридов с наибольшим (36 × 38, 81 × 95) и наименьшим (33 × 30, 74 × Аллигатор) содержанием витамина С сформировали два отдельных обособленных кластера. Отметим также два кластера, 94 × 113/68 × 44 и 85 × 99/85 × 86, образцы в которых были высоко сходны по генной экспрессии и содержанию аскорбата (см. рис. 2).

Для дальнейшего анализа были выбраны гибриды, контрастные по количеству витамина С в проростках, 36 × 38 и 81 × 95 (наибольшее), 33 × 30 и 74 × Аллигатор (наименьшее). В сентябре 2023 г. по 10 взрослых растений F₁ от данных скрещиваний были охарактеризованы по содержанию аскорбата и уровню экспрессии генов L-галактозного пути биосинтеза аскорбата и генов рециклинга аскорбата в зеленых листьях и отбеленном ложном стебле.

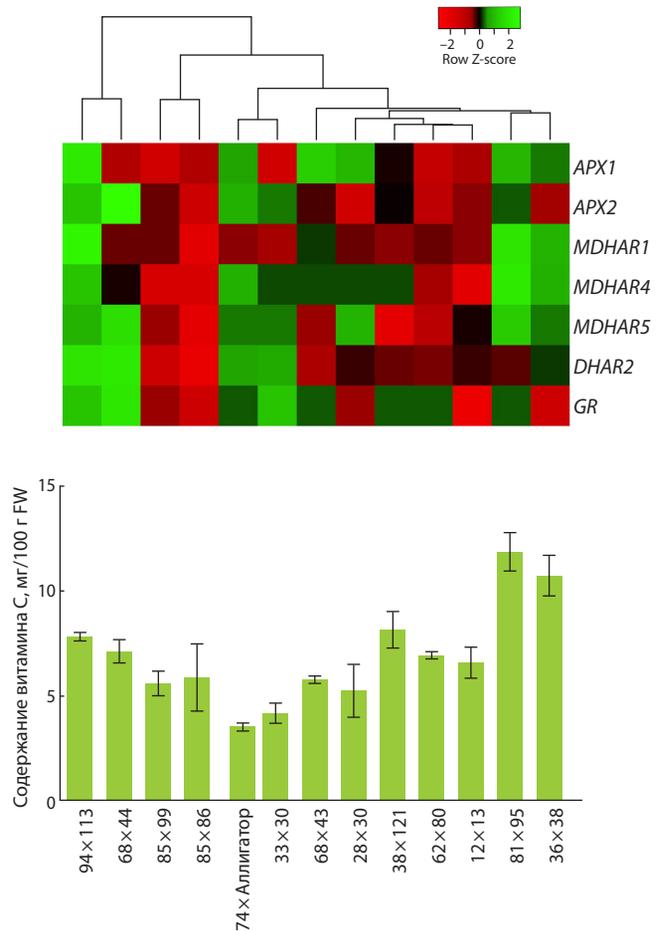


Рис. 2. Тепловая карта экспрессии генов рециклинга аскорбата (*APX1*, *APX2*, *MDHAR1*, *MDHAR4*, *MDHAR5*, *DHAR2*, *GR*) и содержание витамина С (мг/100 г сырой массы) в проростках гибридов F₁ от 13 скрещиваний сортов/линий лука-пороя.

Обнаружено, что зеленые листья растений 36 × 38 и 81 × 95 содержат сходное (~35 мг/100 г сырой массы) количество аскорбата, что ожидаемо оказалось существенно больше такового у растений 33 × 30 и 74 × Аллигатор (~25 и ~17 мг/100 г сырой массы соответственно). В отбеленных ложных стеблях растений всех четырех типов содержание аскорбата было значительно ниже, чем в зеленых листьях, и не превышало 6.5 мг/100 г сырой массы. При этом растения 33 × 30 и 74 × Аллигатор имели сходные средние значения, а оставшиеся два образца характеризовались наименьшим (81 × 95) и наибольшим (36 × 38) количеством витамина С (рис. 3).

Анализ генной экспрессии показал, что у всех четырех образцов уровень экспрессии генов биосинтеза аскорбата в отбеленной части ложного стебля преимущественно выше, чем в зеленых листьях, за исключением генов *PMI*, *PMM*, *VTC2* и *GalLDH* (рис. 4). Какой-либо зависимости кластеризации образцов на тепловой карте экспрессии от содержания аскорбата (см. рис. 3) не наблюдалось (см. рис. 4).

Наибольшим уровнем мРНК генов рециклинга аскорбата отличались зеленые листья анализируемых растений, кроме генов *APX1*, *MDHAR5* и *DHAR2* с более высокой

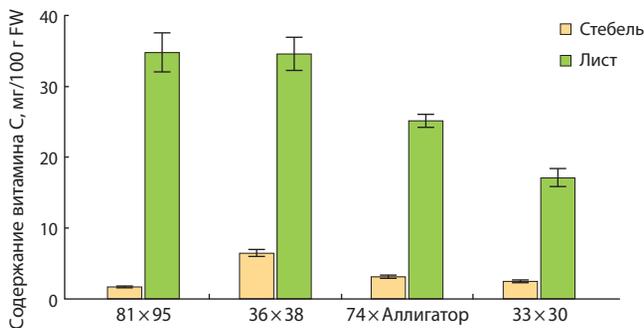


Рис. 3. Содержание аскорбата в отбеленном ложном стебле и листьях взрослых растений гибридов F₁ лука-порей от скрещиваний 81 × 95, 36 × 38, 74 × Аллигатор и 33 × 30.

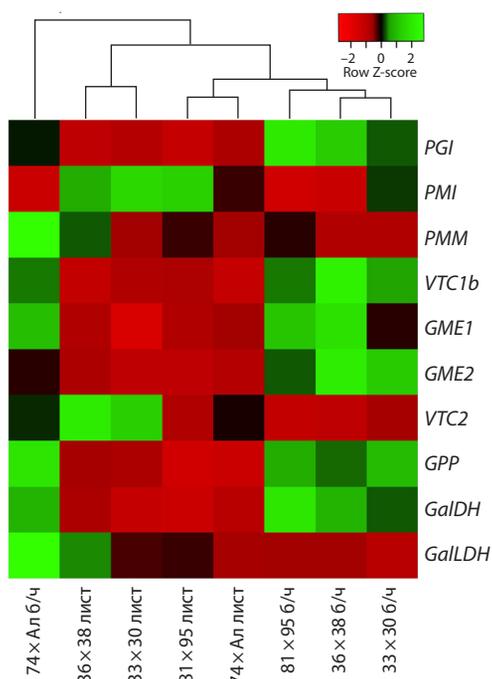


Рис. 4. Тепловая карта экспрессии генов L-галактозного пути биосинтеза аскорбата в белой части (б/ч) и листовой ткани растений гибридов F₁ лука-порей от скрещиваний 81 × 95, 36 × 38, 74 × Аллигатор и 33 × 30.

экспрессией в ложном стебле (рис. 5). При этом на тепловой карте наблюдалось четкое формирование двух кластеров, объединяющих ложные стебли и зеленые листья соответственно (см. рис. 5). В «листовом» кластере обособлены образцы с повышенным содержанием витамина С в листьях (36 × 38 и 81 × 95), и при кластеризации только по уровню экспрессии генов в листьях образцы строго разделяются на группы с высоким (36 × 38 и 81 × 95) и низким (74 × Аллигатор, 33 × 30) содержанием витамина С (рис. 6). При этом листья образцов 36 × 38 и 81 × 95 (в сравнении с образцами 74 × Аллигатор и 33 × 30) отличаются значительно более высокой экспрессией генов рециклинга аскорбата за редким исключением (*APX1* и *MDHAR5* у растений 81 × 95) (см. рис. 6).

В случае кластера «ложного стебля» зависимости группирования образцов от количества аскорбата не на-

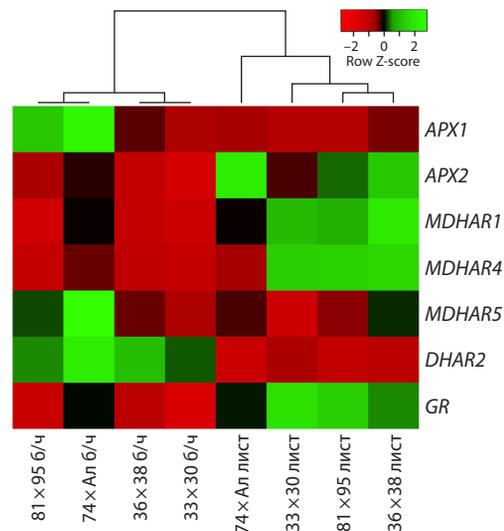


Рис. 5. Тепловая карта экспрессии генов пути рециклинга аскорбата в белой части (б/ч) и листовой ткани растений гибридов F₁ лука-порей от скрещиваний 81 × 95, 36 × 38, 74 × Аллигатор и 33 × 30.

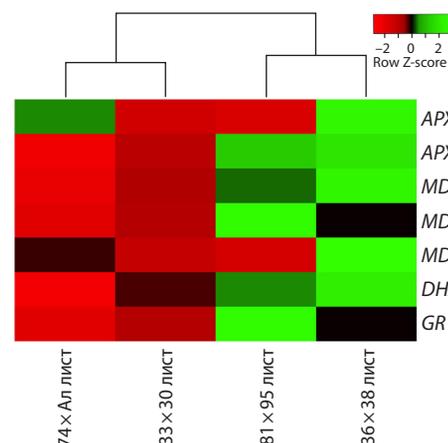


Рис. 6. Тепловая карта экспрессии генов пути рециклинга аскорбата в листовой ткани растений гибридов F₁ лука-порей от скрещиваний 74 × Аллигатор, 33 × 30, 81 × 95 и 36 × 38.

блюдалось. К примеру, растения 74 × Аллигатор и 33 × 30 отнесены в отдельные группы (см. рис. 5), несмотря на сходное содержание витамина С (см. рис. 3).

Далее с использованием данных по проросткам и взрослым растениям был проведен поиск возможных взаимосвязей между содержанием аскорбата и уровнем экспрессии генов, в результате чего была обнаружена высокая корреляция для генов рециклинга аскорбата *APX2*, *MDHAR1* и *MDHAR4* ($r = 0.94, 0.95$ и 0.74 соответственно) в листовой ткани (рис. 7).

Анализируемые четыре гибридные линии были охарактеризованы по морфологическим признакам. Показано, что гибрид 81 × 95 формирует мощный ложный стебель длиной 25–30 см, толщиной 3.5–5 см, массой 250–350 г, с плотным расположением листьев. Гибрид 36 × 38 имеет мощный ложный стебель длиной 20–25 см, толщиной

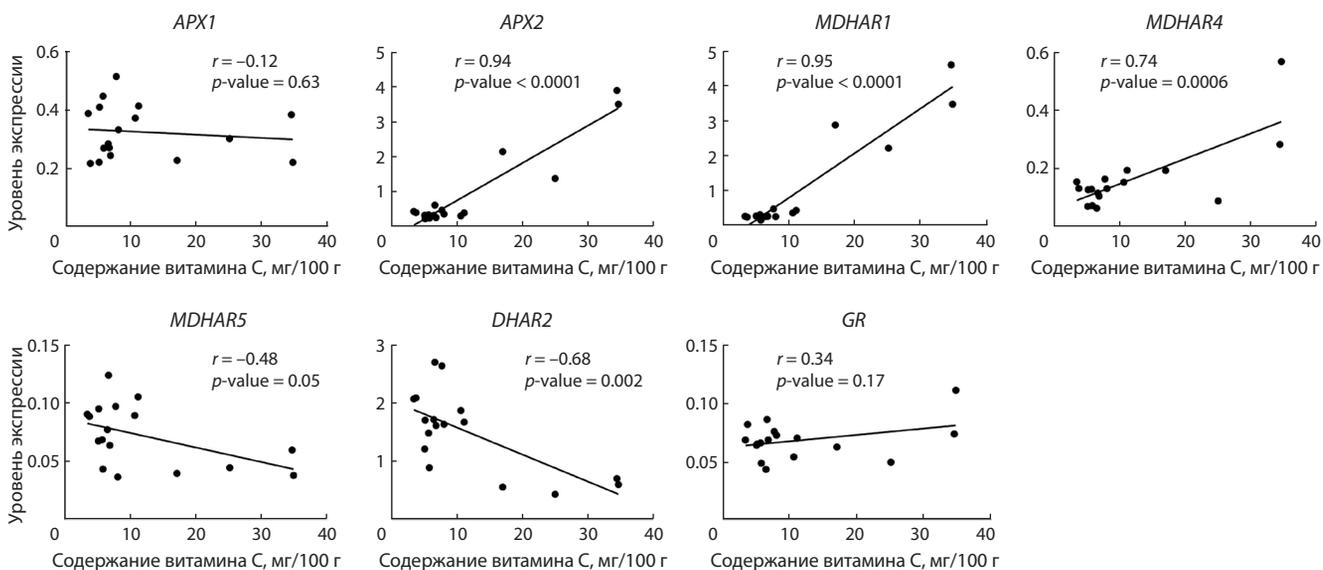


Рис. 7. Линейная регрессия содержания витамина С и уровней экспрессии генов пути рециклинга аскорбата в листовой ткани растений гибридов F₁ лука-порей.

r – коэффициент корреляции Пирсона (наличие корреляции при p < 0.01).



Рис. 8. Внешний вид товарной части растений гибридов F₁ от скрещиваний 81 × 95, 36 × 38, 74 × Аллигатор и 33 × 30.

Масштабная линия 10 см.

3–4.5 см, массой 200–300 г, с плотным расположением листьев (рис. 8). Оба гибрида характеризуются 100 % всхожестью семян (см. табл. 1).

Ложный стебель гибрида 74 × Аллигатор длинный (20–25 см) и тонкий (1.5–2.5 см), массой 100–150 г; луковица выражена; растения значительно отстают в росте от остальных исследуемых гибридов. Гибриду 33 × 30 свойствен мощный неплотный ложный стебель длиной 20–25 см, толщиной 2.5–3.5 см и массой 150–250 г; лу-

ковица выражена (см. рис. 8). Гибриды отличаются 55 % (74 × Аллигатор) и 100 % (33 × 30) всхожестью семян (см. табл. 1).

Гибриды также были дополнительно изучены по содержанию растворимых сахаров в зеленых листьях и отбеленной части ложного стебля. Показано, что в сравнении с листьями ложный стебель обогащен сахарозой и содержит в ~1.5–3 раза меньше фруктозы (рис. 9). Количество глюкозы оказалось более вариabельным: сходным между

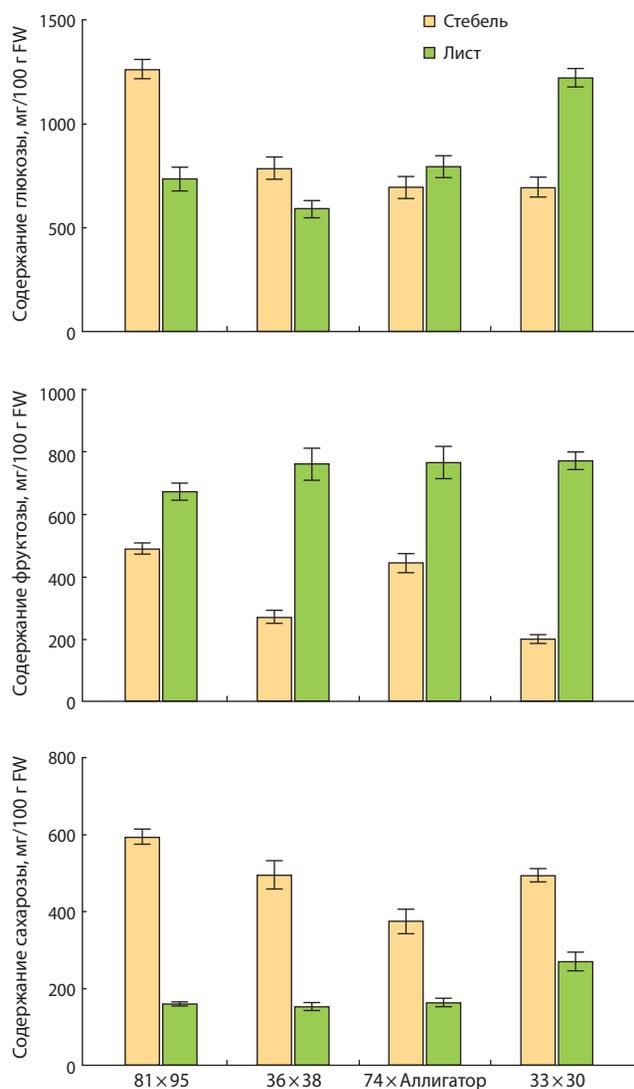


Рис. 9. Содержание глюкозы, фруктозы и сахарозы в ложном стебле и листовой ткани взрослых растений гибридов F₁ лука-порей от скрещиваний 81 × 95, 36 × 38, 74 × Аллигатор и 33 × 30.

листьями и стеблем (36 × 38, 74 × Аллигатор), наибольшим в стебле (81 × 95), наибольшим в листьях (33 × 30) (см. рис. 9). Рассматривая употребляемую в пищу отбеленную часть стебля, можно сказать, что наибольшие количества всех трех сахаров содержатся у гибрида F₁ от скрещивания 81 × 95; наименьшее количество фруктозы – 33 × 30, сахарозы – 74 × Аллигатор; содержание глюкозы сходно у трех гибридов: 36 × 38, 33 × 30, 74 × Аллигатор (см. рис. 9).

Обсуждение

В настоящей работе проведен анализ 13 гибридов F₁ лука-порей, имеющих всхожесть семян выше 50 % (см. табл. 1), по содержанию аскорбата и экспрессии генов биосинтеза и рециклинга аскорбата в проростках (см. рис. 1 и 2). Колебания количества витамина С в пределах 30 % между гибридами (см. рис. 1) согласовались с показанными ранее различиями в концентрации аскорбата и зеленых листьях и в ложном стебле лука-порей (Lundegårdh et al., 2008; Bernaert et al., 2012).

Отобранные образцы двух гибридов F₁, 81 × 95 и 36 × 38, перспективные в связи с наибольшим содержанием витамина С, были далее изучены на товарной стадии развития в сравнении с двумя гибридами F₁ (74 × Аллигатор, 33 × 30) с наименьшим количеством витамина С. Характеристика включала анализ концентрации аскорбата/растворимых сахаров и экспрессии генов метаболизма аскорбата в зеленых листьях и отбеленной части ложного стебля, а также морфологическое описание (см. рис. 3–9).

Было определено, что данные, полученные при анализе содержания аскорбата в проростках, можно применять для оценки признака только в случае зеленых листьев взрослых растений, тогда как отбеленная часть ложного стебля показывает вариабельные данные (см. рис. 3). Один из перспективных гибридов (36 × 38) продемонстрировал наибольшее накопление витамина С в ложном стебле, тогда как второй гибрид (81 × 95) – напротив, наименьшие среди четырех образцов количества аскорбата (см. рис. 3).

Сопоставление данных по содержанию аскорбата и кластеризации исследуемых образцов по профилю экспрессии генов синтеза витамина С (см. рис. 4) выявило, что профиль экспрессии всех генов пути нельзя использовать для заключений о количестве аскорбата в листьях или стебле лука-порей. В том числе не подходит для предсказания и уровень экспрессии гена *VTC2* (см. рис. 1 и 4), для которого ранее была предложена связь с накоплением аскорбата (Ali et al., 2019; Broad et al., 2020), в том числе у лука-порей (Анисимова и др., 2021а).

Тем не менее установленный нами у гибридов уровень транскриптов гена *VTC2* может помочь с определением степени стрессоустойчивости образцов, поскольку уровень экспрессии *VTC2* положительно связывают с устойчивостью растений к абиотическим стрессовым факторам (Ali et al., 2019; Broad et al., 2020). На основе наших результатов (экспрессия в проростках или зеленых листьях (см. рис. 1 и 4)), можно выделить шесть перспективных гибридов, среди которых находятся и два из четырех выбранных в анализ (исследуемые 33 × 30 и 36 × 38, а также 28 × 30, 62 × 80, 85 × 99, 68 × 44).

Сопоставление биохимических данных и кластеризации гибридов по экспрессии генов рециклинга аскорбата (см. рис. 5 и 6) позволило предположить наличие зависимости уровня накопления аскорбата в листьях или стебле лука-порей от профиля экспрессии генов пути. Кроме того, так как повышенную активность генов *MDHAR* и кодируемых ими ферментов связывают со стрессоустойчивостью растений (Zhang et al., 2015; Qi et al., 2020), на основе наших данных по трем генам *MDHAR* (см. рис. 2, 5, 6) можно выделить семь перспективных гибридов, среди которых находятся и все четыре образца, выбранные в анализ (исследуемые 81 × 95, 36 × 38, 33 × 30, 74 × Аллигатор, а также 94 × 113, 68 × 44, 28 × 30).

Проведенный нами поиск статистически достоверных зависимостей между содержанием аскорбата и уровнем экспрессии генов метаболизма аскорбата обнаружил корреляции только в зеленой ткани растений (проростки, зеленые листья) и лишь для трех генов рециклинга аскорбата, *APX2*, *MDHAR1* и *MDHAR4* (см. рис. 7). Это

подтверждает выявленную нами ранее положительную связь уровня мРНК *MDHAR4* с содержанием витамина С в растениях лука-порей (Филлюшин и др., 2021).

Характеристика исследуемых гибридов по содержанию растворимых сахаров в зеленых листьях и отбеленной части ложного стебля показала отсутствие какой-либо зависимости от концентрации аскорбата (см. рис. 9). Тем не менее, учитывая полученные данные, можно предполагать большую питательную ценность отбеленной части ложного стебля у гибрида F₁ 81 × 95, отличающегося и наибольшим количеством аскорбата.

Морфологическое описание анализируемых гибридов F₁ выявило, что наибольшие количества сахаров (см. рис. 9) соответствуют наибольшему размеру и массе ложного стебля у образца от скрещивания 81 × 95. Остальные три гибрида с учетом усредненных данных по всем трем типам сахаров в отбеленной части (суммарно 1500–1600 мг/100 г сырой массы (см. рис. 9)) соответствуют сходной длине ложного стебля (20–25 см vs 25–30 см у 81 × 95). Однако варианты других параметров стебля (толщина, масса) у данных трех гибридов никак не согласуются ни с суммой сахаров, ни с содержанием каждого отдельного вида сахара.

Заклучение

Таким образом, характеристика гибридов F₁ лука-порей от 13 скрещиваний позволила выделить девять образцов, перспективных с точки зрения стрессоустойчивости: 81 × 95, 36 × 38, 33 × 30, 74 × Аллигатор, 94 × 113, 28 × 30, 62 × 80, 85 × 99, 68 × 44. Из них восемь гибридов показали 95–100 % всхожесть семян (исключение: 74 × Аллигатор, 55 %). Два гибрида, 81 × 95, 36 × 38, отличались наибольшим содержанием аскорбата в зеленой ткани (проростки, зеленые листья) растения и один, 36 × 38, – в отбеленной части ложного стебля, употребляемой в пищу. Гибрид 81 × 95 также накапливал наибольшее количество растворимых сахаров в отбеленной части. Найденная прямая зависимость содержания аскорбата от активности генов рециклинга аскорбата (*APX2*, *MDHAR1*, *MDHAR4*) в зеленых листьях может быть использована в селекции стрессоустойчивых гибридов с повышенным содержанием витамина С. Необходимы дальнейшие исследования возможной связи уровня экспрессии генов *APX2*, *MDHAR1*, *MDHAR4* и *VTC2* с устойчивостью растения к различным неблагоприятным факторам, результаты которых можно будет использовать в селекции стрессоустойчивых гибридов лука-порей.

Список литературы / References

Анисимова О.К., Середин Т.М., Щенникова А.В., Кочиева Е.З., Филлюшин М.А. Оценка содержания витамина С и экспрессии гена ГДФ-Л-галактозофосфорилазы (*VTC2*) у сортов лука-порей (*Allium porrum* L.). *Физиология растений*. 2021a;68(1):75–84. doi 10.31857/S0015330320060020
[Anisimova O.K., Seredin T.M., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z., Filyushin M.A. Estimation of the vitamin C content and GDP-L-galactose phosphorylase gene (*VTC2*) expression level in leek (*Allium porrum* L.) cultivars. *Russ J Plant Physiol*. 2021a;68(1):85–93. doi 10.1134/S1021443720060023]
Анисимова О.К., Щенникова А.В., Кочиева Е.З., Филлюшин М.А. Идентификация и полиморфизм гена ГДФ-Л-галактозофосфо-

риказы (*ApGGPI*) у сортов лука-порей. *Генетика*. 2021b;57(3):311–320. doi 10.31857/S0016675821030036
[Anisimova O.K., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z., Filyushin M.A. Identification and variability of the GDP-L-galactose phosphophorylase gene *ApGGPI* in leek cultivars. *Russ J Genet*. 2021b;57(3):311–318. doi 10.1134/S1021443720060023]
Филлюшин М.А., Анисимова О.К., Кочиева Е.З., Щенникова А.В. Корреляция содержания аскорбиновой кислоты и профиля экспрессии генов монодегидроаскорбатредуктаз (MDHARs) у лука-порей (*Allium porrum* L.). *Физиология растений*. 2021;68(5):501–508. doi 10.31857/S0015330321050031
[Filyushin M.A., Anisimova O.K., Kochieva E.Z., Shchennikova A.V. Correlation of ascorbic acid content and the pattern of monodehydroascorbate reductases (MDHARs) gene expression in leek (*Allium porrum* L.). *Russ J Plant Physiol*. 2021;68(5):849–856. doi 10.1134/S1021443721050034]
Ali B., Pantha S., Acharya R., Ueda Y., Wu L.-B., Ashrafuzzaman M., Ishizaki T., Wissuwa M., Bulley S., Frei M. Enhanced ascorbate level improves multi-stress tolerance in a widely grown indica rice variety without compromising its agronomic characteristics. *J Plant Physiol*. 2019;240:152998. doi 10.1016/j.jplph.2019.152998
Arrigoni O., De Tullio M.C. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1569(1-3):1–9. doi 10.1016/S0304-4165(01)00235-5
Bernaert N. Bioactive compounds in leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*): analysis as a function of the genetic diversity, harvest time and processing techniques. Doctoral dissertation. Ghent: Ghent University, 2013
Bernaert N., De Paeppe D., Bouten C., De Clercq H., Stewart D., Van Bockstaele E., De Loose M., Van Droogenbroeck B. Antioxidant capacity, total phenolic and ascorbate content as a function of the genetic diversity of leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*). *Food Chem*. 2012;134:669–677. doi 10.1016/j.foodchem.2012.02.159
Broad R.C., Bonneau J.P., Hellens R.P., Johnson A.A.T. Manipulation of ascorbate biosynthetic, recycling, and regulatory pathways for improved abiotic stress tolerance in plants. *Int J Mol Sci*. 2020;21:1790. doi 10.3390/ijms21051790
Bulley S., Laing W. The regulation of ascorbate biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol*. 2016;33:15–22. doi 10.1016/j.pbi.2016.04.010
Celebi-Toprak F., Alan A.R. In vitro gynogenesis in leek (*Allium ampeloprasum* L.). *Methods Mol Biol*. 2021;2287:171–184. doi 10.1007/978-1-0716-1315-3_7
Considine M.J., Foyer C.H. Redox regulation of plant development. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21(9):1305–1326. doi 10.1089/ars.2013.5665
Dowdle J., Ishikawa T., Gatzek S., Rolinski S., Smirnov N. Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling. *Plant J*. 2007;52:673–689. doi 10.1111/j.1365-3113X.2007.03266.x
Feng H., Liu W., Zhang Q., Wang X., Wang X., Duan X., Li F., Huang L., Kang Z. *TaMDHAR4*, a monodehydroascorbate reductase gene participates in the interactions between wheat and *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Plant Physiol Biochem*. 2014;76:7–16. doi 10.1016/j.plaphy.2013.12.015
García G., Clemente-Moreno M.J., Díaz-Vivancos P., García M., Hernández J.A. The apoplastic and symplastic antioxidant system in onion: response to long-term salt stress. *Antioxidants (Basel)*. 2020;12:67. doi 10.3390/antiox9010067
Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem*. 2010;48:909–930. doi 10.1016/j.plaphy.2010.08.016
Grzelak-Błaszczak K., Kołodziejczyk K., Badałek E., Adamicki F. Changes in the contents of mono-, di- and oligosaccharides in leek plants stored in cold room. *Eur Food Res Technol*. 2011;232(6):1027–1033. doi 10.1007/s00217-011-1476-y
Haroldsen V.M., Chi-Ham C.L., Kulkarni S., Lorence A., Bennett A.B. Constitutively expressed *DHAR* and *MDHAR* influence fruit, but

- not foliar ascorbate levels in tomato. *Plant Physiol Biochem.* 2011; 49:1244-1249. doi 10.1016/j.plaphy.2011.08.003
- Hemilä H. Vitamin C and infections. *Nutrients.* 2017;9(4):339. doi 10.3390/nu9040339
- Lanubile A., Maschietto V., De Leonardi S., Battilani P., Paciolla C., Marocco A. Defense responses to mycotoxin-producing fungi *Fusarium proliferatum*, *F. subglutinans*, and *Aspergillus flavus* in kernels of susceptible and resistant maize genotypes. *Mol Plant Microbe Interact.* 2015;28(5):546-557. doi 10.1094/MPMI-09-14-0269-R
- Lemma E., Yusuf Z., Desta M., Seyida S., Idris M., Mengistu S., Teneshu J. Physicochemical properties and biological activities of garlic (*Allium sativum* L.) bulb and leek (*Allium ampeloprasum* L. var. *porrum*) leaf oil extracts. *Sci World J.* 2022;2022:6573754. doi 10.1155/2022/6573754
- Leterrier M., Corpas F.J., Barroso J.B., Sandalio L.M., del Río L.A. Peroxisomal monodehydroascorbate reductase, genomic clone characterization and functional analysis under environmental stress conditions. *Plant Physiol.* 2005;138(4):2111-2123. doi 10.1104/pp.105.066225
- Lundegårdh B., Botek P., Schulzov V., Hajslov J., Strömberg A., Andersson H.C. Impact of different green manures on the content of S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides and L-ascorbic acid in leek (*Allium porrum*). *J Agric Food Chem.* 2008;56(6):2102-2111. doi 10.1021/jf071710s
- Qi Q., Yanyan D., Yuanlin L., Kunzhi L., Huini X., Xudong S. Overexpression of *SIMDHAR* in transgenic tobacco increased salt stress tolerance involving S-nitrosylation regulation. *Plant Sci.* 2020;299:110609. doi 10.1016/j.plantsci.2020.110609
- Sultana S., Khew C.Y., Morshed M.M., Namasivayam P., Napis S., Ho C.L. Overexpression of monodehydroascorbate reductase from a mangrove plant (*AeMDHAR*) confers salt tolerance on rice. *J Plant Physiol.* 2012;169:311-318. doi 10.1016/j.jplph.2011.09.004
- Swamy K.R.M., Gowda R.V. Leek and shallot. In: Peter K.V. (Ed.) *Handbook of Herbs and Spices.* Vol. 3. 2006;365-389. doi 10.1533/9781845691717.3.365
- Yamada K., Osakabe Y. Sugar compartmentation as an environmental stress adaptation strategy in plants. *Semin Cell Dev Biol.* 2018;83:106-114. doi 10.1016/j.semcdb.2017.12.015
- Yoon J., Cho L.H., Tun W., Jeon J.S., An G. Sucrose signaling in higher plants. *Plant Sci.* 2021;302:110703. doi 10.1016/j.plantsci.2020.110703
- Zhang Y., Li Z., Peng Y., Wang X., Peng D., Li Y., He X., Zhang X., Ma X., Huang L., Yan Y. Clones of *FeSOD*, *MDHAR*, *DHAR* genes from white clover and gene expression analysis of ROS-scavenging enzymes during abiotic stress and hormone treatments. *Molecules.* 2015;20:20939-20954. doi 10.3390/molecules201119741

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 01.07.2024. После доработки 08.10.2024. Принята к публикации 08.11.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-24

Морфологическая изменчивость и генетическая структура *Miscanthus sinensis* (Poaceae), культивируемого в лесостепи Западной Сибири

О.В. Дорогина ^{1,2} , И.Н. Кубан ¹, Г.А. Зуева ¹, Е.В. Жмудь ¹, О.Ю. Васильева ¹¹ Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия olga-dorogina@yandex.ru

Аннотация. *Miscanthus sinensis* Andersson (Poaceae), как и все другие виды рода *Miscanthus*, является растением муссонного климата, поэтому в суровых условиях лесостепи Западной Сибири не успевает сформировать жизнеспособные семена. При изучении большого числа образцов этого вида из коллекционного генофонда Центрального сибирского ботанического сада СО РАН, привезенных из различных районов Приморского края, впервые удалось отобрать две формы, S1 и S2 (selected), образующие в местных условиях в течение короткого вегетационного периода качественные зрелые семена, из которых были получены первое и второе, G1 и G2 (generation), репродуктивные поколения. Цель настоящего исследования – отбор, биоморфологическая характеристика раноцветущих декоративных форм *M. sinensis* и анализ генетического полиморфизма отобранных форм (S1, S2) и полученных поколений (G1, G2) с помощью маркеров ISSR. В условиях интродукции отобранные образцы *M. sinensis* характеризовались комплексной устойчивостью к болезням и вредителям, высокой декоративностью, ранними сроками цветения и образованием полноценных семян. При изучении генетического полиморфизма с помощью маркеров ISSR у родительских образцов S1 и S2 обнаружено от одного до трех уникальных ПЦР-фрагментов. Исследование генетической изменчивости в поколении G1 показало полное единообразие генотипов. В поколении G2 наблюдалась изменчивость, при этом нами найдено пять вариантов генотипов. В результате выявлены уникальные полиморфные фрагменты, длина которых варьировала от 300 до 3000 п. н.; с их помощью составлена генетическая формула для паспортизации отобранных нами форм *M. sinensis*. Эти формы характеризуются высокими репродуктивными способностями в условиях континентального климата, перспективны для селекции, а, благодаря своим биоморфологическим особенностям, – и для ландшафтного дизайна.

Ключевые слова: качество семян; декоративная форма *Miscanthus sinensis*; ISSR-маркеры; отобранные формы S1 и S2; репродуктивные поколения G1 и G2; паспортизация

Для цитирования: Дорогина О.В., Кубан И.Н., Зуева Г.А., Жмудь Е.В., Васильева О.Ю. Морфологическая изменчивость и генетическая структура *Miscanthus sinensis* (Poaceae), культивируемого в лесостепи Западной Сибири. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(2):210-218. doi 10.18699/vjgb-25-24

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Центрального сибирского ботанического сада СО РАН «Анализ биоразнообразия, сохранение и восстановление редких и ресурсных видов растений с использованием экспериментальных методов» (№ АААА-А21-121011290025-2), а также при финансовой поддержке проекта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № FSUS-2024-0024.

Morphological variability and genetic structure of *Miscanthus sinensis* (Poaceae) cultivated in the forest-steppe of Western Siberia

О.В. Dorogina ^{1,2} , I.N. Kuban ¹, G.A. Zueva ¹, E.V. Zhmud ¹, O.Yu. Vasilyeva ¹¹ Central Siberian Botanical Garden of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia olga-dorogina@yandex.ru

Abstract. *Miscanthus sinensis* Andersson (Poaceae) grows in monsoon climate. For this reason, when cultured under the conditions of a short growing season of Western Siberia, full-fledged seeds do not have time to form. We have studied a large number of specimens of this species from Primorsky Krai in the collection of the Central Siberian Botanical Garden, SB RAS. Using these samples, it was possible for the first time to select forms that produce high-quality mature seeds in local conditions during a short growing season, possibly due to spontaneous hybridization of early

flowering forms. We obtained the first and second (G1 and G2) generations from these seeds and checked for hybrids. The aim of this study is selection, biomorphological characterization of early flowering ornamental forms of *M. sinensis* and analysis of genetic polymorphism of the selected forms (S1, S2) and the obtained G1 and G2 generations using ISSR markers. Under the conditions of introduction, the selected samples of *M. sinensis* were characterized by complex resistance, high decorativeness, reached the ontogenetic state of mature generative plants and differed from other samples in the collection by early flowering and the formation of full-fledged seeds. Thus, the forms of *M. sinensis* we selected are promising for landscape design and breeding. When studying the genetic structure of G1, G2 and two generations of the sample using ISSR markers, three effective stable unique PCR fragments were identified. A study of the genetic variability of the resulting G1 generation showed complete uniformity of genotypes. In the G2 generation, variability was observed, and we found five sets of genotypes, which were also confirmed in the dendrogram. As a result, unique molecular polymorphic fragments were identified. Their length was 300–3000 bp, and the genetic formula for certification of *M. sinensis* was compiled.

Key words: quality of seeds; decorative form of *Miscanthus sinensis*; ISSR markers; S1 and S2 selected forms; G1 and G2 generations; certification

For citation: 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. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(2):210-218. doi 10.18699/vjgb-25-24

Введение

Род *Miscanthus* Andersson (веерник) относится к подтрибе Saccharinae (триба Andropogoneae, семейство Poaceae). Веерники – многолетние травянистые растения, характеризующиеся С4-типом фотосинтеза, высокой продуктивностью биомассы и относительной неприхотливостью, что позволяет рассматривать их в качестве перспективной биоэнергетической культуры (Nie et al., 2014). Вопросы биологии и продукционного процесса разных видов рода *Miscanthus* все чаще освещаются в современных работах российских (Гущина и др., 2018; Дорогина и др., 2018, 2022; Берсенева и др., 2020; Капустянчик и др., 2020; Анисимов и др., 2021; Якименко и др., 2021) и зарубежных (Chae et al., 2014; Gifford et al., 2014) исследователей. В них *M. sacchariflorus* (Maxim.) Hack., *M. sinensis* Andersson, и особенно *Miscanthus × giganteus* J.M. Greef, Deuter ex Hodk., Renvoize, рассматриваются в качестве источников биоэтанола и биоцеллюлозы. В настоящее время в лесостепи Западной Сибири выращивается сорт Сорановский, полученный путем отбора из природного материала *M. sacchariflorus* и представляющий собой ценную техническую культуру (Поцелуев, Капустянчик, 2018).

M. sinensis и *M. purpurascens* Andersson широко используются как декоративные злаки и уже представлены набором сортов, в том числе пестролистных. Наиболее популярен *M. sinensis*, который применяют для оформления берегов водоемов, в каменистых садах, рокариях, миксбордерах в качестве солитеров на газоне и для создания декоративных групповых посадок (Гречушкина-Сухорукова, 2022). В естественных условиях *M. sinensis* и *M. purpurascens* произрастают в регионах с муссонным климатом. Тем не менее, как показали многолетние исследования ритмов роста и развития, биоморфологии и онтогенеза, оба вида могут успешно выращиваться в условиях континентального климата, но *M. sinensis* имеет более высокий адаптивный потенциал (Дорогина и др., 2018). Считается, что в суровых условиях лесостепи Западной Сибири все виды мискантусов (веерников) не успевают сформировать полноценные семена (Зуева, 2020).

Коллекционный генофонд Центрального сибирского ботанического сада СО РАН (ЦСБС) постоянно пополняется новыми формами, сортами мискантуса из различных

мест обитания. При пополнении коллекции образцами из разных районов Приморья нами отобраны формы S1 и S2 (selected) *M. sinensis*, характеризующиеся в условиях континентального климата лесостепного Приобья формированием жизнеспособных семян, из которых было получено два поколения, G1 и G2 (generation). Эти формы также характеризовались ускоренными темпами сезонного развития и более компактным габитусом – образуют меньше вегетативной массы и раньше начинают формировать генеративные органы.

Цель настоящего исследования – отбор, биоморфологическая характеристика раноцветущих декоративных форм *M. sinensis* и анализ генетического полиморфизма отобранных форм S1 и S2 и полученных поколений G1 и G2 с помощью маркеров ISSR.

Материалы и методы

Семена *M. sinensis* были собраны в 2017 г. в ценопопуляции, произрастающей на п-ове Гамова Хасанского района Приморского края (42°58'02"N, 131°20'67"E), и посеяны на коллекционном участке декоративных растений ЦСБС СО РАН. В условиях лесостепи Западной Сибири (54°82'15"N, 83°10'46"E) обнаружено только два растения, у которых сформировались семена. Семена завязались на тех побегах, которые раньше всех прошли фазу цветения (с пяти побегов было собрано более 100 шт.). Эти отобранные адаптированные к местным климатическим условиям растения использовались в качестве исходных форм (S1 и S2) для получения последующих поколений G1 и G2.

Опыты закладывались в двух вариантах: в лабораторных условиях в чашках Петри и при посеве в почву в теплице. Динамику прорастания полученных семян, выявление наличия периода покоя, влияние факторов среды на их прорастание оценивали согласно лабораторно-теплично-грунтовому методу выращивания (Дюрягина, 1982). Как показали дальнейшие исследования, семена изучаемых видов мискантуса находились в состоянии не глубокого, а вынужденного покоя.

Вариант I. Семена *M. sinensis* закладывали для прорастания в лабораторных условиях при комнатной температуре (19–20 °C) в третьей декаде февраля в чашки

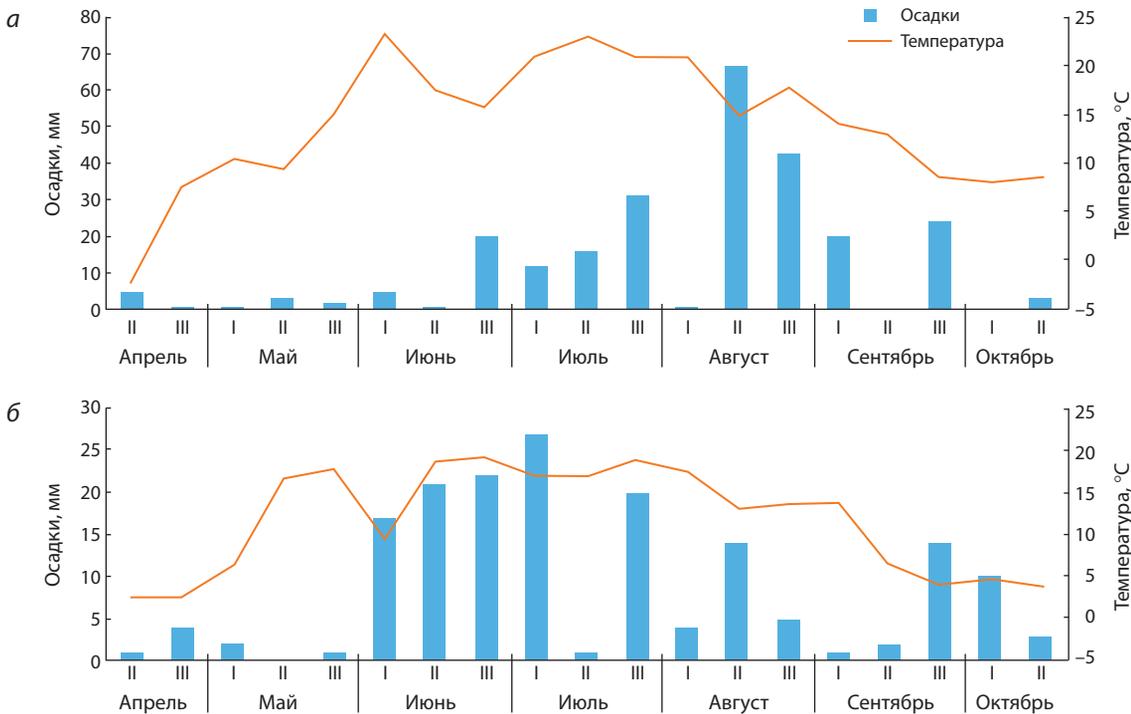


Рис. 1. Гидротермические условия вегетационного периода 2022 г. (а) и 2023 г. (б).

Петри в 2–3 повторностях, по 50 семян в каждой, на фильтровальную бумагу. Небольшое количество повторностей обусловлено тем, что при наличии незначительного урожая семян мы, разделяя его на повторности, старались следовать ГОСТам (Методы определения..., 1973). Освещение естественное, в качестве увлажнителя использована отфильтрованная водопроводная вода. Регулярные наблюдения проводили за состоянием семян, динамикой прорастания, характером роста первичного корня и первичного побега (первичного листа).

Вариант II. Семена *M. sinensis* высевали в стационарную теплицу зимой во второй декаде января в контейнеры с размером ячеек 2 × 2 см, заполненных почвенной смесью из плодородной земли, перегноя и песка. В небольшое углубление в почве (не более 1 см) помещали по три семени. Их слегка придавливали и осторожно увлажняли опрыскиванием, накрывали стеклом или пленкой, не заделывая в почву. Учет энергии прорастания и всхожести проводили на 7-е и 21-е сутки соответственно.

Гидротермические условия периодов вегетации рассчитывали по данным ближайшей к ЦСБС метеостанции «Огурцово». Вегетационные периоды в 2022 г. и, особенно, в 2023 г. характеризовались благоприятными метеос условиями для цветения и плодоношения *M. sinensis*, сходными по своей динамике с гидротермическими показателями естественных мест произрастания этого вида. В 2022 г. со второй декады июня и с первой декады июля складывались благоприятные гидротермические условия для роста и развития растений. Среднемесячная температура воздуха в июне и июле составила 17.3 и 18.9 °С соответственно (рис. 1, а). В 2023 г. засушливый период весной и в первой половине лета сменился обильным выпадением осадков в августе (см. рис. 1, б).

Метелки срезали для сбора семян в сухую погоду, после 10 октября (исходя из даты сбора (созревания) цветение данной особи должно было наступить в середине августа, а не в конце июля–начале августа).

Поскольку виды и формы вереников изучаются в коллекции (в соответствии с основной тематикой) в качестве декоративных злаков, выполняли следующие измерения и подсчеты: длина побега (см), длина метелки (см), число листьев на побеге (шт.).

Для изучения генетической изменчивости мы применяли метод электрофореза межмикросателлитных участков геномной ДНК (ISSR-анализ), так как известно, что он наиболее удобен, чувствителен и воспроизводим среди анонимных методов фрагментного анализа (Nei et al., 1979; Кашин и др., 2016). ДНК из высушенных в лабораторных условиях листьев *M. sinensis* выделяли методом СТАВ (Doyle J.J., Doyle J.L., 1987).

Для изучения изменчивости между исходными формами и двумя поколениями использовали ISSR-праймеры, апробированные нами для *M. sacchariflorus* (Poaceae) (Дорогина и др., 2018). В этой работе нами взято три наиболее информативных праймера, 17899А, 17898В, UBS-857, характеризовавшихся полиморфным и воспроизводимым паттерном (Дорогина и др., 2019, 2022).

Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе С1000 (Bio-Rad, США). Объем реакционной смеси был 25 мкл. В ее составе использованы следующие компоненты: 1.5 ед. Таq ДНК-полимеразы («Медиген», Россия); 2.7 mM MgCl₂, 0.8 mM ISSR-праймера («Медиген»); 2 мкл раствора ДНК; 2 мкл воды mQ H₂O. Амплификация состояла из нескольких этапов: денатурация ДНК в течение 90 с при 94 °С и 35 циклов, каждый из которых включал 40 с при 94 °С, 45 с – отжи праймера и

90 с – при 42–56 °С. Продолжительность заключительного этапа пролонгирования нуклеотидной цепи составила 5 мин при 72 °С.

Электрофоретическое разделение продуктов амплификации выполняли в 1.5 % агарозном геле в 1x TAE-буфере при напряжении 4 В/см. Для статистической обработки данных задействованы пакеты программ TREECON (Van de Peer, De Wachter, 1997). Каждый ISSR-маркер рассматривался как доминантный, генетические дистанции и уровень полиморфизма (P, %) каждого праймера рассчитывали по M. Nei, W.H. Li (1979).

Молекулярно-генетические формулы для паспортизации популяции *M. sinensis* были составлены по принципу, предложенному А.А. Новиковой с коллегами (2012). На основе амплифицированных ПЦР-фрагментов ДНК генетические паспорта представлены в виде генетических формул. Генетическая формула содержит сведения о примененном методе, праймерах и обнаруженных у изучаемого образца амплифицированных фрагментах ДНК. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью пакетов программ StatSoft EXCEL 6.0 и STATISTICA v.6.0. Для оценки достоверности отличий изменчивости морфометрических признаков использовали непараметрические критерии (U-тест Манна–Уитни).

Результаты

Морфологическая характеристика

Первые полноценные семена *M. sinensis* местной репродукции, завязавшиеся от свободного опыления у двух растений, которые образовали по несколько метелок с качественными зрелыми семенами, были собраны в 2020 г. В дальнейшем из этих семян были выращены растения репродукции первого (G1) и второго (G2) поколений.

Исследование ритмологических и биоморфологических особенностей отобранных форм *M. sinensis* показало, что

в условиях лесостепи Западной Сибири у них отмечено раннее весеннее отрастание и цветение, более раннее (в конце июля), чем у других растений, полученных из семян данного образца. В связи с этим успевали завязаться и вызреть полноценные семена. Цветение последующих побегов растягивается до октября. Для данных форм характерно образование компактных кустов с более короткими корневищами. Особую декоративность растениям придают бордовые побеги и раскидистые метелки (рис. 2).

Соломина густо покрыта гребнями, относится к прямостоячему или полуэректоидному морфотипу, ее высота варьирует в широких пределах, от 160 до 209 см (табл. 1). Листовые пластинки удлинённые, линейные (до 70 см), их ширина составляет от 0.6 до 1.2 см. Края листовых пластинок очень жесткие, средняя жилка белая. Метелка у данного образца *M. sinensis* слегка поникающая, характеризуется 10–25 ветвями, длиной 20–27 см (см. табл. 1). Центральная ось метелки короче разветвлений. Колоски парные. Один из колосков с короткой, а другой с длинной цветоножкой. Длина колосков достигает 4–7 мм. Колоски у основания опушены белыми волосками, длина которых может быть равна длине самого колоска. Эти особенности создают дополнительный декоративный эффект. Достоверных различий изменчивости морфометрических признаков у особей G1 и G2 нами не найдено.

В условиях интродукции изученный образец *M. sinensis* устойчив к местным климатическим условиям, соответствующим II–III зонам морозостойкости по шкале USDA (USDA Plant..., 2024), поэтому зимнего укрытия не требует. В течение пяти лет интродукции *M. sinensis* не поражался болезнями и вредителями и отличался засухоустойчивостью.

Изучение биологии прорастания семян двух поколений *M. sinensis* показало, что при выращивании в теплице начало прорастания в обоих поколениях наблюдалось уже на 3-и сутки; на 7-е сутки энергия всхожести у семян G2 составила на 10 % больше, чем у семян от G1 (табл. 2).



Рис. 2. *M. sinensis* на экспериментальных участках в ЦСБС СО РАН.
а – первое поколение, G1; б – второе поколение, G2.

Таблица 1. Морфометрические показатели побегов *M. sinensis* на коллекционном участке ЦСБС СО РАН по окончании вегетационного периода

Образцы	Длина побегов, см		Длина метелки, см		Число листьев, шт.	
S1	178.4		25.7		9.8	
S2	143.3		19.8		9.3	
	$M^* \pm m$	Cv	$M \pm m$	Cv	$M \pm m$	Cv
G1; N = 3	181.4 ± 14.3	13.7	22.4 ± 1.5	11.5	9.2 ± 0.5	10.0
G2; N = 7	169.4 ± 8.5	13.3	23.5 ± 1.4	16.0	7.9 ± 0.2	8.3

* M – среднее значение; m – ошибка среднего; Cv – коэффициент вариации (%).

Таблица 2. Прорастание семян двух поколений *M. sinensis* из семян репродукции ЦСБС СО РАН в лабораторных условиях и в теплице

Показатель	G1	G2
Лабораторная всхожесть (28.02.2023)		
Число семян	150	36
Энергия прорастания, %	84	94
Всхожесть, %	94	100
Посев в теплице (19.01.2023)		
Число семян	72	72
Энергия прорастания, %	78	72
Всхожесть, %	68.0	72.2

На этом массовое прорастание закончилось, и через 21 день всхожесть наблюдаемых образцов увеличилась еще на 10 % в G1, а у G2 взошли все семена.

Представители рода *Miscanthus* в естественных местобитаниях начинают вегетацию при достаточно высоких температурах, поэтому для выращивания рассады (онтогенетические состояния: проростки, ювенильные и иматурные) в теплице нами подобраны оптимальные сроки посева семян.

При посеве семян в конце второй декады января проростки активно росли и развивались, высота их на 10-й день достигала 3 см. Первый настоящий лист появился у большинства растений G2 на 12-й день после посева. Проростки G1 несколько отставали от G2 в развитии. Третий настоящий лист у единичных растений сформировался на 24-й день развития. На 50-й день после посева корневая система достигла 6–8 см в длину, что превышало глубину ячейки на 2–3 см. При этом листья у растений при переходе в иматурное состояние стали заметно желтеть по причине малого объема ячеек для роста и развития. Так как времени до высадки в открытый грунт оставалось еще более месяца, то растения были пересажены в емкости большего размера (7 × 7 см). После пересадки иматурные растения стали активно развиваться, и к моменту высадки в открытый грунт во второй декаде мая их высота варьировала от 9 до 31 см.

Таким образом, рассаду *M. sinensis* в тепличных условиях надо выращивать, проводя посев во второй половине февраля. В этом случае во второй половине мая у растений развивается разветвленная мочковатая корневая система, они переходят в фазу кущения и в данном состоянии готовы для высадки в открытый грунт при наступлении благоприятных температурных условий. Перед высадкой в открытый грунт растениям требуется закаливание. В прогретую землю высаживали рассаду на постоянное место на расстоянии 80–100 см друг от друга. Согласно нашим наблюдениям, у исследованных образцов семена хорошо вызревают и не требуют периода послеуборочного дозаривания, а лабораторные условия более благоприятны для проращивания семян.

Маркерный анализ

Изучение изменчивости в поколениях G1 и G2 с помощью маркеров ISSR показало в поколении G1 полное единообразие спектров амплификации. В поколении G2 наблюдалась изменчивость, при этом обнаружено пять вариантов генотипов (рис. 3).

На электрофореграмме в районе менее 10000 п. н. можно видеть компонент, присутствующий в каждом из исследованных образцов (см. рис. 3). У всех образцов, кроме 10, в области 2000–2500 п. н. имеется фрагмент от формы S2. В районе около 1000 п. н. у образцов 5 и 10 и в районе немного менее 750 п. н. у образцов 6 и 9 наблюдаются фрагменты, характерные для обеих форм.

Для отобранных нами перспективных исходных форм S1 и S2 с целью составления генетической формулы было выбрано три маркера, образующих наиболее полиморфные фрагменты (табл. 3). Длина полиморфных фрагментов составила от 300 до 3000 п. н. С помощью (AC)₈GT-прайма найдено 2 и 4 уникальных фрагмента, они характеризуются наибольшей длиной, 2100 и 3000 п. н. соответственно.

При использовании выявленных уникальных молекулярных полиморфных фрагментов и с учетом генетической формулы, предложенной для *Rhododendron canadense* А.А. Новиковой с коллегами (2012), генетические формулы для отобранных форм S1 и S2 *M. sinensis* выглядят следующим образом:

S1: ISSR/(AC)₈GT-510,1900/(CA)₆AG-620,900/(CA)₆GT-350,650,830

S2: ISSR/(AC)₈GT-700,900,2100,3000/(CA)₆AG-600,925/(CA)₆GT-300,640,850

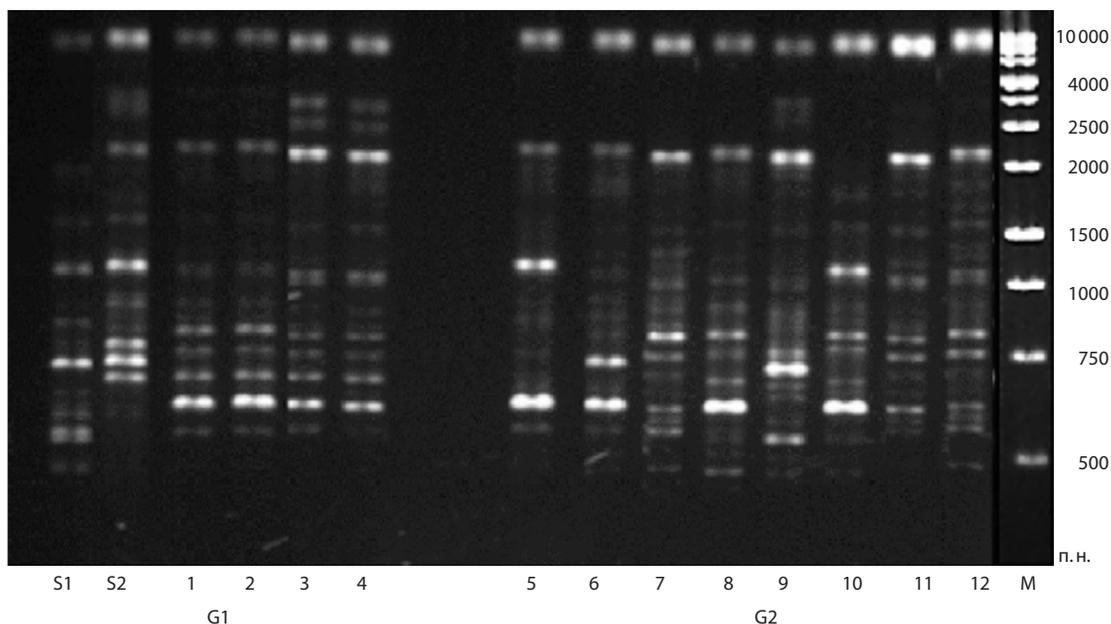


Рис. 3. Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных при амплификации ДНК у представителей *M. sinensis* и ISSR-праймера UBC-857.

S1, S2 – отобранные формы; дорожки 1–4 – первое поколение (G1), дорожки 5–12 – второе поколение (G2).

Таблица 3. Полиморфные фрагменты, уникальные для отобранных форм (S1, S2) *M. sinensis*

Праймер 5'–3'	Число уникальных фрагментов	Длина полиморфных фрагментов, п. н.
UBS875(AC) ₈ GT	2/16	S1 510, 1900
	4/16	S2 700, 900, 2100, 3000
17899A(CA) ₆ AG	2/9	S1 620, 900
	2/9	S2 600, 925
17898B(CA) ₆ GT	3/10	S1 350, 650, 830
	3/10	S2 300, 640, 850

Примечание. Числитель – число уникальных ПЦР-фрагментов; знаменатель – общее число ПЦР-фрагментов.

Обсуждение

В условиях теплицы прорастание семян двух поколений *M. sinensis* без предварительной обработки было отмечено уже на 3-и сутки, а на 21-й день у G2 взошли все семена. Наибольшая всхожесть семян (98 и 88 %) у *M. sinensis* и *M. sacchariflorus*, выращиваемых в Корее, наблюдалась при температуре 30 °C после скарификации 2 % NaOCl (Lee et al., 2012). Для выяснения причины низкой всхожести семян и поиска методов улучшения качества семян мискантуса польские ученые применяли обработку семян гипохлоритом натрия и коммерческими удобрениями (Orzeszko-Rywka, Rochalska, 2016).

Проведенный нами ранее анализ муссонного климата Владивостока показал, что вегетационный период в данном географическом пункте довольно продолжительный – 175–190 дней (Дорогина и др., 2019). Весенние заморозки характерны для начала мая, а осенние – для начала октября. Наиболее засушлив весенне-летний период, за которым следует длительное летне-осеннее переувлажнение с выпадением осадков до 60 % годовой нормы.

Вероятно, теплая, относительно засушливая первая половина лета в Приморье стимулирует интенсивное фор-

мирование именно генеративных, а не вегетативных органов мискантуса. Дожди во второй половине лета и начале осени способствуют наливу семян и формированию вегетативных органов, включая почки возобновления следующего года. Аналогичную динамику мы наблюдали в г. Новосибирске, в 2023 г. (см. рис. 1). То есть условия вегетационного периода в Новосибирске оказались более близкими к естественным.

Согласно литературным данным, в степной зоне Ставропольского края в течение вегетационных периодов 2019–2021 гг. 13 сортов *M. sinensis* сохраняли ритмические процессы, аналогичные природным (Гречушкина-Сухокурова, 2022). Так, начало вегетации наступало 12.04–17.04, а завершение ростовых процессов в фазе цветения у ранцветущих сортов – с 5.08–12.08, среднецветущих – 16.09–22.09, поздноцветущих – 12.10–18.10. Продемонстрировано также, что динамические показатели линейного роста генеративных побегов коррелируют с суммой эффективных температур вегетационного периода: в 2019 г. $r = 0.93–0.96$; в 2020 г. $r = 0.85–0.90$; в 2021 г. $r = 0.90–0.92$. Эти данные согласуются с результатами, полученными нами в лесостепи Западной Сибири. Ото-

бренные нами формы *M. sinensis* обладали способностью продолжительно вегетировать с сохранением декоративности вплоть до наступления зимнего покоя растений и могут успешно выращиваться из семян в условиях континентального климата.

В результате анализа данных, полученных для *M. sinensis* в популяции G2, нами выявлено пять вариантов генотипов, а G. Nie с коллегами (2014) показали, что в результате генотипирования частично фертильных гибридов в гибридной популяции *M. sinensis* обнаружено четыре генотипа, два из которых встречались у большинства растений. В Японии распространены тетраплоидный *M. sacchariflorus* и диплоидный *M. sinensis*, среди них наблюдается гибридизация (Tang et al., 2019).

Однако *M. sinensis* самонесовместим и имеет переносимые ветром пыльцу и семена, которые, как ожидается, ограничивают дифференциацию популяций. Степень дифференциации популяции с применением молекулярных маркеров оценена лишь частично для *M. sinensis* на отдельных ареалах Китая (Chou et al., 2000; Swaminathan et al., 2012).

Из литературных данных известно, что *M. sinensis* – растение с перекрестным типом опыления (Mitros et al., 2020). В целом для представителей этого рода присуща меж- и внутривидовая гибридизация, поэтому они характеризуются богатым генетическим разнообразием и наличием гетерозиса (Zhang et al., 2021). Генетическое разнообразие используется для создания гибридов мискантуса (веерника), которые могут давать более высокие урожаи биомассы и демонстрировать лучшую адаптивность к различным климатическим условиям, чем их родительские виды (Clark et al., 2015). Поскольку искусственная гибридизация нами не проводилась, а два растения, S1 и S2, произрастали на коллекционном участке на небольшом расстоянии друг от друга, кроме того, полученные растения G2 отличались от исходных отобранных форм S1 и S2 высотой, более мощными листьями и стеблями, мы предположили наличие гибридных растений в результате спонтанной гибридизации.

Согласно заключениям, сделанным ранее на основании гистохимического анализа побегов *M. sinensis*, некоторые экземпляры этого вида могут накапливать большое количество лигнина в сухих, завершивших вегетацию соломинах, что может затруднить его промышленную переработку (Дорогина и др., 2019). Поэтому данный вид более перспективен для отбора декоративных форм.

В большинстве литературных источников, посвященных различным аспектам изучения и практического применения видов, форм, гибридов и сортов веерников, отмечается, что в рамках собранного коллекционного генофонда требуются серьезные систематические уточнения (Greef et al., 1997; Nishiwaki et al., 2011; Gifford et al., 2014). Анализ генетического разнообразия может предоставить информацию также о происхождении и составе отдельных линий (Xu et al., 2013; Chen et al., 2022).

Обнаруженная нами фенотипическая и генетическая изменчивость у *M. sinensis* позволяет проводить отбор форм с различными хозяйственно ценными признаками для дальнейшего генетического улучшения и развития сорта с желаемыми признаками. Например, межвидовые

гибриды между *M. sacchariflorus* и *M. sinensis*, такие как *Miscanthus* × *giganteus*, перспективны в культуре для получения биомассы в регионах с умеренным климатом. Такие частично фертильные гибриды интересны для улучшения мискантуса как культуры биомассы, а также качественных характеристик видов *Miscanthus* (Tamura et al., 2016; Chen et al., 2022).

Таким образом, селекционная работа с мискантусом в суровых климатических условиях переходит на принципиально новый уровень – оказывается реальным не только испытывать по большей части случайно выбранные формы, привезенные из естественных местообитаний, но и работать с широким спектром потомства, полученного из семян местных репродукций различных поколений, что увеличивает возможности отбора форм с различными признаками. Перспективны дальнейшее изучение феноритмики, биологии прорастания семян, морфологии и гистохимического анализа побегов; генетического разнообразия; степени дифференциации популяции с использованием молекулярных маркеров и проведение отбора форм растений *M. sinensis*, обладающих ценными декоративными и техническими (технологическими) характеристиками.

Заключение

Отобранные нами формы *M. sinensis* обладают высокой декоративностью и устойчивостью в интродукции, завязывают жизнеспособные семена, перспективны для семенного размножения и селекции. Они не требуют полива для поддержания декоративности в засушливые периоды. *M. sinensis* успешно произрастает как на открытых, так и в затененных местах, сохраняет декоративность в зимних условиях, под снегом. Потомство исследуемого образца в условиях Западной Сибири проходит все этапы онтогенеза, формирует жизнеспособные семена, сохраняет декоративность с конца июля до октября.

Выявленные полиморфные фрагменты у *M. sinensis* могут быть использованы для идентификации и таксономии, а уникальные молекулярные полиморфные фрагменты, представляющие собой последовательности определенной длины, – основа для паспортизации популяций, форм и линий, перспективных для получения декоративных форм *M. sinensis*. В целом наши результаты помогут в разработке программ селекции с упором на создание сортов *Miscanthus* с элитным потенциалом.

Список литературы / References

- Анисимов А.А., Медведков М.С., Скороходова А.Н. Особенности формирования урожая различными видами мискантуса (*Miscanthus* spp.). В: Аграрная наука – сельскому хозяйству. Барнаул: Алтайский государственный аграрный университет, 2021; 115-116
[Anisimov A.A., Medvedkov M.S., Skorokhodova A.N. Yield formation features in different *Miscanthus* species (*Miscanthus* spp.). In: From Agrarian Sciences to Agriculture. Barnaul: Altai State Agricultural University Publ., 2021; 115-116 (in Russian)]
- Берсенева С.А., Ивлева О.Е., Маслова А.О. Технические возможности видов рода Мискантус (*Miscanthus* Anderss.) и перспективы его возделывания на территории Приморского края. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2020;7/2:6-10. doi 10.23670/IRJ.2020.97.7.033

- [Berseneva S.A., Ivleva O.E., Maslova A.O. Performance potential of species of *Miscanthus* Anderss. and genus and prospects of its cultivation in Primorsky Krai. *Meždunarodnyj Naučno-issledovatel'skij Žurnal = Int Res J.* 2020;7/2:6-10. doi 10.23670/IRJ.2020.97.7.033 (in Russian)]
- Гречушкина-Сухорукова Л.А. Динамика ростовых процессов и декоративное состояние мискантуса китайского при интродукции в степной зоне. *Аграрная наука.* 2022;(7-8):178-182. doi 10.32634/0869-8155-2022-361-7-8-178-182
- [Grechushkina-Sukhorukova L.A. Dynamics of growth processes and decorative state of *Miscanthus sinensis* during introduction in the steppe zone. *Agrarnaya Nauka = Agrar Sci.* 2022;(7-8):178-182. doi 10.32634/0869-8155-2022-361-7-8-178-182 (in Russian)]
- Гущина В.А., Володькин А.А., Остробородова Н.И., Агапкин Н.Д., Летучий А.В. Особенности роста и развития интродуцента мискантуса гигантского (*Miscanthus giganteus*) в условиях лесостепи Среднего Поволжья. *Аграрный научный журнал.* 2018;1:10-13. doi 10.28983/asj.v0i1.318
- [Gushchina V.A., Volod'kin A.A., Ostroborodova N.I., Agapkin N.D., Letuchiy A.V. Peculiarities of growth and development of introduction of *Miscanthus giganteus* in the conditions of forest-steppe zone in Middle Volga. *Agrarnyi Nauchnyi Zhurnal = Agrar Sci J.* 2018;1:10-13. doi 10.28983/asj.v0i1.318 (in Russian)]
- Дорогина О.В., Васильева О.Ю., Нуждина Н.С., Буглова Л.В., Гисматулина Ю.А., Жмудь Е.В., Зуева Г.А., Комина О.В., Цыбченко Е.А. Ресурсный потенциал некоторых видов рода *Miscanthus* Anderss. в условиях континентального климата лесостепи Западной Сибири. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2018;22(5):553-559. doi 10.18699/VJ18.394
- [Dorogina O.V., Vasilyeva O.Yu., Nuzhdina N.S., Buglova L.V., Gismatulina Yu.A., Zhmud E.V., Zueva G.A., Komina O.V., Tsybchenko E.A. Resource potential of some species of the genus *Miscanthus* Anderss. under conditions of continental climate of West Siberian forest-steppe. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2018;22(5):553-559. doi 10.18699/VJ18.394 (in Russian)]
- Дорогина О.В., Васильева О.Ю., Нуждина Н.С., Буглова Л.В., Жмудь Е.В., Зуева Г.А., Комина О.В., Кубан И.С., Гусар А.С., Дудкин Р.В. Формирование и изучение коллекционного генофонда ресурсных видов рода *Miscanthus* Anderss. в условиях лесостепи Западной Сибири. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2019;23(7):926-932. doi 10.18699/VJ19.568
- [Dorogina O.V., Vasilyeva O.Yu., Nuzhdina N.S., Buglova I.V., Zhmud E.V., Zueva G.A., Komina O.V., Kuban I.S., Gusar A.S., Dudkin R.V. The formation and the study of a collection of the *Miscanthus* resource species gene pool in the conditions of the West Siberian forest steppe. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2019;23(7):926-932. doi 10.18699/VJ19.568 (in Russian)]
- Дорогина О.В., Нуждина Н.С., Зуева Г.А., Гисматулина Ю.А., Васильева О.Ю. Особенности побегообразования в популяциях *Miscanthus sacchariflorus* (Poaceae) под влиянием экологических факторов и паспортизация с помощью ISSR-маркеров. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2022;26(1):22-29. doi 10.18699/VJGB-22-04
- [Dorogina O.V., Nuzhdina N.S., Zueva G.A., Gismatulina Yu.A., Vasilyeva O.Yu. Specific shoot formation in *Miscanthus sacchariflorus* (Poaceae) under different environmental factors and DNA passportization using ISSR markers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2022;26(1):22-29. doi 10.18699/VJGB-22-04]
- Дюрягина Г.П. К методике интродукции редких и исчезающих растений. *Ботанический журнал.* 1982;67(5):679-687
- [Duryagina G.P. On the method of introducing rare and endangered plants. *Botanicheskii Zhurnal.* = *Bot J.* 1982;67(5):679-687 (in Russian)]
- Зуева Г.А. Интродукция декоративных злаков и осок в Центральном сибирском ботаническом саду Сибирского отделения Российской академии наук. *Вестник Оренбургского государственного педагогического университета. Электронный научный журнал.* 2020;3(35):30-41. doi 10.32516/2303-9922.2020.35.3
- [Zueva G.A. Introduction of ornamental cereals and sedges in the Central Siberian Botanical Garden of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences. *Vestnik of Orenburg State Pedagogical University. Electronic Scientific Journal.* 2020;3(35):30-41. doi 10.32516/2303-9922.2020.35.3 (in Russian)]
- Капустянчик С.Ю., Бурмакина Н.В., Якименко В.Н. Оценка эколого-агрохимического состояния агроценоза с многолетним выращиванием мискантуса в Западной Сибири. *Агрохимия.* 2020;9:65-73. doi 10.31857/S0002188120090082
- [Kapustyanchik S.Yu., Burmakina N.V., Yakimenko V.N. Evaluation of the ecological and agrochemical state of agrocenosis with long-term growing of *Miscanthus* in Western Siberia. *Agrohimia.* 2020;9:65-73. doi 10.31857/S0002188120090082 (in Russian)]
- Кашин А.С., Крицкая Т.А., Шанцер И.А. Генетический полиморфизм *Tulipa gesneriana* L. по данным ISSR маркирования. *Генетика.* 2016;52(10):1134-1145. doi 10.7868/S0016675816100040
- [Kashin A.S., Kritskaya T.A., Schanzer I.A. Genetic polymorphism of *Tulipa gesneriana* L. evaluated on the basis of the ISSR marking data. *Russ J Genet.* 2016;52(10):1023-1033. doi 10.1134/S1022795416100045]
- Методы определения качества семян сельскохозяйственных культур. В: Семена и посадочный материал сельскохозяйственных культур. М.: Изд-во стандартов, 1973;238-405
- [Methods for testing crop and planting material quality. In: Crop Seeds and Planting Material. Moscow: Izdatel'stvo Standartov, 1973;238-405 (in Russian)]
- Новикова А.А., Шейкина О.В., Новиков П.С., Доронина Г.У. Оценка возможности применения ISSR-маркеров для систематизации и генетической паспортизации растений рода *Rhododendron*. *Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета.* 2012;82(82):916-926
- [Novikova A.A., Sheikina O.V., Novikov P.S., Doronina G.U. Estimation of the ISSR-markers application for systematization and genetic certification of genus *Rhododendron*. *Politematicheskij Setevoy Elektronnyj Nauchnyj Zhurnal Kubanskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Polythematic Online Scientific Journal of Kuban State Agrarian University.* 2012;82(82):916-926 (in Russian)]
- Поцелуев О.М., Капустянчик С.Ю. Оценка возможности выращивания мискантуса под покровом зерновых культур. *Вестник Алтайского государственного аграрного университета.* 2018;10(168):55-60.
- [Potseluyev O.M., Kapustyanchik S.Yu. Assessment of the feasibility of growing *Miscanthus* under a cover of cereal crops. *Vestnik Altayskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of Altai State Agricultural University.* 2018;10(168):55-60 (in Russian)]
- Якименко В.Н., Капустянчик С.Ю., Галицын Г.Ю. Возделывание мискантуса в континентальных регионах России. *Земледелие.* 2021;2:27-31. doi 10.24411/0044-3913-2021-10206
- [Yakimenko V.N., Kapustyanchik S.Yu., Galitsyn G.Yu. Cultivation of *Miscanthus* in continental regions of Russia. *Zemledelie = Agriculture.* 2021;2:27-31. doi 10.24411/0044-3913-2021-10206 (in Russian)]
- Chae W.B., Hong S.J., Gifford J.M., Rayburn A.L., Sacks E.J., Juvik J.A. Plant morphology, genome size, and SSR markers differentiate five distinct taxonomic groups among accessions in the genus *Miscanthus*. *GCB Bioenergy.* 2014;6:646-660. doi 10.1111/gcbb.12101
- Chen Z., He Yu., Iqbal Yu., Shi Y., Huang H., Yi Z. Investigation of genetic relationships within three *Miscanthus* species using SNP markers identified by SLAF-seq. *BMC Genomics.* 2022;23(1):43. doi 10.1186/s12864-021-08277-8
- Chou C.-H., Chiang Y.-C., Chiang T.-Y. Genetic variability and phylogeography of *Miscanthus sinensis* var. *condensatus*, an apomictic

- grass, based on RAPD fingerprints. *Can J Bot.* 2000;78(10):1262-1268. doi 10.1139/b00-102
- Clark L.V., Ryan S., Nishiwaki A., Toma Yo., Zhao H., Peng J., Yoo J.H., Heo K., Yu Ch.Y., Yamada T., Sacks E.J. Genetic structure of *Miscanthus sinensis* and *Miscanthus sacchariflorus* in Japan indicates a gradient of bidirectional but asymmetric introgression January. *J Exp Bot.* 2015;66(14):4213-4225. doi 10.1093/jxb/eru511
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull.* 1987;19:11-15
- Gifford J.M., Chae W.B., Juvik J.A., Swaminathan K., Moose S.P. Mapping the genome of *Miscanthus sinensis* for QTL associated with biomass productivity. *GCB Bioenergy.* 2014;7(4):797-810. doi 10.1111/gcbb.12201
- Greef J.M., Deuter M., Jung C., Schondelmaier J. Genetic diversity of European *Miscanthus* species revealed by AFLP fingerprinting. *Genet Resour Crop Evol.* 1997;44(2):185-195. doi 10.1023/A:1008693214629
- Lee K.Y., Zhang L., Lee G.-J. Botanical and germinating characteristics of *Miscanthus* species native to Korea. *Hort Environ Biotechnol.* 2012;53(6):490-496. doi 10.1007/s13580-012-0137-9
- Mitros T., Session A.M., James B.T., Wu G.A., Belaffif M.B., Clark L.V. Genome biology of the paleotetraploid perennial biomass crop *Miscanthus*. *Nat Commun.* 2020;11:5442. doi 10.1038/s41467-020-18923-6
- Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;76(10):5269-5273. doi 10.1073/pnas.76.10.5269
- 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
- Nishiwaki A., Mizuguti A., Kuwabara S., Matuura H., Yamaguchi S., Toma Y., Miyashita T., Yamada T., Ishigaki G., Akashi R., Rayburn L.A., Stewart J.R. Discovery of natural *Miscanthus* (Poaceae) triploid plants in sympatric populations of *Miscanthus sacchariflorus* and *Miscanthus sinensis* in southern Japan. *Am J Bot.* 2011;98(1):154-159. doi 10.3732/ajb.1000258
- Orzeszko-Rywka A., Rochalska M. Possibility of seed quality improvement in *Miscanthus sinensis* (Andersson). *J Res Appl Agric Engng.* 2016;61(4):83-88
- Swaminathan K., Chae W.B., Mitros T., Kranthi V., 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
- Tamura K., Uwatoko N., Yamashita H., Fujimori M., Akiyama Y., Shoji A., Sanada Y., Okumura K., Gau M. Discovery of natural interspecific hybrids between *Miscanthus sacchariflorus* and *Miscanthus sinensis* in Southern Japan: morphological characterization, genetic structure, and origin. *BioEnergy Res.* 2016;9(1):315-325. doi 10.1007/s12155-015-9683-1
- Tang Y.-M., Xiao L., Iqbal Y., Liao J.-F., Xiao L.-Q., Yi Z.-L., She C.-W. Molecular cytogenetic characterization and phylogenetic analysis of four *Miscanthus* species (Poaceae). *Comp Cytogenet.* 2019;13(3):211-230. doi 10.3897/CompCytogen.v13i3.35346
- USDA Plant Hardiness Zone Map <https://planthardiness.ars.usda.gov/> (accessed: 03.2024)
- Van de Peer Y.V., De Wachter R.D. Construction of evolutionary distance trees with TREECON for Windows: accounting for variation in nucleotide substitution rate among sites. *Bioinformatics.* 1997;13(3):227-230. doi 10.1093/bioinformatics/13.3.227
- Xu W.Z., Zhang X.Q., Huang L.K., Nie G., Wang J.P. Higher genetic diversity and gene flow in wild populations of *Miscanthus sinensis* in southwest China. *Biochem Syst Ecol.* 2013;48:174-181. doi 10.1016/j.bse.2012.11.024
- Zhang G., Ge C., Xu P., Wang S., Cheng S., Han Y., Wang Y., Zhuang Y., Hou X., Yu T., Xu X., Yang Y., Yin X., Wang W., Liu W., Zheng C., Sun X., Wang Z., Ming R., Dong S., Ma J., Zhang X., Chen C. The reference genome of *Miscanthus floridulus* illuminates the evolution of Saccharinae. *Nat Plants.* 2021;7:608-618. doi 10.1038/s41477-021-00908-y

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 20.05.2024. После доработки 06.11.2024. Принята к публикации 07.11.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-25

Характеристика трех митохондриальных геномов комаров рода *Aedes* (Diptera: Culicidae) подрода *Stegomyia*

А.Г. Бега ^{1,2}, И.И. Горячева ^{1,2}, А.В. Москаев ^{1,3}, Б.В. Андрианов ² ¹ Государственный университет просвещения, Мытищи, Московская область, Россия² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия³ Российский государственный университет народного хозяйства им. В.И. Вернадского Минсельхоза Российской Федерации, Балашиха, Московская область, Россия andrianovb@mail.ru

Аннотация. Комары рода *Aedes*, подрода *Stegomyia* являются переносчиками ряда вирусов позвоночных, в том числе возбудителей арбовирусных лихорадок человека. Особый интерес представляет изучение генетических особенностей синантропных популяций видов этой группы. Мы получили, аннотировали и описали митохондриальные геномы трех видов комаров рода *Aedes*, подрода *Stegomyia*: *Ae. albopictus*, *Ae. flavopictus* и *Ae. sibiricus*. Митохондриальные геномы *Ae. flavopictus* и *Ae. sibiricus* были получены от комаров из синантропных популяций с Дальнего Востока России. Митохондриальный геном *Ae. sibiricus* представлен нами впервые. Митохондриальный геном *Ae. albopictus* был получен для клеточной линии С6/36. Мы подобрали три комплекта праймеров для каждого из видов комаров, которые амплифицируют весь митохондриальный геном, кроме контрольной области, и отсековировали геномы методом Сэнгера. Все три новых генома имеют одинаковый порядок расположения генов. Идентифицировано 13 канонических белок-кодирующих генов, 2 гена рибосомальной РНК, 22 гена транспортной РНК. Белок-кодирующие гены имеют канонические старт- и стоп-кодоны за двумя исключениями. Канонический стоп-кодон «ТAA» неполный в генах *cox1* и *cox2*. В гене *cox1* отсутствует канонический старт-кодон для метионина. Нуклеотидная изменчивость представлена в основном точковыми нуклеотидными замещениями. Инсерции-делеции имеются в областях межгенных спейсеров. Проведен филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей полных митохондриальных геномов всех известных видов комаров рода *Aedes*, подрода *Stegomyia*. Полученные данные позволили провести измерение соотношения синонимичных и несинонимичных замен (Ka/Ks) в конкретных белок-кодирующих генах.

Ключевые слова: инвазионный вид; митохондриальный геном; филогенетический анализ; мтДНК

Для цитирования: Бега А.Г., Горячева И.И., Москаев А.В., Андрианов Б.В. Характеристика трех митохондриальных геномов комаров рода *Aedes* (Diptera: Culicidae) подрода *Stegomyia*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(2):219-229. doi 10.18699/vjgb-25-25

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-44-10003, <https://rscf.ru/project/24-44-10003/> «Генетический и экологический анализ популяций малярийного комара *Anopheles plumbeus* как важного потенциального переносчика трансмиссивных заболеваний в Российской Федерации и Республики Беларусь». Проект реализуется научным коллективом совместно с зарубежным научным коллективом, отобранным Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (БРФФИ), грант № Б23РНФМ-068.

Вклад авторов. Все авторы внесли равный вклад в исследование.

Mitochondrial genome variation of mosquito species in the subgenus *Stegomyia* of the genus *Aedes* (Diptera: Culicidae)

A.G. Bega ^{1,2}, I.I. Goryacheva ^{1,2}, A.V. Moskaev ^{1,3}, B.V. Andrianov ² ¹ Federal State University of Education, Mytishchi, Moscow Region, Russia² Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia³ Vernadsky Russian State University of National Economy, Balashikha, Moscow Region, Russia andrianovb@mail.ru

Abstract. Mosquitoes in the subgenus *Stegomyia* of the genus *Aedes* are vectors of a number of vertebrate viruses, including human arboviral fevers. Of particular interest is the study of the genetic characteristics of invasive populations of species in this group. We obtained, annotated and described the mitochondrial genomes of three *Stegomyia* mosquito species of the genus *Aedes*: *Ae. albopictus*, *Ae. flavopictus* and *Ae. sibiricus*. The mitochondrial genomes of *Ae. flavopictus* and *Ae. sibiricus* were obtained from mosquitoes from synanthropic populations in the Russian Far East. The mitochondrial genome of *Ae. sibiricus* is presented for the first time. The mitochondrial genome of

Ae. albopictus was obtained for the C6/36 cell line. We selected three primer sets, for each mosquito species, that amplify the entire mitochondrial genome except for the control region and sequenced the genomes using the Sanger method. All three new genomes have an identical gene order. We identified 13 canonical protein-coding genes, 2 ribosomal RNA genes, and 22 transport RNA genes. Protein-coding genes have canonical start and stop codons with two exceptions. The canonical stop codon "TAA" is incomplete in the *cox1* and *cox2* genes. The *cox1* gene lacks the canonical start codon for methionine. Nucleotide variability is mainly represented by point nucleotide substitutions. A phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of complete mitochondrial genomes of all known mosquito species in the subgenus *Stegomyia* of the genus *Aedes* was performed. The data obtained made it possible to measure the ratio of synonymous to non-synonymous substitutions (Ka/Ks) in specific protein-coding genes.

Key words: invasive species; mitochondrial genome; phylogenetic analysis; mtDNA

For citation: Bega A.G., Goryacheva I.I., Moskaev A.V., Andrianov B.V. Mitochondrial genome variation of mosquito species in the subgenus *Stegomyia* of the genus *Aedes* (Diptera: Culicidae). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(2):219-229. doi 10.18699/vjgb-25-25

Введение

Комары, принадлежащие к роду *Aedes*, подроду *Stegomyia*, являются основными переносчиками лихорадки денге, желтой лихорадки и других инфекций, вызываемых арбовирусами, по всему миру (Weetman et al., 2018). Наибольший интерес и практическое значение представляют инвазионные виды комаров из этой группы, образующие плотные синантропные популяции. *Aedes albopictus* Skuse, 1894 – инвазионный вид родом из Юго-Восточной Азии, который за последние 50 лет расселился на все континенты, за исключением Антарктиды (Medlock et al., 2012). В Российской Федерации этот вид обитает на юге европейской части страны. Изучение его генетической изменчивости в России в основном базируется на анализе баркод-фрагмента mitochondrialного гена *cox1* (Федорова и др., 2019; Bega et al., 2022).

Подрод *Stegomyia* в России представлен еще тремя видами комаров, обитающими на Дальнем Востоке и в Сибири: *Aedes flavopictus* Yamada, 1921, *Aedes sibiricus* Danilov & Filippova, 1978 и *Aedes galloisi* Yamada, 1921. Эти три вида считаются аборигенными лесными, что подтверждается сравнительным анализом генетической структуры популяций *Ae. albopictus* и *Ae. flavopictus* с Корейского полуострова (Shin, Jung, 2021). Ранее *Ae. flavopictus* и *Ae. sibiricus* не формировали плотных популяций на Дальнем Востоке и были найдены лишь в единичных экземплярах (Гуцевич и др., 1970). В последнее время стали появляться сообщения о встрече этих видов на урбанизированных территориях (Берлов, Куберская, 2021; Берлов и др., 2021). Нами были получены данные о расширении ареала и формировании плотных синантропных популяций *Ae. flavopictus* и *Ae. sibiricus* на Дальнем Востоке России, что, вероятно, свидетельствует о начале формирования инвазионных популяций этих видов (Bega et al., 2022).

В данном сообщении мы представляем результаты секвенирования mitochondrialных геномов представителей потенциально инвазионных популяций *Ae. flavopictus* и *Ae. sibiricus* и mitochondrialного генома клеточной линии *Ae. albopictus* C6/36, а также филогенетический анализ полученных последовательностей.

Митохондриальный геном *Ae. albopictus* уже хорошо охарактеризован, но некоторые моменты до сих пор остаются спорными. Так, mitochondrialные геномы комаров с острова Тайвань, в том числе геном, являющийся рефе-

ренсным (ID NC_006817), имеют сдвиги рамок считывания и аномальные стоп-кодона. Это может быть связано с тем, что особь была взята из уникальной островной и предположительно нативной популяции, однако может являться следствием включения в митохондриальный геном ядерных копий митохондриальных генов, или Numts. Некоторые последовательности митохондриальных геномов *Ae. albopictus*, представленные в GenBank, имеют делеции и поли(А) спейсеры (Battaglia et al., 2016; Ze-Ze et al., 2020). Особенности митохондриального генома клеточной культуры *Ae. albopictus* ранее не изучались. Культура C6/36 была получена от комаров, место отлова которых точно неизвестно (Singh, 1967). К настоящему времени культура пассируется в лаборатории более 50 лет. В условиях клеточной культуры, при постоянной температуре и избытке питательных веществ, клетки не испытывают тех факторов отбора, которым подвергаются природные популяции комаров. Получение митохондриального генома клеточной культуры C6/36 представляет интерес, так как показывает, какие именно митохондриальные гены испытывают давление отбора в природных популяциях. На момент подготовки данной статьи в GenBank NCBI были размещены только две последовательности митохондриальных геномов *Ae. flavopictus* – NC_050044 и MT501510 из южной части ареала вида. Полученный нами геном представляет ранее не охарактеризованную северную часть ареала. Митохондриальный геном *Ae. sibiricus* получен в данном исследовании впервые. В GenBank NCBI имелся один митохондриальный геном для близкого вида *Ae. galloisi*. Последовательности, полученные в настоящем исследовании, могут быть использованы в дальнейшем при изучении генетических особенностей комаров подрода *Stegomyia*.

Материалы и методы

Сбор образцов и видовая идентификация. Выборки комаров были собраны на территории Дальнего Востока России летом 2020 г. Мы отловили *Ae. flavopictus* в г. Хабаровске, *Ae. sibiricus* в г. Свободном Амурской области. Клон C6/36 *Aedes albopictus* – коммерчески доступная клеточная линия комаров, выделенная из личинки этого вида (Singh, 1967). Идентификацию видов по морфологическим признакам проводили в соответствии с ключами в определителях (Гуцевич и др., 1970; Tanaka, 1979; Ree, 2003).

Отдельно следует оговорить таксономический статус комара, определенного нами как *Ae. sibiricus*. Не все вышеуказанные определители включают информацию о выделении вида *Ae. sibiricus* из ранее описанного *Ae. galloisi* (Данилов, Филиппова, 1978). Мы использовали ключи для идентификации этих видов по окраске лапок и по строению гипопигия самцов (Данилов, Филиппова, 1978; Полторацкая, Мирзаева, 2013). В настоящее время вид *Ae. sibiricus* включен в каталог кровососущих комаров мира “Mosquitoes of the World” (Wilkerson et al., 2021), однако его описание опубликовано только на русском языке, в связи с чем *Ae. sibiricus* отсутствует в таксономической базе данных GenBank.

Выделение ДНК и секвенирование митохондриального генома. Тотальную ДНК выделяли из отдельных особей имаго комаров. Каждый экземпляр гомогенизировали в растворе для лизиса. Лизирующий раствор имел состав: 500 мМ Tris-EDTA pH = 8.0, 100 мкг/мл Proteinase K, 1 % Sodium N-lauroylsarcosinate, 100 мМ NaCl. Лизис проводился при 50 °C в течение 3 ч. После завершения лизиса ДНК экстрагировали фенолом. Фенол находится в верхней фазе. К полученному раствору ДНК добавляли два объема воды, затем ДНК осаждали изопропиловым спиртом. После очистки ДНК растворяли в деионизированной воде.

Митохондриальные геномы амплифицировали с помощью набора реактивов Encyclo Plus PCR kit («Евроген», Россия) и секвенировали по методу Сэнгера. Праймеры были подобраны нами с помощью программы Primer3 (Rozen, Skaletsky, 2000) на основе митохондриального генома *Ae. albopictus*, опубликованного в работе (Battaglia et al., 2016). ПЦР амплификацию для всех подобранных нами пар праймеров проводили при температуре отжига 58 °C. Перечень использованных нами праймеров представлен в табл. 1–3.

Биоинформационный анализ. Для выявления митохондриальных генов мы анализировали последовательности с помощью программы BLAST. Стартовые и стоп-кодона открытого рама считывания определяли путем сравнения со стартовыми и стоп-кодонами ортологичных белок-кодирующих генов в GenBank. Филогенетический анализ выполняли в программе MEGA7 (Kumar et al., 2016). Выравнивание последовательностей, полученных в результате секвенирования, с последовательностями в базах данных проводили с использованием ресурсов NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Применяли алгоритм множественного выравнивания последовательностей Clustal W (Thompson et al., 1994). Кольцевой митохондриальный геном визуализировали с помощью программы Chlogoplots (Zheng et al., 2020). Алгоритм расчета отношения Ka/Ks описан в работе (Wang D. et al., 2011). Расчет проводился с помощью программного обеспечения KaKs_Calculator (Zhang Z. et al., 2006) с использованием простого метода корректировки замен (NG) (Nei, Gojobori, 1986). Если длина сравниваемой последовательности ДНК равна n , а количество замен между сравниваемыми последовательностями равно m , то для расчета величин Ka и Ks определялось количество синонимичных (S) и несинонимичных (N) сайтов ($S + N = n$) и количество синонимичных (Sd) и несинонимичных (Nd) замен ($Sd + Nd = m$).

Тогда после введения коррекции на наличие множественных замен (Nd/N) и (Sd/S) можно определить наблюдаемое число синонимичных замен на синонимичный сайт, число несинонимичных замен на несинонимичный сайт и их отношение. Таким образом, расчет включал три шага: подсчет S и N, подсчет Sd и Nd и коррекцию множественных замен. Дистрибутив программы находится по ссылке: <https://ngdc.cncb.ac.cn/biocode/tools/BT000001>.

Результаты

Организация полученных митохондриальных геномов

Митохондриальные геномы трех видов комаров рода *Aedes*, подрода *Stegomyia* (*Ae. albopictus*, *Ae. flavopictus* и *Ae. sibiricus*) идентичны друг другу по порядку генов и сходны по нуклеотидной последовательности. Длина митохондриального генома без учета длины контрольных областей: *Ae. albopictus* – 14900 п.н., *Ae. flavopictus* – 14893 п.н., *Ae. sibiricus* – 14886 п.н. Нуклеотидная изменчивость представлена точечными нуклеотидными заменами. При сравнении митохондриальных геномов *Ae. albopictus* и *Ae. flavopictus* величина нуклеотидной дивергенции минимальна (5.74 %). Максимальная степень нуклеотидной дивергенции наблюдается при сравнении нуклеотидных последовательностей митохондриальных геномов *Ae. albopictus* и *Ae. sibiricus* (7.51 %). Митохондриальные геномы *Ae. flavopictus* и *Ae. sibiricus* различаются на 6.62 %. Все три митохондриальных генома имеют сильное смещение $A + T = 78.4$ %, что типично для митохондриальных геномов двукрылых.

Идентифицированы 13 канонических белок-кодирующих генов (БКГ), 2 гена рибосомальной РНК, 22 гена транспортной РНК. Все БКГ имеют канонические старт- и стоп-кодона за двумя исключениями. Канонический стоп-кодон «ТАА» неполный в генах *cox1* и *cox2*. Предполагается, что отсутствующее основание «А» дополняется в ходе процессинга РНК. Кроме того, в гене *cox1* отсутствует канонический старт-кодон для метионина. Тяжелая нить (J-strand) содержит 22 гена, включая 9 БКГ и 13 генов тРНК. Остальные 15 генов (4 БКГ, 2 рРНК и 9 тРНК) кодируются на легкой нити (N-нити). Кольцевая генетическая карта митохондриального генома *Ae. sibiricus* представлена на рис. 1.

Филогенетический анализ

Филогенетический анализ полученных нами нуклеотидных последовательностей митохондриальных геномов комаров со всеми доступными последовательностями митохондриальных геномов *Ae. albopictus*, *Ae. flavopictus*, *Ae. aegypti* и *Ae. galloisi*, зарегистрированными в GenBank, представлен на рис. 2. Регион сравнения включал весь митохондриальный геном, за исключением контрольного региона.

Виды *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti* и *Ae. flavopictus* образуют независимые кластеры с высокими значениями бутстреп-поддержки. Митохондриальный геном клеточной линии C6/36 кластеризуется с митохондриальными геномами *Ae. albopictus* из инвазионной части ареала вида. *Ae. sibiricus* и *Ae. galloisi* кластеризуются совместно.

Таблица 1. Список праймеров, использованных для получения последовательности нуклеотидов полного митохондриального генома клеточной культуры C6/36 *Ae. albopictus*

Имя праймера	Последовательность 5'→3'	Локализация на последовательности GenBank ID: OQ145430	Длина ПЦР фрагмента, п. н.
G1_18L	aatgaatgcctgataaaaagga	1–23	711
G1_18R	tgatttaactcctccaaatgc	711–692	
G4_5L	ttctataattattggggcatttgg	676–699	941
G4_5R	aaaagcatgagcagtaacaattaca	1617–1596	
G1_16L	ctggaatagtcggaactcactaag	1505–1529	986
G1_16R	cggttaatccccaactgta	2491–2472	
G1_15L	gccctgcacttttatgatcttt	2432–2453	919
G1_15R	tcattgatggccaataactttt	3351–3330	
G1_14L	tgccatcaatgatattgaagtta	3339–3362	812
G1_14R	gaatcgattaggtattaatcaaaatgt	4160–4134	
G1_13L	ttggtcttttaattatcccatcaac	4111–4135	854
G1_13R	ttcccatcgtaactcctaag	4965–4945	
G1_12L	tcgagaaggaacatttcaagg	4904–4924	895
G1_12R	ttggtaaattaaagcaatttctacat	5799–5773	
G1_12-11L	tgtgactccaatcacaagga	5528–5548	653
G1_12-11R	tgttgatcaagaaaaagctgcta	6181–6159	
G1_11L	tcatgaatgaaatcaaggagca	5885–5906	619
G1_11R	caagggtgaagagaatatttgg	6504–6482	
G1_10L	ttgaaactctgcacataatgaa	6423–6448	1027
G1_10R	tgctcctactcctgtttctgc	7450–7430	
G1_9L	gaatgaactaaagcagaacagga	7418–7441	560
G1_9R	tttattgaatgagaagttgttcttt	7978–7952	
G1_9-8L	tcaccaattcgattagaagagc	7631–7653	622
G1_9-8R	tcttcaggaagaagtcgagaattt	8253–8230	
G3_1L	aaaaattctcgacttctcctga	8228–8250	715
G3_1R	ttgtgatgggtggtgctttt	8943–8922	
G1_7L	agttgcctcaacatgagctt	8860–8879	858
G1_7R	gacgaaaacatcttctgtacatt	9718–9694	
G1_6L	cagagaagatgtttctgtagaaata	9700–9726	840
G1_6R	cccaataatgatccaaatttca	10540–10562	
G1_5L	ttcagcctgatgaaatttgg	10530–10550	944
G1_5R	ggtcgagctccaattcatgt	11474–11455	
G1_4L	tgaattggagctgcacctgt	11458–11477	810
G1_4R	ggggtttatactgtaatagttgctgga	12268–12242	
G1_4-3L	ccttcagcaaatcaaaagga	11994–12014	515
G1_4-3R	tcaaatcgtaaggggccta	12509–12490	
G3_2L	taggcccttacgaatttga	12490–12509	788
G3_2R	taaaggggccgcagtatttgg	13287–13268	
G1_2L	ctcattcaaccattcatacaagc	13204–13226	853
G1_2R	gaaaagaaattgtgcaaatcaa	14057–14035	
G1_1L	tgatttgcaaaattcttttca	14036–14058	679
G1_1R	ccagctaccggttataca	14715–14696	
G5_1L	ttgtataaccgcggtagctg	14695–14714	520
G5_1R	tgatgcttctaggaagaaatgaa	15215–15193	

Таблица 2. Список праймеров, использованных для получения последовательности нуклеотидов полного митохондриального генома *Ae. flavopictus*

Имя праймера	Последовательность 5'→3'	Локализация на последовательности GenBank ID: OQ145431	Длина ПЦР фрагмента, п. н.
G1_18fL	aatgaagcccccgataaaaagga	1–23	710
G1_18fR	tggttaatcctccaaatgc	710–691	
G1_17fL	ttacttctataattattggagcattt	670–696	898
G1_17fR	aaatccctgaatgtctaagttcagt	1568–1542	
G1_16fL	ctggaatagtaggaacttcttaag	1504–1528	986
G1_16fR	cagttaatcctccaacgta	2490–2471	
G1_15fL	gccctgctttattgtgatcttt	2431–2452	919
G1_15fR	tcattgatgcccaataaccttt	3350–3329	
G1_14fL	tgggcatcaatgatactgaagta	3338–3361	812
G1_14fR	aaatcgattaggtattaatcagaatgt	4159–4133	
G3_14fL	ttggtcttttaattattcctcaaca	4110–4135	831
G3_3R	ggtcttcatacaatccccgt	4941–4922	
G3_3L	tcgagaaggaacatttcaagg	4903–4923	895
G1_12fR	taggtaaaattaagcaatttctacat	5798–5772	
G1_12-11L	tgtgacttccaatcacaagga	5527–5547	656
G1_12-11R	tgttgatcaagaaaagctgcta	6183–6161	
G1_11fL	ccatgaatgaaatcaaggagca	5884–5905	622
G1_11fR	caaggatgaagcgaatatttgg	6506–6484	
G1_10fL	tttgaactcttggacataataagaa	6425–6450	1027
G1_10fR	agcaccaacacctgttctgc	7452–7432	
G1_9fL	gaatgaactaagcagaacaggt	7420–7443	513
G1_9fR	ttttattgaatgggaaattgttcttt	7980–7954	
G1_9-8fL	tctacaattcgattagaagagc	7633–7655	622
G1_9-8fR	tcttcaggaagagttcgggaattt	8255–8232	
G3_4fR	tcatatcattgacaccacaatca	8106–8129	560
G3_4L	tctgttgctcatatgggtattgtt	8666–8643	
G4_6L	ttcgtcttctattcgcctca	8513–8532	794
G4_6R	gttttggattgtggttaatttt	9307–9283	
G4_7L	aaaattaaaccacaatccaataaa	9283–9306	612
G4_7R	ttgggagttaatgaaaaggaa	9895–9874	
G4_8L	ttcctttcattaactcccaag	9874–9896	817
G4_8R	tcgtaaaaatcaaccattatttcatc	10691–10665	
G1_5fL	ttcagcctgatgaaattcgg	10532–10552	944
G1_5fR	ggctgggctccaattcatgt	11476–11457	
G1_4fL	tgaattggagcccgcctgt	11460–11479	789
G1_4fR	ggggttatactgtaatagttgctggg	12265–12239	
G1_4-3L	ccttcagcaaaaatcaaaagga	11991–12011	515
G1_4-3fR	tcaaatcgtaaagggccaa	12506–12487	
G1_3fL	tgttccttagtaataacttcacagca	12420–12446	809
G1_3R	tgaaggcttgatgaatggttg	13229–13208	
G1_2L	ctcattcaaccattcatacaagc	13202–13224	829
G1_2R	gaaaagaaattgtgcaaatcaa	14058–14036	
G1_1L	tgattgcacaaaatttctttca	14037–14059	675
G1_1R	ccagctaccggttataca	14712–14693	
G5_2L	gctggcacaattttaccaata	14708–14729	1000
G5_2R	cctatgggtcctaaatgaagaaaa	15684–15707	

Таблица 3. Список праймеров, использованных для получения последовательности нуклеотидов полного митохондриального генома *Ae. sibiricus*

Имя праймера	Последовательность 5'→3'	Локализация на последовательности GenBank ID: OQ145432	Длина ПЦР фрагмента, п. н.
G1_18sL	aatgaattgcccgataaaaagga	1–23	706
G1_18R	tgatttaatcctccaaatgc	706–687	
G4_4L	tgagcatttgaggattaaa	683–703	599
G4_4R	caaatatttcagcttgaaggctat	1282–1257	
G3_5L	aactaatagcctcaagctgaaa	1252–1275	417
G3_5R	tcaattccaatcctccaa	1669–1650	
G3_6L	ttcgaacagaacttagtcatccag	1536–1559	919
G3_6R	tcctaaagatcataaagagcagga	2455–2431	
G1_15sL	gtcctgctctttatgatcttt	2430–2451	919
G1_15sR	tcattgatgaccaataactttt	3349–3328	
G3_7L	ttgaaacaatttaccagcaatta	3228–3251	881
G3_7R	agttgaaggaataataaagaccaa	4109–4134	
G3_8L	tgtatttgaccctcaactactatcttt	4050–4077	700
G3_8R	ctactaagtgaaggggtgatttg	4750–4727	
G3_9L	gtcaacacacgcaaatcacc	4716–4735	810
G3_9R	tccttgattggaagtcatatatac	5546–5521	
G1_12-11L	tgtgactccaatcacaagga	5526–5546	657
G1_12-11sR	tggtgatcaagaaaagctgcta	6183–6161	
G1_11L	tcatgaatgaatcaaggagca	5883–5904	614
G1_11sR	caaggatgaagagaatatttgg	6497–6475	
G3_10L	ctctcatccttgatcaaatcc	6485–6507	959
G3_10R	cagccctactcctgtttca	7444–7425	
G1_9sL	gaatgaactaaagctgaaacagga	7411–7434	560
G1_9sR	ttttattgaatgagaaattgatcttt	7971–7945	
G1_9-8sL	tctcaatacgattagataaagc	7624–7646	622
G1_9-8sR	tctcagggagaacccgagaattt	8246–8223	
G3_11L	aattctcgggttctcctga	8224–8243	897
G3_11R	tttgaagaagcttaattcctacatt	9121–9147	
G4_2L	ctgcttgtaaagctcaggct	9074–9094	816
G4_2R	aacttgggagttaaagaaaaggaa	9890–9866	
G4_3L	cttcttttcttaactcccaaag	9865–9888	818
G4_3R	tcgtaaaaatcaaccattttatcatc	10683–10657	
G1_5sL	ttcagctgatgaaatttgg	10524–10544	944
G1_5sR	ggtcgagctccaattcagggt	11468–11449	
G1_4sL	tgaattggagctcgaccagt	11452–11471	808
G1_4R	ggggtttatactgtaatagttgctgga	12260–12234	
G1_4-3sL	ccttcagcaaaaatcaaaaggt	11986–12006	515
G1_4-3sR	tcaaatcggaaaggccta	12501–12482	
G1_3sL	tgttcttagtaataactcacagca	12415–12441	807
G1_3R	tgaaggcttgatgaatggttg	13222–13201	
G3_12L	caaccattcatacaagccttca	13201–13222	849
G3_12R	gaaaagaaattgtgcaaatcaa	14050–14028	
G1_1L	tgattgcacaaattcttttca	14029–14051	676
G1_1R	ccagctaccgcggttataca	14705–14686	
G5_3L	ttgtataaccgcggttagctg	14685–14704	358
G5_3R	gggggtatttttaataaggcaattt	15043–15019	

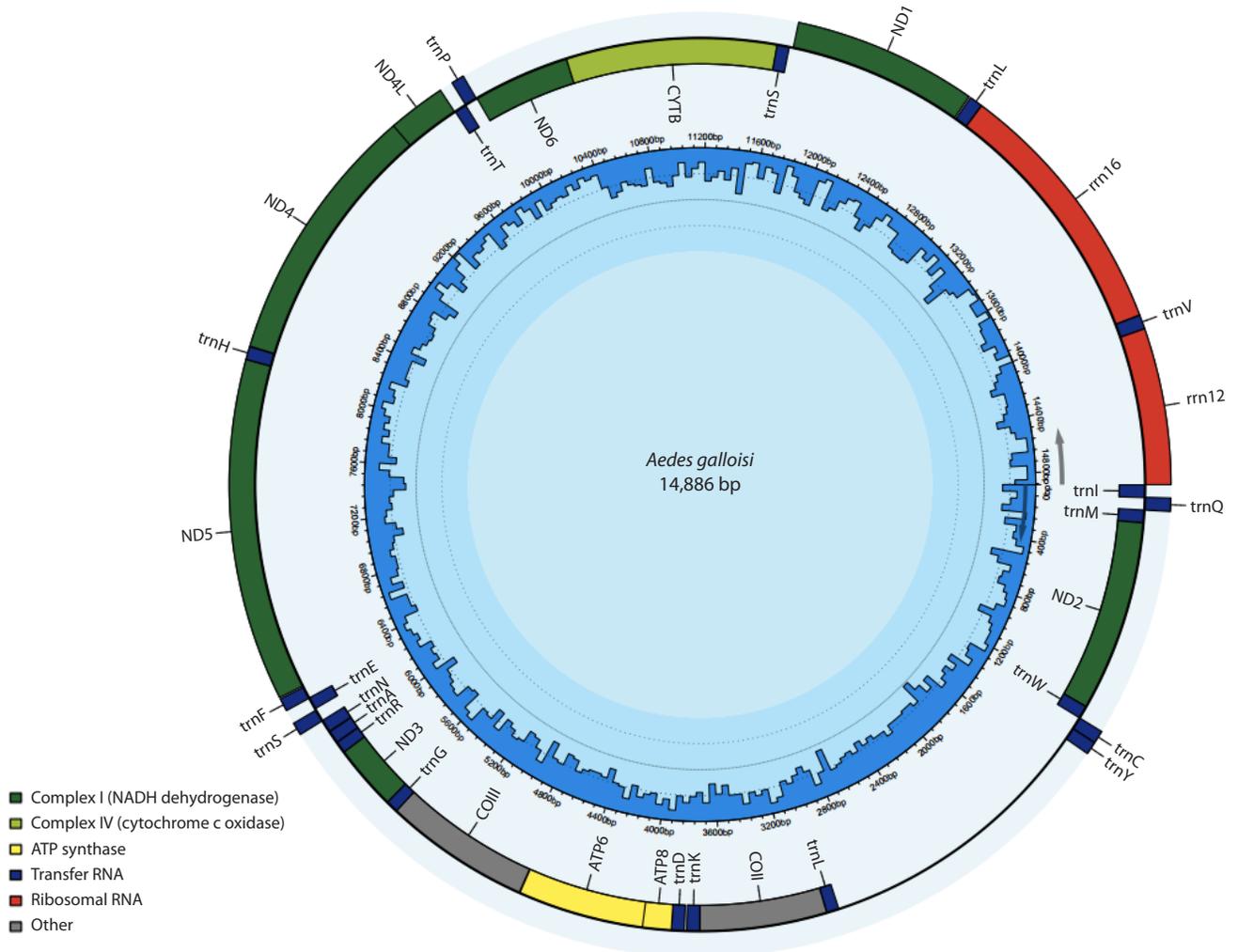


Рис. 1. Митохондриальный геном *Ae. sibiricus* без контрольного участка, расположенного между 12S рРНК и тРНК-IIe.

Нуклеотидная последовательность зарегистрирована в базе данных GenBank под номером OQ145432. Геном зарегистрирован как *Ae. galloisi* в силу того, что разделение близкородственных видов *Ae. galloisi* и *Ae. sibiricus* пока не является общепризнанным, а вид *Ae. sibiricus* еще не представлен в систематической базе данных GenBank. Мы считаем правильным видовым именем собранных комаров *Ae. sibiricus*.

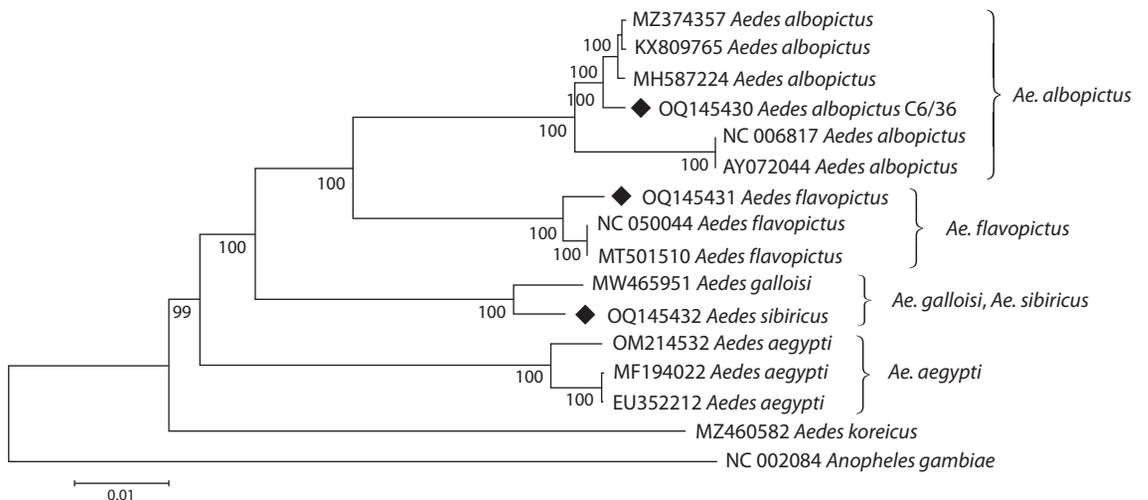


Рис. 2. NJ-дендрограмма полных митохондриальных геномов.

Дендрограмма построена методом максимального правдоподобия. Длина ветвей выражена в числе замен оснований на сайт. Значения бутстреп-поддержки показаны рядом с узлами (10000 реплик). В качестве внешней группы использовались полные митохондриальные геномы *Ae. koreicus* и *Anopheles gambiae*. Митохондриальные геномы, полученные в данном исследовании, отмечены ромбом. Нуклеотидные последовательности зарегистрированы в базе данных GenBank с номерами OQ145430–OQ145432.

Анализ изменчивости белок-кодирующих генов

Мы провели расчет величины отношения частоты точечковых нуклеотидных замен (Ka/Ks), приводящих к изменению аминокислотной последовательности (несинонимичные замены, Ka) или не приводящих к изменению аминокислотной последовательности белка (синонимичные замены, Ks), для белок-кодирующих генов при попарном сравнении митохондриальных геномов, полученных в данном исследовании: *Ae. albopictus* и *Ae. sibiricus*, *Ae. albopictus* и *Ae. flavopictus*, *Ae. flavopictus* и *Ae. sibiricus* (рис. 3). Изучаемые нами виды комаров являются близкородственными, ареалы их обитания имеют краевые пересечения, но центры видовых ареалов относятся к разным природно-климатическим зонам. *Ae. albopictus* приурочен главным образом к тропическому и субтропическому климатическому поясу, *Ae. flavopictus* и *Ae. sibiricus* – к умеренному климатическому поясу. При этом *Ae. flavopictus* превалирует в зонах мусонного климата, а *Ae. sibiricus* – в зонах резко континентального климата. Такое попарное сравнение БКГ призвано выявить различия, которые могут быть адаптивно значимы в условиях обитания разных видов комаров. Величины на рис. 3 ранжированы по убыванию на основе сравнения *Ae. albopictus* и *Ae. sibiricus*.

Соотношение Ka/Ks во всех попарных сравнениях не превышает 0.25, что свидетельствует о сильном стабилизирующем отборе (Yang, Bielawski, 2000; Guo et al., 2021; Xing et al., 2022). Наиболее изменчивыми генами при сравнении *Ae. albopictus/Ae. sibiricus* и *Ae. albopictus/Ae. flavopictus* являются *nd4*, *nd6* и *atp8*. Наиболее консервативные гены – *nd1*, *atp6*, *nd41*, *cox1*.

Помимо межвидовых сравнений, мы провели внутривидовые попарные сравнения, чтобы оценить внутривидовую изменчивость митохондриальных БКГ. Для этого мы сравнили митохондриальный геном клеточной культуры C6/36 *Ae. albopictus*, полученный в данном исследовании, с геномом *Ae. albopictus* из Китая (GenBank ID MH587224), митохондриальный геном *Ae. flavopictus* с геномом *Ae. flavopictus* из Японии (GenBank ID NC050044), а митохондриальный геном *Ae. sibiricus* с геномом *Ae. galloisi* из Японии (GenBank ID MW465951). Величины отношения Ka/Ks приведены на рис. 4. Порядок расположения генов идентичен с порядком ранжирования генов на рис. 3.

Внутри вида *Ae. flavopictus* самые высокие значения величины Ka/Ks наблюдались в генах *nd5*, *nd6*, *cox1*, *cytb*. Гены *atp8*, *cox2*, *nd3*, *cox3*, *nd1*, *atp6* и *nd41* характеризуются низкой суммарной нуклеотидной изменчивостью. При сравнении митохондриальных геномов кома-

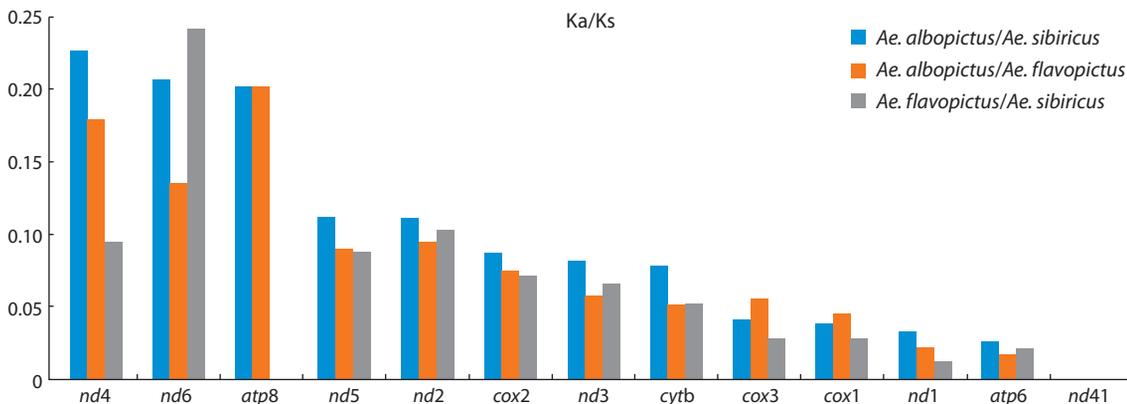


Рис. 3. Соотношение Ka/Ks в белок-кодирующих митохондриальных генах.

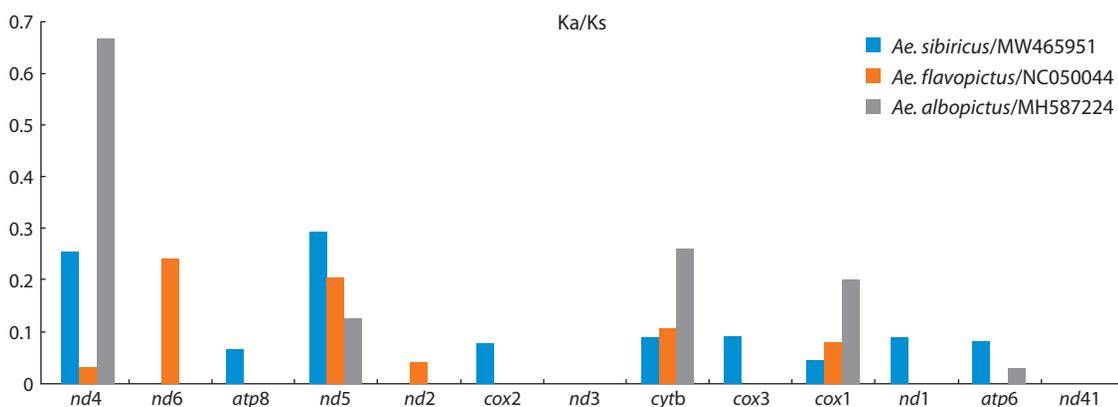


Рис. 4. Попарные внутривидовые сравнения нуклеотидной изменчивости по величине отношения Ka/Ks митохондриальных белок-кодирующих генов.

ров *Ae. albopictus* из природной популяции и из клеточной культуры С6/36 (Singh, 1967) наибольшее соотношение Ka/Ks наблюдается в генах *nd4*, *cytb*, *cox1*, *nd5*. Экстремально высокая изменчивость в этой паре митохондриальных геномов обнаружена в гене *nd4*. Минимальная изменчивость у *Ae. albopictus* характерна для генов *nd6*, *atp8*, *nd2*, *cox2*, *nd3*, *cox3*, *nd1*, *nd4l*. При сравнении митохондриальных БКГ *Ae. sibiricus* и *Ae. galloisi* высокие значения величины Ka/Ks наблюдались в генах *nd4*, *nd5*, *atp8*, *cox2*, *cytb*, *cox3*, *nd1*, *cox1*, *atp6*. Консервативными были гены *nd6*, *nd2*, *nd3*, *nd4l*.

Обсуждение

Организация полученных митохондриальных геномов

Полученные в нашем исследовании значения нуклеотидной дивергенции между тремя близкородственными видами комаров сопоставимы между собой и соответствуют географическому распространению видов в Восточной Азии. *Ae. albopictus* – наиболее теплолюбивый вид, характерный для Китая и южной Азии, *Ae. sibiricus* – самый северный, в то время как *Ae. flavopictus* занимает среднее положение (Bega et al., 2022).

Применение молекулярно-генетических маркеров для определения видов комаров основано на использовании порогового уровня допустимой внутривидовой изменчивости данного маркера. Этот порог для каждого маркера и каждой систематической группы насекомых определяется эмпирически (Zhang H.G. et al., 2017). Так, у многих групп насекомых пороговый уровень внутривидовой нуклеотидной изменчивости BOLD-фрагмента митохондриального гена *cox1* равен 3 % (Hebert et al., 2003). Внутривидовая изменчивость комаров *Anopheles hyrcanus* s. l. на территории Дальнего Востока России варьировала в пределах от 0.36 до 1.09 %, межвидовая – от 2.34 до 4.50 % (Khrabrova et al., 2015). В среднем по баркод-фрагменту *cox1* внутривидовая изменчивость комаров в Китае равнялась 0.39 % (Wang G. et al., 2012). Для полных митохондриальных геномов уже накоплено много информации, однако нет общепринятых количественных обобщений.

Филогенетический анализ

Опубликованные к настоящему времени митохондриальные геномы *Ae. albopictus* можно разделить на две группы. Первая группа была обнаружена на острове Тайвань (предположительно, нативный ареал вида). Геномы из второй группы обнаружены у комаров из инвазионной части ареала (Battaglia et al., 2016). Митохондриальный геном клеточной линии *Ae. albopictus* С6/36 кластеризуется с геномами, относящимися ко второй инвазионной группе. Кластеризация, полученная при анализе полных митохондриальных геномов, сходна с таковой, полученной в предыдущих исследованиях по BOLD-фрагменту гена *cox1* (Bega et al., 2022).

Анализ изменчивости белок-кодирующих генов

Давление отбора на белок-кодирующие гены можно оценить, определив в них отношения Ka/Ks . Мы провели такое сравнение на межвидовом уровне, сравнив между собой геномы, полученные в данном исследовании. Наи-

более высокие значения Ka/Ks во всех БКГ, кроме *nd6*, *cox1*, *cox3*, наблюдались при сравнении *Ae. albopictus*/*Ae. sibiricus*. Такой результат хорошо согласуется с различием экологических ниш этих видов. Чем больше между видами различий в местообитании, тем больше значимых замен в БКГ. Распределение величины Ka/Ks от большего значения к меньшему внутри БКГ в целом было сходно во всех трех попарных сравнениях, за исключением отдельных особенностей. Так, при сравнении видов *Ae. flavopictus*/*Ae. sibiricus* в одной географической зоне Дальнего Востока России соотношение Ka/Ks для гена *nd4* существенно ниже, а для *atp8* вовсе не найдено нуклеотидных замен. При расчете частоты замен, нормированных на один нуклеотид, мы можем заключить, что ген *atp8* у комаров подрода *Stegomyia* характеризуется более низкой частотой нуклеотидных замещений, чем другие белок-кодирующие митохондриальные гены. Большая величина отношения Ka/Ks в гене *atp8* по сравнению с другими белок-кодирующими митохондриальными генами была показана при сравнении двух видов чешуекрылых рода *Gynaephora*, обитающих в разных высокогорных средах (Zhang B. et al., 2021): наездников (Xing et al., 2022) и комаров рода *Anopheles* (Guo et al., 2021). Вероятно, это связано с отсутствием строгих ограничений, накладываемых на первичную структуру функционального белка *atp8*. В генах *nd1*, *atp6*, *nd4l*, *cox1* суммарная частота нуклеотидных замен сопоставима с частотой по другим митохондриальным генам, однако значения Ka/Ks низкие. Это подтверждает, что данные гены находятся под сильным селективным давлением отбора.

В отличие от межвидовых сравнений, распределение Ka/Ks между БКГ при внутривидовых сравнениях не имеет четко выраженных общих закономерностей, однако характеризует специфику накопления изменчивости для каждого вида.

При сравнении митохондриальных геномов *Ae. flavopictus* наиболее высокие значения величины Ka/Ks наблюдаются в случае генов *nd5*, *nd6*, *cox1*, *cytb*, что связано с меньшим давлением очищающего отбора. Паттерн внутривидовой изменчивости этих генов сходен с тем, который мы обнаружили при межвидовых сравнениях (см. рис. 3).

Представляет интерес сравнение митохондриальных геномов комаров *Ae. albopictus* из природной популяции и из клеточной культуры С6/36. Наибольшее соотношение Ka/Ks наблюдается в генах *nd4*, *cytb*, *cox1*, *nd5*. Величина Ka/Ks в данном случае кратно превышает значения, характерные как для межвидовых, так и для внутривидовых сравнений, что позволяет сделать вывод о слабом отборе в условиях клеточной культуры или о его отсутствии. Вместе с тем изменчивость не обнаружена в случае генов *nd6*, *atp8*, *nd2*, *cox2*, *nd3*, *cox3*, *nd1*, *nd4l*. Такой контраст в характере изменчивости разных генов *Ae. albopictus* может являться результатом снятия в условиях клеточной культуры ряда физиологических ограничений, которые испытывают особи в природных популяциях.

Изменчивость, наблюдаемая при сравнении митохондриальных геномов комаров *Ae. sibiricus* и MW465951, в целом соответствует уровню межвидовой изменчивости у комаров рода *Aedes* подрода *Stegomyia*, за исключением

двух аномальных генов, *nd6* и *nd5*. Обычно высокоизменчивый ген *nd6* в данном сравнении мономорфен, что может быть связано со стабилизирующим отбором. Ген *nd5*, напротив, содержит аномально много несинонимичных замен.

Заключение

Изучение особенностей естественного отбора в инвазионных популяциях насекомых пока находится в стадии накопления материала. Одним из подходов к обнаружению особенностей отбора, приводящих к появлению инвазионных популяций у насекомых, является сравнение митохондриальных геномов нативных и инвазионных популяций одного вида. Сосуществование нативных и инвазионных популяций в настоящее время известно для многих видов насекомых, таких как азиатская божья коровка *Harmonia axyrid* (Brown et al., 2011), японская виноградная цикадка *Arboridia kakogawana* (Piccinno et al., 2024) и некоторые другие виды. Изучение митохондриальных геномов успешно синантропизирующихся видов, образующих плотные популяции на урбанизированных территориях, представляет интерес для обнаружения митохондриальных генов, вовлеченных в генетический контроль признака повышенной жизнеспособности, характерного для инвазионных популяций насекомых.

Список литературы / References

- Берлов О.Э., Берлов Э.Я., Артемьева С.Ю. О находках тигрового комара *Aedes (Stegomyia) sibiricus* Danilov et Filippova, 1978 (Insecta: Diptera, Culicidae) в Иркутске. *Байкальский зоологический журнал*. 2021;2(30):118-119
[Berlov O.E., Berlov E.Y., Artemyeva S.Yu. Findings of the tiger-mosquito *Aedes (Stegomyia) sibiricus* Danilov et Filippova, 1978 (Insecta: Diptera, Culicidae) in Irkutsk. *Baikal Zoological Journal*. 2021;2(30):118-119 (in Russian)]
- Берлов О.Э., Куберская О.В. Первая находка тигрового комара *Aedes flavopictus* Yamada, 1921 (Diptera, Culicidae) в нижнем Приамурье (Хабаровский край, Россия). *Амурский зоологический журнал*. 2021;13(4):550-556. doi 10.33910/2686-9519-2021-13-4-550-556
[Berlov O.E., Kuberskaya O.V. First record of tiger mosquito *Aedes flavopictus* Yamada, 1921 (Diptera, Culicidae) in the Lower Amur area (Khabarovsk region, Russia). *Amurian Zoological Journal*. 2021;13(4):550-556. doi 10.33910/2686-9519-2021-13-4-550-556 (in Russian)]
- Гуцевич В.А., Мончадский А.С., Штакельберг А.А. Комары: Семейство Culicidae. В серии: Фауна СССР. Насекомые двукрылые. Т. 3, вып. 4. Л.: Наука, 1970
[Gutsevich V.A., Monchadskii A.S., Shtakel'berg A.A. Mosquitoes (Culicidae). In: Fauna of the USSR. Diptera. Vol. 3, Iss. 4. Leningrad: Nauka Publ., 1970 (in Russian)]
- Данилов В.Н., Филиппова В.В. Новый вид комара *Aedes (Stegomyia) sibiricus* sp. n. (Culicidae). *Паразитология*. 1978;12(2): 170-176
[Danilov V.N., Filippova V.N. A new species of mosquito *Aedes (Stegomyia) sibiricus* sp. n. (Culicidae). *Parazitologiya = Parasitology*. 1978;12(2):170-176 (in Russian)]
- Полторацкая Н.В., Мирзаева А.Г. О новых находках редкого для Западной Сибири вида комаров *Aedes sibiricus* Danilov et Filippova, 1978 (Diptera, Culicidae). *Евразийский энтомологический журнал*. 2013;12(2):144-146
[Poltoratskaya N.V., Mirzaeva A.G. New records of the rare species *Aedes sibiricus* Danilov et Filippova, 1978 (Diptera, Culicidae) from West Siberia, Russia. *Evraziatskii Entomologicheskii Zhurnal = Euroasian Entomological Journal*. 2013;12(2):144-146. (in Russian)]
- Федорова М.В., Швец О.Г., Медяник И.М., Шайкевич Е.В. Генетический анализ популяции завозных кровососущих комаров *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1895) (Diptera, Culicidae) в Краснодарском крае. *Паразитология*. 2019;53(6):518-528. doi 10.1134/S0031184719060073
[Fedorova M.V., Shvets O.G., Medyanik I.M., Shaikevich E.V. Genetic diversity of invasive *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1895) population (Diptera, Culicidae) in Krasnodar region, Russia. *Parazitologiya = Parasitology*. 2019;53(6):518-528. doi 10.1134/S0031184719060073 (in Russian)]
- Battaglia V., Gabrieli P., Brandini S., Capodiferro M.R., Javier P.A., Chen X.G., Achilli A., Semino O., Gomulski L.M., Malacrida A.R., Gasperi G., Torroni A., Olivieri A. The worldwide spread of the tiger mosquito as revealed by mitogenome haplogroup diversity. *Front Genet*. 2016;7:208. doi 10.3389/fgene.2016.00208
- Bega A.G., Vu T., Goryacheva I.I., Moskaev A.V., Andrianov B.V. A barcoding and morphological identification of mosquito species of the genus *Aedes* (Diptera: Culicidae) of the Russian Far East and Northern Vietnam. *Russ J Genet*. 2022;58(3):314-325. doi 10.1134/S1022795422030024
- Brown P.M.J., Thomas C.E., Lombaert E., Jeffries D.L., Estoup A., Handley L.J.L. The global spread of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae): distribution, dispersal and routes of invasion. *BioControl*. 2011;56:623-641. doi 10.1007/s10526-011-9379-1
- Guo J., Yan Z.T., Fu W.B., Yuan H., Li X.D., Chen B. Complete mitogenomes of *Anopheles peditaeniatus* and *Anopheles nitidus* and phylogenetic relationships within the genus *Anopheles* inferred from mitogenomes. *Parasit Vectors*. 2021;14(1):452. doi 10.1186/s13071-021-04963-4
- Hebert P.D., Cywinska A., Ball S.L., de Waard J.R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci*. 2003;270(1512): 313-321. doi 10.1098/rspb.2002.2218
- Khrabrova N.V., Andreeva Y.V., Sibataev A.K., Alekseeva S.S., Esenbekova P.A. Mosquitoes of *Anopheles hyrcanus* (Diptera, Culicidae) group: species diagnostic and phylogenetic relationships. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;93(3):619-622. doi 10.4269/ajtmh.14-0207
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*. 2016; 33(7):1870-1874. doi 10.1093/molbev/msw054
- Medlock J.M., Hansford K.M., Schaffner F., Versteirt V., Hendrickx G., Zeller H., Bortel W.V. A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2012;12(6):435-447. doi 10.1089/vbz.2011.0814
- Nei M., Gojobori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol*. 1986;3(5):418-426. doi 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040410
- Piccinno R., Tatti A., Avosani S., Galla G., Lazazzara V., Pedrazzoli F., Zadra N., Rodeghiero M., Seljak G., Özgen İ., Hauffe H.C., Verastro V., Stacconi M.V.R., Mazzoni V., Rota-Stabelli O. A multidisciplinary approach to tackling invasive species: barcoding, morphology, and metataxonomy of the leafhopper *Arboridia adanae*. *Sci Rep*. 2024;14(1):2229. doi 10.1038/s41598-023-49410-9
- Ree H.I. Taxonomic review and revised keys of the Korean mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Entomol Res*. 2003;33(1):39-52. doi 10.1111/j.1748-5967.2003.tb00047.x
- Rozen S., Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Misener S., Krawetz S.A. (Eds) *Bioinformatics Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. Vol. 132. Humana Press, Totowa, NJ, 2000. doi 10.1385/1-59259-192-2:365
- Shin J., Jung J. Comparative population genetics of the invasive mosquito *Aedes albopictus* and the native mosquito *Aedes flavopictus* in the Korean peninsula. *Parasit Vectors*. 2021;14(1):377. doi 10.1186/s13071-021-04873-5

- Singh K.R.P. Cell cultures derived from larvae of *Aedes albopictus* (Skuse) and *Aedes aegypti* (L.). *Curr Sci.* 1967;36(19):506-508
- Tanaka K.M. A revision of the adult and larval mosquitoes of Japan (including the Ryukyu Archipelago and the Ogasawara Islands) and Korea (Diptera: Culicidae). In: Tanaka K., Mizusawa K., Saugstad E.S. (Eds) Contributions of the American Entomological Institute. APO; San Francisco; California: American Entomological Institute, 1979;987
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994;22(22):4673-4680. doi 10.1093/nar/22.22.4673
- Wang D., Liu F., Wang L., Huang S., Yu J. Nonsynonymous substitution rate (Ka) is a relatively consistent parameter for defining fast-evolving and slow-evolving protein-coding genes. *Biol Direct.* 2011;6:13. doi 10.1186/1745-6150-6-13
- Wang G., Li C., Guo X., Xing D., Dong Y., Wang Z., Zhang Y., Liu M., Zheng Z., Zhang H., Zhu X., Wu Z., Zhao T. Identifying the main mosquito species in China based on DNA barcoding. *PLoS One.* 2012;7(10):e47051. doi 10.1371/journal.pone.0047051
- Weetman D., Kamgang B., Badolo A., Moyes C.L., Shearer F.M., Coulibaly M., Pinto J., Lambrechts L., McCall P.J. *Aedes* mosquitoes and *Aedes*-borne arboviruses in Africa: current and future threats. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(2):220. doi 10.3390/ijerph15020220
- Wilkerson R.C., Linton Y.M., Strickman D. Mosquitoes of the World. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2021
- Xing Z.P., Liang X., Wang X., Hu H.Y., Huang Y.X. Novel gene rearrangement pattern in mitochondrial genome of *Ooencyrtusplautus* Huang & Noyes, 1994: new gene order in *Encyrtidae* (Hymenoptera, Chalcidoidea). *ZooKeys.* 2022;1124:1-21. doi 10.3897/zookeys.1124.83811
- Yang Z., Bielawski J.R. Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Trends Ecol Evol.* 2000;15(12):496-503. doi 10.1016/s0169-5347(00)01994-7
- Ze-Ze L., Borges V., Osório H.C., Machado J., Gomes J.P., Alves M.J. Mitogenome diversity of *Aedes (Stegomyia) albopictus*: detection of multiple introduction events in Portugal. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020; 14(9):e0008657. doi 10.1371/journal.pntd.0008657
- Zhang B., Havird J.C., Wang E., Lv J., Xu X. Massive gene rearrangement in mitogenomes of phytoseiid mites. *Int J Biol Macromol.* 2021;186:33-39. doi 10.1016/j.ijbiomac.2021.07.011
- Zhang H.G., Lv M.H., Yi W.B., Zhu W.B., Bu W.J. Species diversity can be overestimated by a fixed empirical threshold: insights from DNA barcoding of the genus *Cletus* (Hemiptera: Coreidae) and the meta-analysis of *COI* data from previous phylogeographical studies. *Mol Ecol Resour.* 2017;17(2):314-323. doi 10.1111/1755-0998.12571
- Zhang Z., Li J., Yu J. Computing Ka and Ks with a consideration of unequal transitional substitutions. *BMC Evol Biol.* 2006;6:44. doi 10.1186/1471-2148-6-44
- Zheng S., Poczai P., Hyvönen J., Tang J., Amirouf A. Chloroplast: an online program for the versatile plotting of organelle genomes. *Front Genet.* 2020;11:576124. doi 10.3389/fgene.2020.576124

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 30.05.2024. После доработки 10.07.2024. Принята к публикации 06.09.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-26

Цитогенетика насекомых в эпоху хромосомных сборок полных геномов

В.А. Лухтанов ¹ , Е.А. Паженкова²¹ Зоологический институт Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия² Университет Любляны, Любляна, Словения lukhtanov@mail.ru

Аннотация. За последние несколько лет в цитогенетике произошли серьезные изменения, связанные с разработкой и распространением методов получения высококачественных хромосомных сборок полных геномов. Фактически это привело к появлению нового инструмента для изучения хромосом и хромосомных перестроек, мощность которого многократно превосходит возможности световой микроскопии. Использование этого инструмента революционизировало частную цитогенетику многих групп насекомых, для которых ранее информация о кариотипах, если она была вообще, ограничивалась элементарным подсчетом числа митотических или мейотических хромосом. Цель данного краткого обзора – обобщение достижений сравнительной и эволюционной цитогенетики насекомых, которые были получены на основании биоинформатического анализа хромосомных сборок полных геномов. С помощью этого подхода было показано, что в процессе быстрой хромосомной эволюции у чешуекрылых (отряд Lepidoptera) преобразование хромосомных чисел чаще всего осуществляются наиболее парсимониальным способом: в результате простых слияний и разделений хромосом. Установлено, что эти слияния и разделения не случайны и могут осуществляться в разных филогенетических линиях за счет повторного использования одних и тех же предковых хромосомных точек разрыва. Тенденция к разделениям хромосом скоррелирована с наличием в хромосомах так называемых интерстициальных теломер – теломероподобных структур, расположенных не на концах хромосом, а внутри них. При изучении теломерных регионов выявлено, что у большинства насекомых теломерная ДНК – это не просто набор коротких повторов, а очень длинная последовательность, состоящая из (TTAGG)_n (или других мотивов), регулярно и специфически прерываемая ретротранспозонами, а сами теломерные мотивы чрезвычайно разнообразны по длине и нуклеотидному составу. Число высококачественных хромосомных сборок геномов насекомых, доступных в базе данных GenBank, растет в геометрической прогрессии и уже превышает тысячу видов. Поэтому исключительные перспективы использования хромосомных сборок геномов для анализа кариотипов не вызывают сомнений.

Ключевые слова: хромосома; кариотип; хромосомные перестройки; теломера; мейотический драйв; рекомбинация; половые хромосомы; инверсии; синтении

Для цитирования: Лухтанов В.А., Паженкова Е.А. Цитогенетика насекомых в эпоху хромосомных сборок полных геномов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(2):230-237. doi 10.18699/vjgb-25-26

Финансирование. Работа подготовлена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 24-14-00047, <https://rscf.ru/project/24-14-00047/>.

Cytogenetics of insects in the era of chromosome-level genome assemblies

V.A. Lukhtanov ¹ , E.A. Pazhenkova²¹ Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia² University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia lukhtanov@mail.ru

Abstract. Over the past few years, a revolution has occurred in cytogenetics, driven by the emergence and spread of methods for obtaining high-quality chromosome-level genome assemblies. In fact, this has led to a new tool for studying chromosomes and chromosomal rearrangements, and this tool is thousands of times more powerful than light microscopy. This tool has revolutionized the cytogenetics of many groups of insects for which previously karyotype information, if available at all, was limited to the chromosome number. Even more impressive are the achievements of the genomic approach for studying the general patterns of chromosome organization and evolution in insects. Thus, it has been shown that rapid transformations of chromosomal numbers, which are often found in the order Lepidoptera, are most often carried out in the most parsimonious way, as a result of simple fusions and fissions of chromosomes. It has been established that these fusions and fissions are not random and occur independently in different phylogenetic lineages due to the reuse of the same ancestral chromosomal breakpoints. It has been shown that the tendency

for chromosome fissions is correlated with the presence in chromosomes of the so-called interstitial telomeres, i.e. telomere-like structures located not at the ends of chromosomes, but inside them. It has been revealed that, in most insects, telomeric DNA is not just a set of short repeats, but a very long sequence consisting of $(TTAGG)_n$ (or other telomeric motifs), regularly and specifically interrupted by retrotransposons, and the telomeric motifs are diverse in terms of their length and nucleotide composition. The number of high-quality chromosome-level genome assemblies available for insects in the GenBank database is growing exponentially and now exceeds a thousand species. Therefore, the exceptional prospects for using genomic data for karyotype analysis are beyond doubt.

Key words: chromosome; karyotype; chromosomal rearrangements; telomere; meiotic drive; recombination; sex chromosomes; inversion; synteny

For citation: Lukhtanov V.A., Pazhenkova E.A. Cytogenetics of insects in the era of chromosome-level genome assemblies. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(2):230-237. doi 10.18699/vjgb-25-26

Введение

Прогресс в науке часто бывает обусловлен появлением новых методов и методологий исследования. Если говорить о генетике, то одним из таких принципиально новых подходов, который дал мощный толчок к развитию дисциплины, стала процедура секвенирования нуклеотидных последовательностей (Heather, Chain, 2016). Усовершенствование технологий секвенирования наряду с разработками в области биоинформатического анализа и разработкой Hi-C метода (Lieberman-Aiden et al., 2009) привели к созданию еще одной прорывной методологии – получению хромосомных сборок полных геномов (Dudchenko et al., 2017). Эта методология революционизировала исследования в области сравнительной цитогенетики, стимулировав появление большого числа работ, посвященных структуре и закономерностям преобразований хромосом, а также роли хромосомных изменений в эволюции живых организмов. Фактически эта методология переключила внимание многих биологов-биоинформатиков с анализа нуклеотидных замен на анализ структурных изменений ДНК, которые до этого изучались почти исключительно методами микроскопии.

Цель нашего краткого обзора – обобщение достижений сравнительной и эволюционной цитогенетики насекомых, которые были получены на основании биоинформатического анализа хромосомных сборок полных геномов.

Цитогенетика насекомых и основные этапы ее развития

Хотя кариотипы некоторых модельных видов насекомых, таких как комар-звонец *Chironomus plumosus* и тутовый шелкопряд *Bombyx mori*, изучены чрезвычайно детально (Кикнадзе и др., 1991; Yoshido et al., 2005; Kiknadze et al., 2016), для немодельных видов информация о кариотипах, если и имеется вообще, часто ограничивается значением диплоидного (или гаплоидного) числа хромосом, приблизительным описанием размерных характеристик отдельных хромосом и, реже, отдельных хромосомных плеч в виде центромерного индекса (Peruzzi, Eroğlu, 2013). Следует отметить, что получение последней характеристики в принципе невозможно для представителей многих отрядов насекомых, например для бабочек и клопов, так как они имеют хромосомы голоцентрического типа, т.е. не имеют локализованной центромеры (Mandrioli, Manicardi, 2020). Такая плохая изученность в значительной степени связана с объективными трудностями анализа хромосом с помощью микроскопа: размеры хромосом и их отдельных

элементов нередко находятся на пределе разрешающей возможности световой микроскопии.

Неудивительно поэтому, что развитие цитогенетики, начиная с ее зарождения в XIX в., шло под знаменем попыток увеличения разрешающей силы цитогенетического анализа. Первый этап истории цитогенетики можно назвать эпохой хромосомных чисел. Он возник во второй половине XIX в., когда появились первые описания и изображения кариотипов, содержащие правильное определение числа хромосом (например, Henking, 1890). Расцвет этой эпохи пришелся на первую половину XX в., когда изучение кариотипов стало массовым явлением (Beliajeff, 1930; White, 1973).

Серьезный прогресс в цитогенетических исследованиях был связан с разработкой и широким распространением во второй половине XX в. методов дифференциального окрашивания хромосом, таких как C-banding (Pardue, Gall, 1970) и G-banding (Seabright, 1971). Цитогенетика вступила в эпоху хромосомного бэндинга. Почти одновременно возникли и параллельно развивались еще более мощные методы цитогенетического анализа, основанные на использовании метода FISH (Gall, Pardue, 1969; Langer-Safer et al., 1982) и его модификаций, например BAC-FISH (BAC Resource Consortium, 2001; Yoshido et al., 2005) и хромосомный пэинтинг (Schrock et al., 1996; Speicher et al., 1996). Это привело к потрясающим успехам в цитогенетике многих групп организмов, особенно позвоночных (Ferguson-Smith, Trifonov, 2007; Graphodatsky et al., 2011). Что касается насекомых, то, за исключением некоторых модельных видов (Yoshido et al., 2005), прогресс коснулся их в меньшей степени. Конечно, световые микроскопы стали намного лучше и получаемые изображения кариотипов стали намного четче по сравнению с тем, что было сто лет назад. Дополнительно метод GISH позволил эффективно выявлять половые хромосомы (Fuková et al., 2005; Šichová et al., 2015). Несмотря на это, цитогенетика многих групп насекомых, например большинства семейств чешуекрылых, до сих пор пребывает в стадии элементарного подсчета хромосомных чисел (Pazhenkova, Lukhtanov, 2023a).

Хромосомные сборки полных геномов – новый инструмент для изучения кариотипов в эволюционной цитогенетике

Настоящая революция в области изучения кариотипов произошла в течение последних шести-восьми лет. Современные подходы к анализу геномов, основанные на

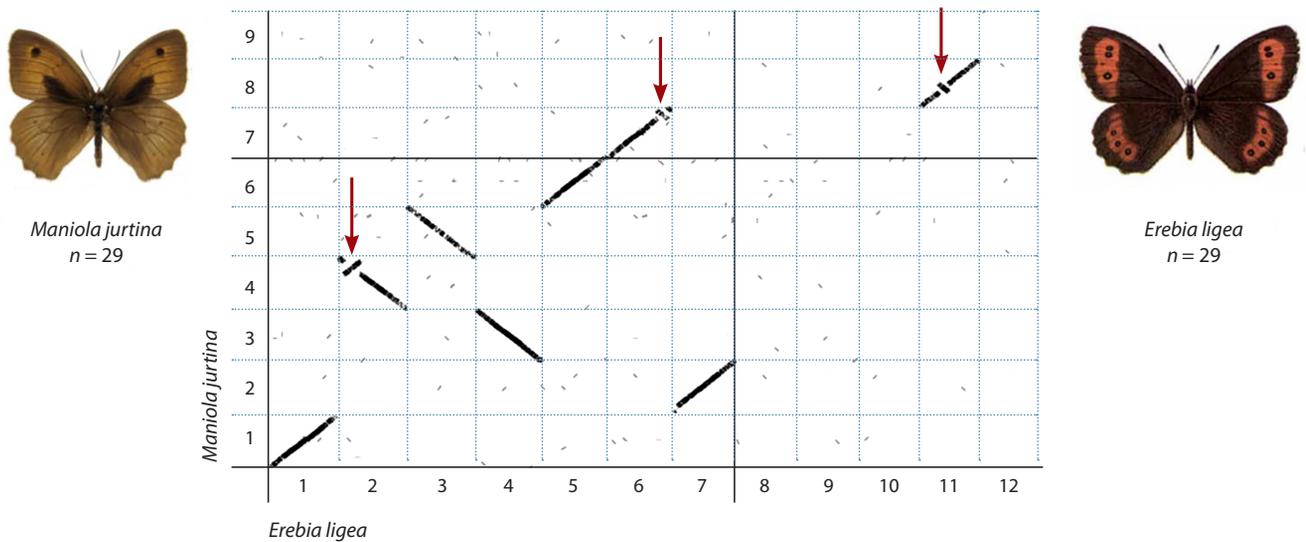


Рис. 1. Сравнение геномов бабочек *Maniola jurtina* и *Erebia ligea* на основе хромосомных сборок.

Бабочки *M. jurtina* и *E. ligea* имеют по 29 хромосом в гаплоидном наборе. На оси абсцисс картированы первые 12 хромосом *E. ligea*, на оси ординат – первые 9 хромосом *M. jurtina*. Диагонали на графике показывают участки макросинтемии. Инверсии отмечены красными стрелками. Видно, что хромосома 1 *M. jurtina* гомологична хромосоме 1 *E. ligea*, хромосома 2 *M. jurtina* гомологична хромосоме 7 *E. ligea* и т.д. (по: Pazhenkova, Lukhtanov, 2023b).

получении длинных прочтений и использовании Hi-C технологии (Dudchenko et al., 2017), позволяют получать сборки, в которых подавляющее большинство прочтений с высокой точностью разложено по отдельным хромосомам, причем все или хотя бы значительная часть хромосом прочитаны от теломеры к теломере (Miga et al., 2020; The Darwin Tree..., 2022; Zhang et al., 2023).

Сейчас хромосомные сборки геномов высокого качества имеются для представителей большинства отрядов насекомых: блох (Siphonaptera) (Driscoll et al., 2020), веснянок (Plecoptera) (Dixon et al., 2023), двукрылых (Diptera) (Zamyatin et al., 2021; Reinhardt et al., 2023), жуков (Coleoptera) (Van Dam et al., 2021; Huang et al., 2022), ногохвосток (Collembola) (Jin et al., 2023), палочников (Phasmatodea) (Lavanchy et al., 2024), перепончатокрылых (Hymenoptera) (Sun et al., 2021), поденок (Ephemeroptera) (Farr et al., 2023), полужесткокрылых (Hemiptera) (Biello et al., 2021; Mathers et al., 2021; Chen H. et al., 2022; Wang et al., 2024), прямокрылых (Orthoptera) (Li R. et al., 2024), ручейников (Trichoptera) (Ge et al., 2024), сеноедов (Psocoptera) (Feng et al., 2022), сетчатокрылых (Neuroptera) (Wang et al., 2022), стрекоз (Odonata) (Patterson et al., 2024), трипсов (Thysanoptera) (Yingning et al., 2024), ухверток (Dermaptera) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCA_963082975.1/) и большого числа видов чешуекрылых (Lepidoptera) (Mackintosh et al., 2022a; Gauthier et al., 2023; Wright et al., 2024). Эти сборки содержат информацию о гаплоидном числе хромосом и длине каждой хромосомы, измеренной в числе пар нуклеотидов. Почти всегда имеется также информация о наличии и размерах половой хромосомы X (Z для чешуекрылых и ручейников, у которых гетерогаметным полом являются самки) и реже половой хромосомы Y (W для чешуекрылых).

Использование хромосомных сборок генов в цитогенетике фактически привело к появлению новой методологии

и нового инструмента для изучения хромосом и хромосомных перестроек, мощность которого значительно превосходит возможности световой микроскопии. Основой методологии является получение попарного или множественного выравнивания хромосомных сборок разных видов, которое обычно представляется в виде кольцевых диаграмм (Krzywinski et al., 2009). Другой вариант анализа – получение попарных сравнений, представленных в виде точечных диаграмм (dot plot) (Li H., 2018), на которых по осям абсцисс и ординат откладываются нуклеотидные последовательности отдельных хромосом, начиная с первой, самой крупной хромосомы (рис. 1). Такие графики наглядно демонстрируют макросинтенные участки и четко выявляют слияния/разделения хромосом, а также хромосомные инверсии. Последние видны на графике в виде отрезков, которые перпендикулярны основным диагоналям (см. рис. 1).

Геномный подход позволил по-новому взглянуть на частную цитогенетику многих групп насекомых, для которых ранее информация о кариотипах ограничивалась элементарным подсчетом числа митотических или мейотических хромосом. Однако еще более внушительны достижения геномного подхода для изучения общих закономерностей организации и эволюции хромосом и кариотипов у насекомых. Метод был с успехом использован для анализа кариотипической эволюции в терминах паттерна хромосомных перестроек, возникновения новых кариотипов и времени сохранения хромосомных синтений (Biello et al., 2021; Mathers et al., 2021; Sun et al., 2021; Van Dam et al., 2021; Höök et al., 2023; Hundsdoerfer et al., 2023; Wright et al., 2024), а также для выявления анцестральных кариотипов (Chen X. et al., 2023; Wright et al., 2024). Хромосомные сборки полных геномов были применены для изучения мейотического драйва (Reinhardt et al., 2023; Voman et al., 2024), эволюции половых хромосом

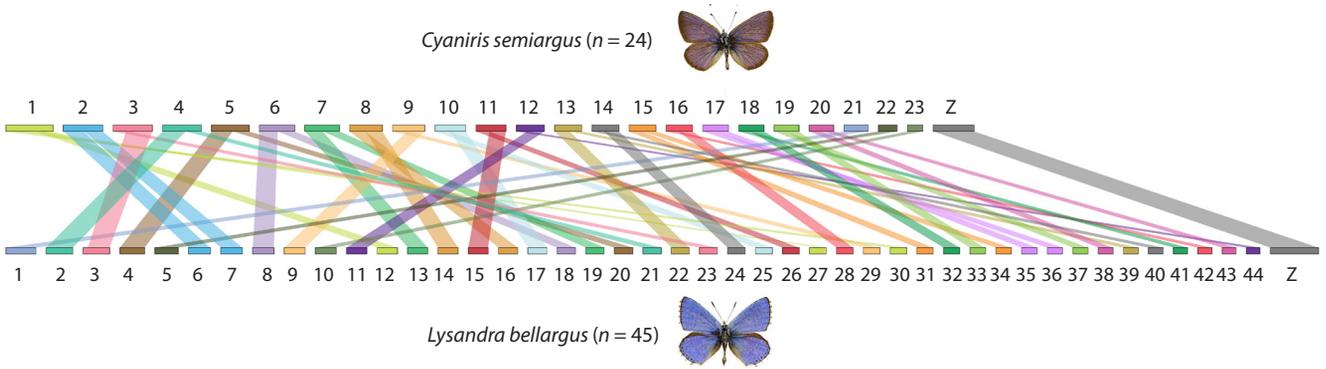


Рис. 2. Схематическое изображение хромосом и участков макросинтези в кариотипах бабочек *Cyaniris semiargus* ($n = 23+Z$) и *Lysandra bellargus* ($n = 44+Z$).

Кариотип *L. bellargus* отличается от кариотипа *C. semiargus* разделениями хромосом, которые произошли в 21 из 23 аутосом (по: Pazhenkova, Lukhtanov, 2023a).

(Mackintosh et al., 2022b; Berner et al., 2023; Höök et al., 2023, 2024), межвидового переноса хромосомной инверсии в процессе межвидовой гибридизации (Seixas et al., 2021), роли хромосомных перестроек в эволюции частоты рекомбинации (Näsvallet al., 2023) и для выявления геномных координат для точек разрывов, приводящих к появлению хромосомных перестроек (Zamyatin et al., 2021).

Хромосомный консерватизм и быстрая кариотипическая эволюция

В нашей работе (Pazhenkova, Lukhtanov, 2023a) мы использовали анализ хромосомных сборок полных геномов для решения одной из загадок эволюционной цитогенетики. Известно, что хромосомные числа многих насекомых консервативны и сохраняются без изменений или с минимальными изменениями на протяжении десятков и сотен миллионов лет (White, 1973). Например, у бабочек ancestrальное для отряда гаплоидное число хромосом $n = 31$ сохраняется в течение 200 миллионов лет, хотя нередко наряду с $n = 31$ у отдельных видов встречается $n = 30$. В семействе Lycaenidae преобладает гаплоидное число $n = 24$, а также часто встречается $n = 23$ (Robinson, 1971). Это наводит на мысль о том, что крупные хромосомные перестройки редки в эволюции отряда Lepidoptera. В то же время в отдельных родах бабочек происходят «взрывы» кариотипической изменчивости, и хромосомные числа кардинально меняются очень быстро, например, в процессе расхождения двух близких видов (White, 1973). Хромосомные механизмы такой быстрой кариотипической эволюции были непонятны. Кроме того, неясно, насколько реален сам феномен хромосомного консерватизма, так как внешне сходные кариотипы могут различаться многочисленными перестройками, которые не меняли хромосомных чисел.

Сравнив хромосомные сборки видов чешуекрылых разного эволюционного возраста и разной степени дифференциации хромосомных чисел, мы пришли к выводу, что в эволюционной фазе хромосомного консерватизма большинство аутосом действительно стабильны. Однако это не касается половой хромосомы Z. Независимые, происходящие в разных эволюционных линиях слияния Z-хромосомы с одной из аутосом приводят к множест-

венным вариантам NeoZ-хромосомы и уменьшению гаплоидного числа на одну единицу.

Что касается взрывной кариотипической эволюции, то наиболее быстрые изменения хромосомных чисел осуществляются парсимониальным способом: в результате простых слияний и разделений хромосом (рис. 2). Причем эти слияния и разделения не случайны и могут происходить в разных филогенетических линиях за счет повторного использования одних и тех же предковых хромосомных точек разрыва (Pazhenkova, Lukhtanov, 2023a). Следует также отметить, что тенденция к разрывам скоррелирована с наличием в хромосомах так называемых интерстициальных теломер — теломероподобных структур, расположенных не на концах хромосом, а внутри них (рис. 3).

Теломерная ДНК насекомых

Считается, что у большинства насекомых теломерная ДНК состоит из канонического пятибуквенного мотива TTAGG, который на концах хромосом повторяется сотни и тысячи раз (Kuznetsova et al., 2020). Однако анализ теломерной ДНК у 220 видов насекомых в наших исследованиях (Lukhtanov, 2022; Lukhtanov, Pazhenkova, 2023), а также результаты появившихся параллельно других работ (Zhou et al., 2022; Fajkus et al., 2023) показали, что помимо канонического мотива TTAGG у насекомых встречается большее число других вариантов теломерных повторов, длина которых варьирует от 1 до 11 нуклеотидов (см. таблицу).

Еще более интригующим оказалось то, что у большинства насекомых теломеры имеют сложное мультислойное строение (Lukhtanov, Pazhenkova, 2023). В этих теломерах блоки простых мотивов закономерным образом прерываются ретротранспозонами, которые специфически встроены в повторы как канонического мотива TTAGG (см. рис. 3), так и других неканонических мотивов. Такое строение, на наш взгляд, косвенно указывает на наличие у насекомых двух параллельно существующих механизмов поддержания длины теломер в клеточных делениях: классического теломеразного механизма и механизма, основанного на транспозициях. В целом насекомые характеризуются большим разнообразием в организации теломерной ДНК (рис. 4).

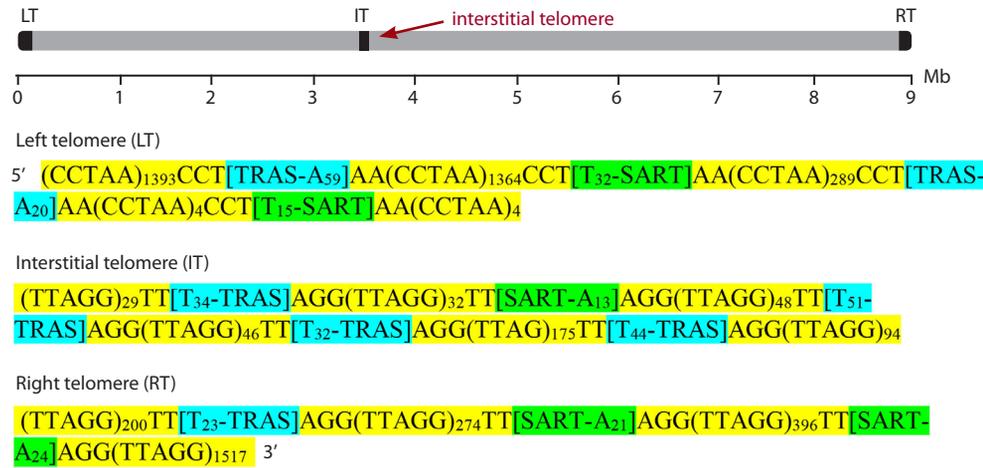


Рис. 3. Структура теломер и интерстициальных теломер в хромосоме 38 бабочки *Lysandra bellargus*.

Каждая теломера представляет собой длинную последовательность (CCTAA)_n/(TTAGG)_n (показана желтым цветом) со вставками ретротранспозонов, относящихся к семействам TRAS (синий цвет) и SART (зеленый). Элементы TRAS и SART заканчиваются длинными хвостами A_n/T_n и T_n/A_n и специфически вставлены между нуклеотидами CCT/AGG и AA/TT мотива TTAGG (по: Pazhenkova, Lukhtanov, 2023a).

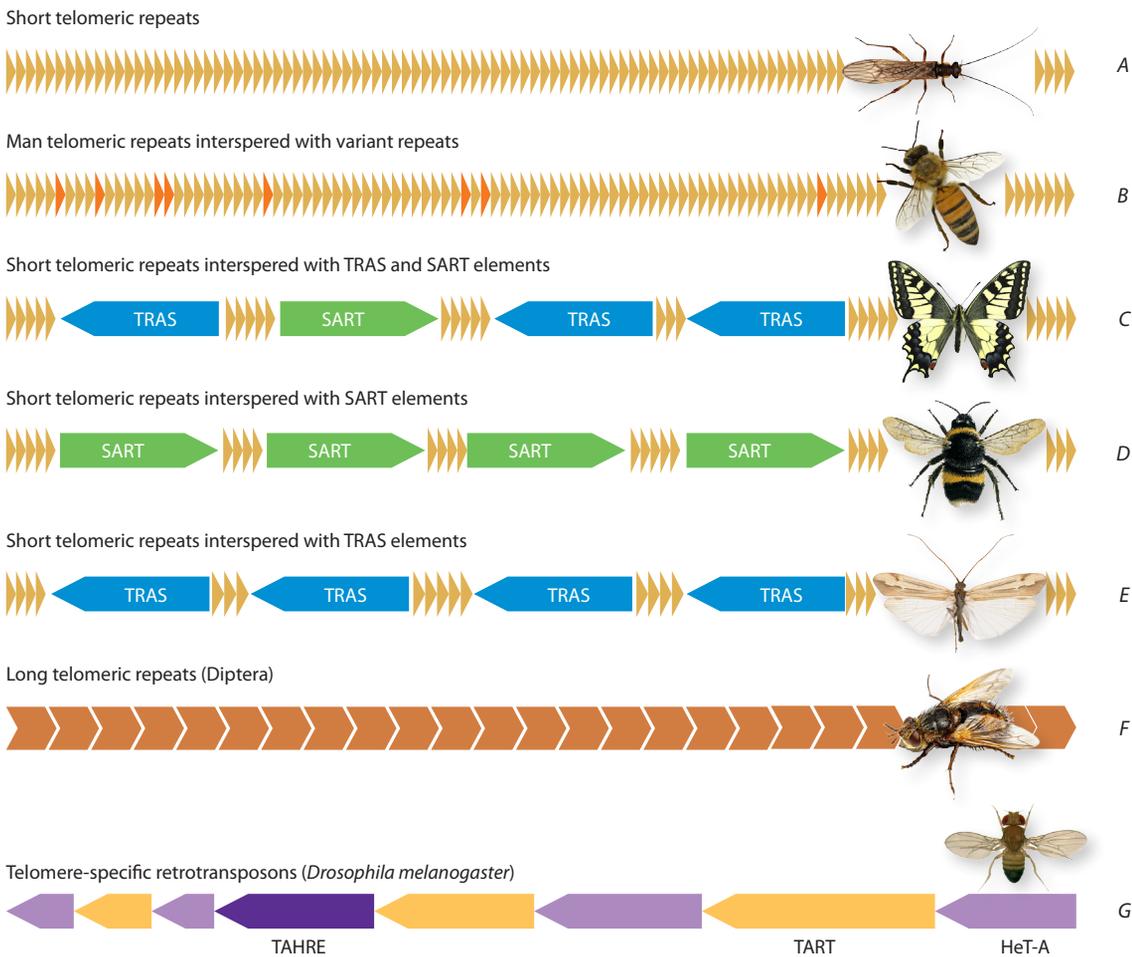


Рис. 4. Варианты организации теломерной ДНК у насекомых.

A – короткие теломерные мотивы; B – короткие мотивы, в которые спорадично встроены видоизмененные мотивы; найдены у медоносной пчелы *Apis mellifera* (Wallberg et al., 2019); C – блоки коротких повторов, в которые встроены ретротранспозоны типов TRAS и SART; обнаружены в отряде Lepidoptera. D – блоки коротких повторов, в которые встроены SART ретротранспозоны; обнаружены в отрядах Hemiptera, Coleoptera и у многих Hymenoptera; E – блоки коротких повторов, в которые встроены TRAS ретротранспозоны; обнаружены у ручейников (отряд Trichoptera); F – длинные теломерные мотивы; найдены у Diptera; G – теломероспецифические ретротранспозоны типов HeT-A, TAHRE и TART; найдены в роде *Drosophila* (Diptera) (Biessmann et al., 2000; Casacuberta, Pardue, 2003).

Неканонические теломерные мотивы, обнаруженные у насекомых (Lukhtanov, Pazhenkova, 2023)

1 п.н.	5 п.н.	6 п.н.	8 п.н.	10 п.н.	11 п.н.
T	TTGGG	TTAGGG	TTATTGGG	TTAGGGATGG	TTAGGTCTGGG
	TCAGG	TTCCTC		TTAGGGGTGG	TTAGTCTGGG
		TTTGGG		TTAGGGTGGT	TTAGGTTGGGG
		TCTGGG		TTAGTTGGG	TTAGGTTCTGGG
				TTTGTGGG	TTAGGTTGGG
				TTATTGAGGT	TTGGGTCTGGG
					TTGCGTCTGGG
					TTGCGTCAGGG

Перспективы использования хромосомных сборок геномов в цитогенетике

Число высококачественных хромосомных сборок геномов, доступных в базе данных GenBank, растет в геометрической прогрессии благодаря деятельности разных лабораторий, и в первую очередь института Сэнгера (The Wellcome Sanger Institute) в Великобритании (The Darwin Tree..., 2022). На 15 мая 2024 г. в базе данных NSBI имелась информация по хромосомным сборкам геномов (включающая определение гаплоидного числа хромосом) для 1118 видов насекомых (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/?taxon=50557>). Таким образом, можно констатировать, что за последние три-четыре года число новых для науки кариотипов насекомых, полученных с помощью биоинформатического анализа геномов, сравнимо или даже превышает число кариотипов, изученных с помощью рутинного цитогенетического анализа. При этом хромосомные сборки геномов несут на несколько порядков большую информацию о кариотипах.

Это, конечно, не означает, что надо сбрасывать со счетов классическую цитогенетику, которая дает информацию о реальных пространственных конфигурациях хромосом. Классическая цитогенетика нужна также для валидации хромосомных сборок геномов, в частности для подтверждения числа хромосом (Pazhenkova, Lukhtanov, 2023a) и структуры теломерных мотивов (Dalla Benetta et al., 2020; Stoianova et al., 2024). Примеры такой валидации укрепляют вывод о том, что хромосомные сборки геномов являются надежным источником сведений о кариотипах. Так, для чешуекрылых (отряд Lepidoptera) хромосомные сборки, включающие определение гаплоидного числа хромосом, имеются для 452 видов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/?taxon=7088>, от 15 мая 2024 г.). Более чем для половины из них есть данные по хромосомным числам, полученные методами световой микроскопии. Сравнив их, мы обнаружили полное совпадение в подсчетах гаплоидного числа хромосом, сделанных при помощи биоинформатического подхода и с использованием методов классической цитогенетики (Pazhenkova, Lukhtanov, 2023a).

Таким образом, исключительные перспективы использования хромосомных сборок геномов для анализа кариотипов не вызывают никаких сомнений.

Список литературы / References

Кикнадзе И.И., Шилова А.И., Керкис И.Е., Шобанов Н.А., Зеленцов Н.И., Гребенюк Л.П., Истомина А.Г., Прасолов В.А. Кариотипы и морфология личинок трибы Chironomini. Атлас. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1991
[Kiknadze I.I., Shilova A.I., Kerkis I.E., Shobanov N.A., Zelentsov N.I., Grebenyuk L.P., Istomina A.G., Prasolov V.A. Karyotypes and Morphology of Larvae of the Tribe Chironomini. Atlas. Novosibirsk: Nauka Publ., 1991 (in Russian)]

BAC Resource Consortium. Integration of cytogenetic landmarks into the draft sequence of the human genome. *Nature*. 2001;409:953-958. doi 10.1038/35057192

Belijaev N.K. Die Chromosomenkomplexe und ihre Beziehung zur Phylogenie bei den Lepidopteren. *Z Vererbungslehre*. 1930;14:369-399. doi 10.1007/BF01848966

Berner D., Ruffener S., Blattner L.A. Chromosome-level assemblies of the *Pieris mannii* butterfly genome suggest Z-origin and rapid evolution of the W chromosome. *Genome Biol Evol*. 2023;15(6):evad111. doi 10.1093/gbe/evad111

Biello R., Singh A., Godfrey C.J., Fernández F.F., Mugford S.T., Powell G., Hogenhout S.A., Mathers T.C. A chromosome-level genome assembly of the woolly apple aphid, *Eriosoma lanigerum* Hausmann (Hemiptera: Aphididae). *Mol Ecol Resour*. 2021;21(1):316-326. doi 10.1111/1755-0998.13258

Biessmann H., Zurovcova M., Yao J.G., Lozovskaya E., Walter M.F. A telomeric satellite in *Drosophila virilis* and its sibling species. *Chromosoma*. 2000;109:372-380. doi 10.1007/s004120000094

Boman J., Wiklund C., Vila R., Backström N. Meiotic drive against chromosome fusions in butterfly hybrids. *Chromosome Res*. 2024;32(2):7. doi 10.1007/s10577-024-09752-0

Casacuberta E., Pardue M.L. Transposon telomeres are widely distributed in the *Drosophila* genus: TART elements in the *virilis* group. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:3363-3368. doi 10.1073/pnas.0230353100

Chen H., Qiao G., Liang A. Chromosome-level genome assembly of *Callitettix versicolor* (rice spittlebug). *Genome Biol Evol*. 2022;14(9):evac130. doi 10.1093/gbe/evac130

Chen X., Wang Z., Zhang C., Hu J., Lu Y., Zhou H., Mei Y., Cong Y., Guo F., Wang Y., He K., Liu Y., Li F. Unraveling the complex evolutionary history of lepidopteran chromosomes through ancestral chromosome reconstruction and novel chromosome nomenclature. *BMC Biol*. 2023;21:265. doi 10.1186/s12915-023-01762-4

Dalla Benetta E., Antoshechkin I., Yang T., Nguyen H.Q.M., Ferree P.M., Akbari O.S. Genome elimination mediated by gene expression from a selfish chromosome. *Sci Adv*. 2020;6:eaa9808. doi 10.1126/sciadv.aaz9808

Dixon A., Macadam C.R., Natural History Museum Genome Acquisition Lab, Darwin Tree of Life Barcoding collective, Wellcome Sanger Institute Tree of Life programme, Wellcome Sanger Institute Scientific Operations: DNA Pipelines collective, Tree of Life Core

- Informatics collective, Darwin Tree of Life Consortium. The genome sequence of the spring stonefly, *Protonemura montana* (Kimmings, 1941) [version 1; peer review: awaiting peer review]. *Wellcome Open Res.* 2023;8:333. doi 10.12688/wellcomeopenres.19790.1
- Driscoll T.P., Verhoeve V.I., Gillespie J.J., Johnston J.S., Guillotte M.L., Rennoll-Bankert K.E., Rahman M.S., Hagen D., Elsik C.G., Macaluso K.R., Azad A.F. A chromosome-level assembly of the cat flea genome uncovers rampant gene duplication and genome size plasticity. *BMC Biol.* 2020;18(1):70. doi 10.1186/s12915-020-00802-7
- Dudchenko O., Batra S.S., Omer A.D., Nyquist S.K., Hoeger M., Durand N.C., Shamim M.S., Machol I., Lander E.S., Aiden A.P., Aiden E.L. De novo assembly of the *Aedes aegypti* genome using Hi-C yields chromosome-length scaffolds. *Science.* 2017;356(6333):92-95. doi 10.1126/science.aal3327
- Fajkus P., Adámik M., Nelson A.D.L., Kilar A.M., Franek M., Bubník M., Frydrychová R.Č., Votavová A., Sýkorová E., Fajkus J., Peška V. Telomerase RNA in Hymenoptera (Insecta) switched to plant/ciliate-like biogenesis. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(1):420-433. doi 10.1093/nar/gkac1202
- Farr A., Macadam C.R., Natural History Museum Genome Acquisition Lab; Darwin Tree of Life Barcoding collective; Wellcome Sanger Institute Tree of Life programme; Wellcome Sanger Institute Scientific Operations: DNA Pipelines collective; Tree of Life Core Informatics collective; Darwin Tree of Life Consortium. The genome sequence of the Northern Summer Mayfly, *Siphonurus alternatus* (Say, 1824) [version 1; peer review: 2 approved, 3 approved with reservations]. *Wellcome Open Res.* 2023;8:488. doi 10.12688/wellcomeopenres.20172.1
- Feng S., Opit G., Deng W., Stejskal V., Li Z. A chromosome-level genome of the booklouse, *Liposcelis brunnea*, provides insight into louse evolution and environmental stress adaptation. *GigaScience.* 2022;11:giac062. doi 10.1093/gigascience/giac062
- Ferguson-Smith M.A., Trifonov V. Mammalian karyotype evolution. *Nat Rev Genet.* 2007;8(12):950-962. doi 10.1038/nrg2199
- Fuková I., Nguyen P., Marec F. Codling moth cytogenetics: karyotype, chromosomal location of rDNA, and molecular differentiation of sex chromosomes. *Genome.* 2005;48(6):1083-1092. doi 10.1139/g05-063
- Gall J.G., Pardue M.L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1969;63(2):378-383. doi 10.1073/pnas.63.2.378
- Gauthier J., Meier J., Legeai F., McClure M., Whibley A., Bretaud A., Boulain H., Parrinello H., Mugford S.T., Durbin R., Zhou C., McCarthy S., Wheat C.W., Piron-Prunier F., Monsempe C., François M.C., Jay P., Noûs C., Persyn E., Jacquin-Joly E., Meslin C., Montagné N., Lemaitre C., Elias M. First chromosome scale genomes of ithomiine butterflies (Nymphalidae: Ithomiini): comparative models for mimicry genetic studies. *Mol Ecol Resour.* 2023;23(4):872-885. doi 10.1111/1755-0998.13749
- Ge X., Peng L., Deng Z., Du J., Sun C., Wang B. Chromosome-scale genome assemblies of *Himalopsyche anomala* and *Eubasilissa splendida* (Insecta: Trichoptera). *Sci Data.* 2024;11(1):267. doi 10.1038/s41597-024-03097-3
- Graphodatsky A.S., Trifonov V.A., Stanyon R. The genome diversity and karyotype evolution of mammals. *Mol Cytogenet.* 2011;4:22. doi 10.1186/1755-8166-4-22
- Heather J.M., Chain B. The sequence of sequencers: the history of sequencing DNA. *Genomics.* 2016;107(1):1-8. doi 10.1016/j.ygeno.2015.11.003
- Henking H. Untersuchung über die erster Entwicklungsvorgänge in den Eien der Insekten. I. Das Ei von *Pieris brassicae* L. nebst Bemerkungen über Samen und Samenbildung. *Z Wiss Zool.* 1890;49:503-564
- Höök L., Näsvalk K., Vila R., Wiklund C., Backström N. High-density linkage maps and chromosome level genome assemblies unveil direction and frequency of extensive structural rearrangements in wood white butterflies (*Leptidea* spp.). *Chromosome Res.* 2023;31(1):2. doi 10.1007/s10577-023-09713-z
- Höök L., Vila R., Wiklund C., Backström N. Temporal dynamics of faster Neo-Z evolution in butterflies. *Evolution.* 2024;78:1554-1567. doi 10.1093/evolut/qpae082
- Huang Q., Sim S.B., Geib S.M., Childers A., Liu J., Wei X., Han W., Posada-Florez F., Xue A.Z., Li Z., Evans J.D. Identification of sex chromosomes and primary sex ratio in the small hive beetle, a worldwide parasite of honey bees. *GigaScience.* 2022;12:giad056. doi 10.1093/gigascience/giad056
- Hundsdoerfer A.K., Schell T., Patzold F., Wright C.J., Yoshida A., Marec F., Daneck H., Winkler S., Greve C., Podsiadlowski L., Hiller M., Pippel M. High-quality haploid genomes corroborate 29 chromosomes and highly conserved synteny of genes in *Hyles* hawkmoths (Lepidoptera: Sphingidae). *BMC Genomics.* 2023;24(1):443. doi 10.1186/s12864-023-09506-y
- Jin J., Zhao Y., Zhang G., Pan Z., Zhang F. The first chromosome-level genome assembly of *Entomobrya proxima* Folsom, 1924 (Collembola: Entomobryidae). *Sci Data.* 2023;10(1):541. doi 10.1038/s41597-023-02456-w
- Kiknadze I., Istomina A., Golygina V., Gunderina L. Karyotypes of Palearctic and Holarctic Species of the Genus *Chironomus*. Novosibirsk: Academic Publishing House "Geo", 2016
- 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;19:1639-1645. doi 10.1101/gr.092759.109
- Kuznetsov V., Grozeva S., Gokhman V. Telomere structure in insects: a review. *J Zool Syst Evol Res.* 2020;58:127-158. doi 10.1111/jzs.12332
- Langer-Safer P.R., Levine M., Ward D.C. Immunological method for mapping genes on drosophila polytene chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982;79(14):4381-4385. doi 10.1073/pnas.79.14.4381
- Lavanchy G., Brandt A., Bastardot M., Dumas Z., Labédan M., Massy M., Toubiana W., Tran Van P., Luchetti A., Scali V., Mantovani B., Schwander T. Evolution of alternative reproductive systems in *Bacillus* stick insects. *Evolution.* 2024;78(6):1109-1120. doi 10.1093/evolut/qpae045
- Li H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics.* 2018;34:3094-3100
- Li R., Qin Y., Rong W., Deng W., Li X. Chromosome-level genome assembly of the pygmy grasshopper *Eucriotettix oculatus* (Orthoptera: Tetrigoidea). *Sci Data.* 2024;11:431. doi 10.1038/s41597-024-03276-2
- Lieberman-Aiden E., van Berkum N.L., Williams L., Imakaev M., Ragozcy T., Telling A., Amit I., Lajoie B.R., Sabo P.J., Dorschner M.O., Sandstrom R., Bernstein B., Bender M.A., Groudine M., Gnirke A., Stamatoyannopoulos J., Mirny L.A., Lander E.S., Dekker J. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science.* 2009;326(5950):289-293. doi 10.1126/science.1181369
- Lukhtanov V.A. Diversity and evolution of telomere and subtelomere DNA sequences in insects. *bioRxiv.* 2022. doi 10.1101/2022.04.08.487650
- Lukhtanov V.A., Pazhenkova E.A. Diversity and evolution of telomeric motifs and telomere DNA organization in insects. *Biol J Linn Soc.* 2023;140:536-555. doi 10.1093/biolinnean/blad068
- Mackintosh A., Laetsch D.R., Baril T., Ebdon S., Jay P., Vila R., Hayward A., Lohse K. The genome sequence of the scarce swallowtail, *Iphiclidides podalirius*. *G3 (Bethesda).* 2022a;12(9):jkac193. doi 10.1093/g3journal/jkac193
- Mackintosh A., Laetsch D.R., Baril T., Foster R.G., Dincă V., Vila R., Hayward A., Lohse K. The genome sequence of the lesser marbled fritillary, *Brenthis ino*, and evidence for a segregating neo-Z chromosome. *G3 (Bethesda).* 2022b;12(6):jkac069. doi 10.1093/g3journal/jkac069
- Mandrioli M., Manicardi G.C. Holocentric chromosomes. *PLoS Genet.* 2020;16(7):e1008918. doi 10.1371/journal.pgen.1008918
- Mathers T.C., Wouters R.H.M., Mugford S.T., Swarbreck D., van Oosterhout C., Hogenhout S.A. Chromosome-scale genome assemblies

- of aphids reveal extensively rearranged autosomes and long-term conservation of the X chromosome. *Mol Biol Evol.* 2021;38(3):856-875. doi 10.1093/molbev/msaa246
- Miga K.H., Koren S., Rhie A., Vollger M.R., Gershman A., Bzikadze A., Brooks S., ... Pevzner P.A., Gerton J.L., Sullivan B.A., Eichler E.E., Phillippy A.M. Telomere-to-telomere assembly of a complete human X chromosome. *Nature.* 2020;585(7823):79-84. doi 10.1038/s41586-020-2547-7
- Näsvalk K., Boman J., Höök L., Vila R., Wiklund C., Backström N. Nascent evolution of recombination rate differences as a consequence of chromosomal rearrangements. *PLoS Genet.* 2023;19(8): e1010717. doi 10.1371/journal.pgen.1010717
- Pardue M.L., Gall J.G. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science.* 1970;168(3937):1356-1358. doi 10.1126/science.168.3937.1356
- Patterson C.W., Bonillas-Monge E., Brennan A., Grether G.F., Mendoza-Cuenca L., Tucker R., Vega-Sánchez Y.M., Drury J. A chromosome-level genome assembly for the smoky rubyspot damselfly (*Hetaerina titia*). *J Hered.* 2024;115(1):103-111. doi 10.1093/jhered/esad070
- Pazhenkova E.A., Lukhtanov V.A. Chromosomal conservatism vs chromosomal megaevolution: enigma of karyotypic evolution in Lepidoptera. *Chromosome Res.* 2023a;31:16. doi 10.1007/s10577-023-09725-9
- Pazhenkova E.A., Lukhtanov V.A. Whole-genome analysis reveals the dynamic evolution of holocentric chromosomes in satyrine butterflies. *Genes.* 2023b;14(2):437. doi 10.3390/genes14020437
- Peruzzi L., Eroğlu H.E. Karyotypic asymmetry: again, how to measure and what to measure? *Comp Cytogenet.* 2013;7(1):1-9. doi 10.3897/CompCytogen.v7i1.4431
- Reinhardt J.A., Baker R.H., Zimin A.V., Ladias C., Paczolt K.A., Weren J.H., Hayashi C.Y., Wilkinson G.S. Impacts of sex ratio meiotic drive on genome structure and function in a stalk-eyed fly. *Genome Biol Evol.* 2023;15(7):evad118. doi 10.1093/gbe/evad118
- Robinson R. Lepidoptera Genetics. Oxford: Pergamon Press, 1971
- Schrock E., du Manoir S., Veldman T., Schoell B., Wienberg J., Ferguson-Smith M.A., Ning Y., Ledbetter D.H., Bar-Am I., Soenksen D., Garini Y., Ried T. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science.* 1996;273(5274):494-497. doi 10.1126/science.273.5274.494
- Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet.* 1971;2(7731):971-972. doi 10.1016/s0140-6736(71)90287-x
- Seixas F.A., Edelman N.B., Mallet J. Synteny-based genome assembly for 16 species of *Heliconius* butterflies, and an assessment of structural variation across the genus. *Genome Biol Evol.* 2021;13(7): evab069. doi 10.1093/gbe/evab069
- Šíchová J., Voleníková A., Dincă V., Nguyen P., Vila R., Sahara K., Marec F. Dynamic karyotype evolution and unique sex determination systems in *Leptidea* wood white butterflies. *BMC Evol Biol.* 2015;15:89. doi 10.1186/s12862-015-0375-4
- Speicher M.R., Ballard S.G., Ward D.C. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet.* 1996;12:368-375. doi 10.1038/ng0496-368
- Stoianova D., Grozeva S., Golub N.V., Anokhin B.A., Kuznetsova V.G. The first FISH-confirmed non-canonical telomeric motif in Heteroptera: *Cimex lectularius* Linnaeus, 1758 and *C. hemipterus* (Fabricius, 1803) (Hemiptera, Cimicidae) have a 10 bp motif (TTAGGGATGG)_n. *Genes.* 2024;15(8):1026. doi 10.3390/genes15081026
- Sun C., Huang J., Wang Y., Zhao X., Su L., Thomas G.W.C., Zhao M., ... Schaack S., Barribeau S.M., Williams P.H., Waterhouse R.M., Mueller R.L. Genus-wide characterization of bumblebee genomes provides insights into their evolution and variation in ecological and behavioral traits. *Mol Biol Evol.* 2021;38(2):486-501. doi 10.1093/molbev/msaa240
- The Darwin Tree of Life Project Consortium. Sequence locally, think globally: The Darwin Tree of Life Project. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2022;119:e2115642118. doi 10.1073/pnas.2115642118
- Van Dam M.H., Cabras A.A., Henderson J.B., Rominger A.J., Pérez Estrada C., Omer A.D., Dudchenko O., Lieberman Aiden E., Lam A.W. The Easter Egg Weevil (*Pachyrhynchus*) genome reveals syntenic patterns in Coleoptera across 200 million years of evolution. *PLoS Genet.* 2021;17(8):e1009745. doi 10.1371/journal.pgen.1009745
- Wallberg A., Bunikis I., Pettersson O.V., Mosbech M.B., Childers A.K., Evans J.D., Mikheyev A.S., Robertson H.M., Robinson G.E., Webster M.T. A hybrid de novo genome assembly of the honeybee, *Apis mellifera*, with chromosome length scaffolds. *BMC Genomics.* 2019;20:275. doi 10.1186/s12864-019-5642-0
- Wang Y., Zhang R., Wang M., Zhang L., Shi C.M., Li J., Fan F., Geng S., Liu X., Yang D. The first chromosome-level genome assembly of a green lacewing *Chrysopa pallens* and its implication for biological control. *Mol Ecol Resour.* 2022;22(2):755-767. doi 10.1111/1755-0998.13503
- Wang Y., Luo Y., Ge Y., Liu S., Liang W., Wu C., Wei S., Zhu J. Chromosome-level genome assembly of the predatory stink bug *Arma custos*. *Sci Data.* 2024;11:417. doi 10.1038/s41597-024-03270-8
- White M.J.D. Animal Cytology and Evolution. Cambridge: Cambridge University Press, 1973
- Wright C.J., Stevens L., Mackintosh A., Lawniczak M., Blaxter M. Comparative genomics reveals the dynamics of chromosome evolution in Lepidoptera. *Nat Ecol Evol.* 2024;8(4):777-790. doi 10.1038/s41559-024-02329-4
- Yingning L., Shuhua W., Wenting D., Miao M., Ying W., Rong Z., Liping B. Chromosome-level genome assembly of *Odontothrips loti* Haliday (Thysanoptera: Thripidae). *Sci Data.* 2024;11(1):451. doi 10.1038/s41597-024-03289-x
- Yoshido A., Bando H., Yasukochi Y., Sahara K. The *Bombyx mori* karyotype and the assignment of linkage groups. *Genetics.* 2005;170:675-685. doi 10.1534/genetics.104.040352
- Zamyatin A., Avdeyev P., Liang J., Sharma A., Chen C., Lukyanchikova V., Alexeev N., Tu Z., Alekseyev M.A., Sharakhov I.V. Chromosome-level genome assemblies of the malaria vectors *Anopheles coluzzii* and *Anopheles arabiensis*. *GigaScience.* 2021;10(3): giab017. doi 10.1093/gigascience/giab017
- Zhang T., Xing W., Wang A., Zhang N., Jia L., Ma S., Xia Q. Comparison of long-read methods for sequencing and assembly of lepidopteran pest genomes. *Int J Mol Sci.* 2023;24(1):649. doi 10.3390/ijms24010649
- Zhou Y., Wang Y., Xiong X., Appel A.G., Zhang C., Wang X. Profiles of telomeric repeats in Insecta reveal diverse forms of telomeric motifs in Hymenoptera. *Life Sci Alliance.* 2022;5:e202101163. doi 10.26508/lsa.202101163

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 24.05.2024. После доработки 11.09.2024. Принята к публикации 11.09.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-27

Аквапорины и их роль в растительно-микробных системах

Т.Р. Кудряшова , А.А. Крюков , А.И. Горенкова , А.П. Юрков 

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

 t.kudryashova@arriam.ru

Аннотация. Мировые потери сельскохозяйственной продукции из-за дефицита воды, вероятно, более значительны, чем от других причин, вместе взятых. Причины дефицита воды у растений могут быть связаны с недостатком атмосферных осадков, высокой температурой воздуха и другими факторами, которые могут привести к снижению содержания доступной для растений воды в почве. Большинство наземных растений способно вступать в симбиоз с грибами арбускулярной микоризы. Такой симбиоз выполняет ключевую роль в минеральном питании многих видов наземных растений. Транспорт воды в растениях, ее использование регулируются, в первую очередь, с участием трансмембранных белков – аквапоринов. С помощью аквапоринов растение может «экономить» воду, что является важным элементом стратегии адаптации растения к условиям дефицита воды. По некоторым сведениям, грибы арбускулярной микоризы в условиях засухи способны снижать экспрессию генов аквапоринов растения, тем самым уменьшая транспорт воды внутри тканей растения-хозяина, что приводит к ее «экономии». С другой стороны, в настоящее время в научной литературе информации о механизмах взаимодействия растения и грибов арбускулярной микоризы при регуляции работы аквапоринов недостаточно. Кроме того, имеющиеся в различных источниках сведения о работе аквапоринов у разных видов растений могут противоречить друг другу. Аквапорины в растениях представлены несколькими подсемействами, и их число для разных видов варьирует. Изучение этого семейства транспортеров важно для понимания водного транспорта в растениях и оценки влияния на него со стороны грибов арбускулярной микоризы. В обзоре собраны данные об истории изучения, структуре, локализации, филогении, функциях аквапоринов. Развитие знаний о функционировании симбиотических систем будет способствовать созданию биоудобрений на основе микробной биомассы для использования в сельском хозяйстве Российской Федерации.

Ключевые слова: аквапорины; AQP; арбускулярная микориза; засуха; транспорт воды в растениях; симбиоз

Для цитирования: Кудряшова Т.Р., Крюков А.А., Горенкова А.И., Юрков А.П. Аквапорины и их роль в растительно-микробных системах. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(2):238-247. doi 10.18699/vjgb-25-27

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-16-00064.

Aquaporins and their role in plant-microbial systems

T.R. Kudriashova , A.A. Kryukov , A.I. Gorenkova , A.P. Yurkov 

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia

 t.kudryashova@arriam.ru

Abstract. Global losses of agricultural products from water scarcity could be greater than from all other causes combined. Water deficiency in plants can result from insufficient precipitation, elevated air temperatures, and other factors that reduce the water available in the soil. Most terrestrial plants are able to form symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi. Arbuscular mycorrhiza plays a key role in the mineral nutrition of many terrestrial plant species. Water transport in plants is regulated primarily by aquaporins, transmembrane proteins. Aquaporins help plants save water, which is an important component of the plant's adaptation strategy to water scarcity. Some studies suggest that arbuscular mycorrhizal fungi can decrease the expression of aquaporin genes in plants under drought conditions, which reduces water transport within host plant tissues and conserves available water. On the other hand, there is little scientific evidence of the interaction mechanisms between plants and arbuscular mycorrhizal fungi during aquaporin regulation. In addition, the information in different sources on the aquaporin functions in different plant species may be contradictory. Plant aquaporins are represented by several subfamilies; their number varies for different species. A more comprehensive study of these transporters can enhance our understanding of water transport in plants and assess how arbuscular mycorrhizal fungi can influence it. This review contains data on the history of studies of the structure, localization, phylogeny, and functions of aquaporins. Advancing the study of the symbiotic system functioning may contribute to the development of biofertilizers based on soil microorganisms for agricultural uses in the Russian Federation.

Key words: aquaporins; AQP; arbuscular mycorrhiza; drought; water transport in plants; symbiosis

For citation: Kudriashova T.R., Kryukov A.A., Gorenkova A.I., Yurkov A.P. Aquaporins and their role in plant-microbial systems. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(2):238-247. doi 10.18699/vjgb-25-27

Введение

Стрессовые условия при засухе влияют на жизнь растений во многих аспектах. Например, при нехватке воды снижается скорость поступления питательных веществ в растение из почвы, что влияет на рост биомассы и отражается на урожайности сельскохозяйственных культур (Ahanger, Agarwal, 2017). В транспорте воды в растении участвуют белки из семейства аквапоринов (AQP). Это семейство является составной частью более крупного семейства MIP (major intrinsic proteins) (Nielsen et al., 2002; Zhou Y., MacKinnon, 2003). Семейство MIP названо по первому открытому транспортеру воды, найденному в волокнах хрусталика млекопитающих, в том числе и человека (впоследствии назван «Аквапорин 0» – Aquaporin 0). Аквапорины представлены интегральными мембранными белками, которые формируют трансмембранные поры в клетках. В ходе геномного исследования семейства AQP у ряда растений (24 вида, включая водоросли, мхи, плауновидные, двудольные и однодольные) аквапорины были разделены на восемь подсемейств с эволюционным развитием, от LIP (большие внутренние белки, обнаруженные у диатомовых водорослей) к TIP (интегральные белки тонопласта) (Hussain et al., 2020). Пять из восьми подсемейств MIP встречаются у семенных растений, включая однодольные и двудольные: интегральные белки плазматической мембраны (PIP), белки тонопласта (TIP), интегральные нодулин-26-подобные белки (NIP), малые основные интегральные белки (SIP) и неохарактеризованные интегральные белки (XIP) (Danielson, Johanson, 2008). Гибридные внутренние белки (HIP) и GLpF-подобные внутренние белки (GIP) встречаются только у мхов (Abascal et al., 2014; Singh et al., 2020).

Известно, что грибы арбускулярной микоризы (АМГ) способствуют поглощению растением-хозяином ряда питательных веществ (в основном фосфора), нормализуют водный баланс растения, а также регулируют водный транспорт (Schachtman et al., 1998; Huey et al., 2020). При этом в растениях при микоризации меняется регуляция генов AQP. При арбускулярно-микоризном (АМ) симбиозе кортикальные клетки корня создают периабускулярную мембрану, окутывающую каждую арбускулу АМ-гриба, тем самым отделяя гриб от цитоплазмы растения. Этот процесс устанавливает симбиоз между растениями и грибами, помогая растению-хозяину получать воду, питательные вещества и улучшая его устойчивость к засухе (Kakouridis et al., 2022). В консорциуме с другими микроорганизмами арбускулярная микориза потенциально может вытеснить классические химические удобрения, оказывающие негативное влияние на экосистемы, а также уменьшать деградацию земель, вызванную в том числе засухой (Kuila, Ghosh, 2022; Seka et al., 2022). Существует гипотеза о том, что снижение экспрессии аквапоринов при недостатке воды может быть способом минимизации ее потерь (Quiroga et al., 2017). Настоящий обзор направлен на раскрытие вопросов влияния АМ на водообмен растений, участия семейства AQP в устойчивости растений к засухе.

История изучения и структура аквапоринов

Транспорт воды в растении опосредуется тремя путями: апопластическим, симпластическим и трансмембранным.

Последний путь осуществляется с участием аквапоринов, присутствующих на биологических мембранах и образующих каналы (Singh et al., 2020). Такие каналы обеспечивают движение воды двунаправленно (Chrispeels, Agre, 1994).

История открытия аквапоринов началась в 1980-х годах, когда исследователи изучали механизмы транспорта воды через клеточные мембраны. В 1988 г. Питер Агре (Peter Agre) из университета Джона Хопкинса начал изучать белки красных кровяных телец. Он обнаружил белок, который связывался с антителами против гликофорина. Этот белок был назван CHIP28 (белок каналов воды) (Agre et al., 1993).

Несмотря на то что основная концепция о движении воды через биологическую мембрану была сформирована в начале 1950-х годов, первый водный канал CHIP28 был обнаружен лишь в 1992 г. Г.М. Престоном (Preston et al., 1992) в эритроцитах человека и назван впоследствии «аквапорин-1» (AQP-1). Позже аналогичный белок был также идентифицирован в *Escherichia coli* и назван «акваглицеропорин» (GLP-F).

В 1992 г. П. Агре и его коллеги клонировали ген *AQP1* и определили его структуру. AQP1 представляет собой трансмембранный белок с четырьмя трансмембранными доменами, образующими узкий канал, через который могут передвигаться молекулы воды (Agre et al., 1993). Первым зарегистрированным растительным аквапорином стал трансмембранный белок AtTIP1;1, обнаруженный на вакуолярной мембране у *Arabidopsis thaliana* (Maurel et al., 1993). Уже в 1999 г. белки MIP насчитывали 150 представителей, которые были идентифицированы на клеточных мембранах организмов, начиная с бактерий и заканчивая человеком (Lagrée et al., 1999). На сегодняшний день открыто более 7541 гомолога MIP у 484 видов эукариот (Irisarri et al., 2024). Подтверждено, что белки семейства MIP локализованы на клеточных мембранах всех живых организмов. Плазматические и внутренние мембраны, а также вирусные оболочки являются ключевыми локализациями MIP. С 2003 г., благодаря вручению Нобелевской премии П. Агре за открытие аквапоринов и Р. Маккиннону за открытие трехмерной молекулярной структуры бактериального калиевого канала и раскрытие природы его селективности, человечеству стало широко известно о семействе белков AQP (Кнеппер, Nielsen, 2004). Это открытие показало, как вода может быстро и эффективно проходить через клеточные мембраны, несмотря на их гидрофобную природу.

Участие аквапоринов в схеме поглощения и транспортировки воды микоризованными растениями изучается с 1997 г. В ходе начальных исследований была выявлена экспрессия генов аквапоринов подсемейства TIP у люцерны (*Medicago truncatula*) и петрушки (*Petroselinum crispum*), инокулированных АМ-грибами. Анализ транспортных свойств впервые был проведен на примере *MAQP1* (Krajinski et al., 2000). Считается, что первый AQP АМ-гриба в *Rhizophagus irregularis*, *RiAQP1*, был открыт в 2009 г. *RiAQP1* дифференциально экспрессировался во время стресса от холода и засухи в корнях растения-хозяина (Aroca et al., 2009). На сегодняшний день в области генетики, биотехнологии, медицины, сельского хозяйства отечественными и зарубежными учеными ак-

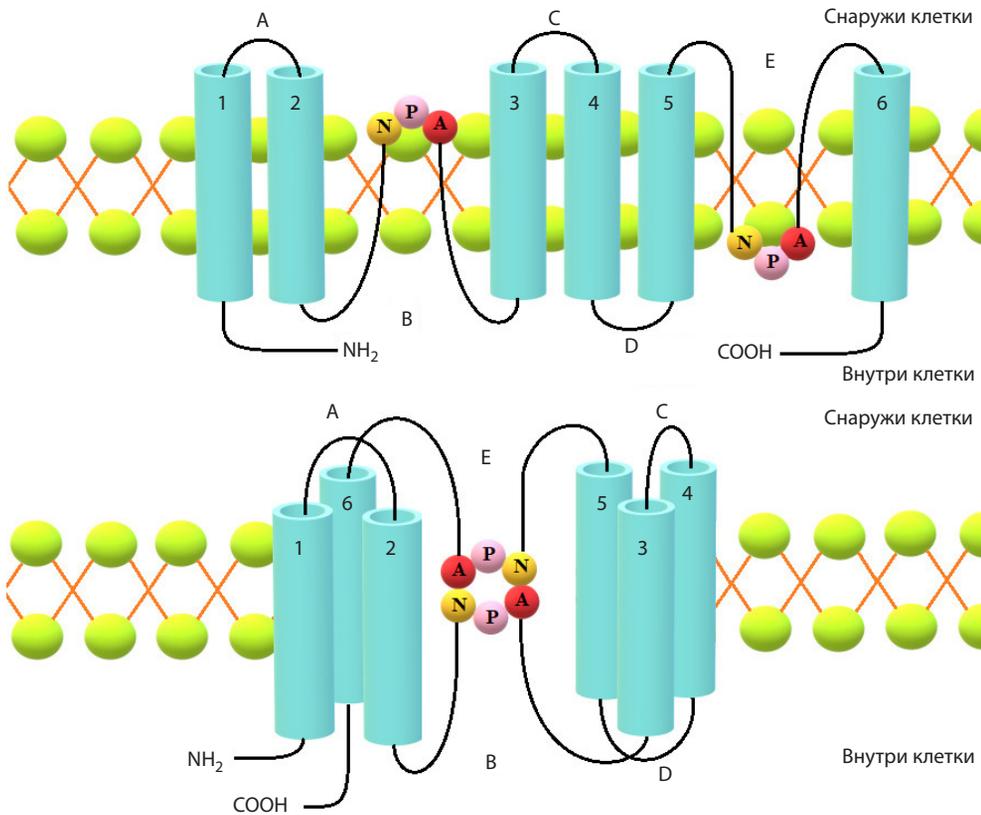


Схема структуры белка аквапорина, согласно (Karilan et al., 2018) с изменениями.

тивно продолжают исследования по изучению функций аквапоринов в различных тканях и органах.

Все представители семейства аквапоринов растений имеют сходную структуру. Она представляет собой тетрамер, состоящий из мономеров, каждый из которых имеет шесть трансмембранных доменов (1–6) и пять соединительных петель (A–E), локализованных на внутри- (B, D) или внецитозольной (A, C, E) стороне мембраны. Петли A и D имеют последовательность аспарагин-пролин-аланин (мотив NPA) и складываются в виде гидрофобных α -спиралей. Каждая из последовательностей NPA направлена в центр поры AQP. Последовательности способствуют сужению центральной поры и в сочетании с дипольным моментом двух α -спиралей, охватывающих мембрану, предотвращают проникновение протонов (H^+) (см. рисунок).

Оба конца, N и C, аквапоринов обращены к цитоплазматической стороне мембраны, и с их помощью осуществляется специфическая регуляция активности аквапорина. Кроме того, четыре консервативные последовательности образуют рядом с внецитозольным устьем поры типичную ароматическую аргининовую перетяжку, функционирующую как основной селективный фильтр (Hussain et al., 2020). Активность аквапорина контролируется посттрансляционными модификациями (фосфорилированием и метилированием), pH, Ca^{2+} , взаимодействиями между мономерами аквапоринов, в то время как субстратная специфичность AQP регулируется его строением (Wang Y. et al., 2020).

Филогения и подсемейства аквапоринов

Гены семейства MIP, в том числе аквапорины, у растений характеризуются большим количеством изоформ по сравнению с животными, так как растительные клетки более компартментализованы. AQP в растениях отличаются не только по видам, но и по субклеточной локализации, водопроводимости растворенных веществ и функциям (Chaumont, Tyerman, 2014; Afzal et al., 2016).

Исходя из структурных особенностей и функционального разнообразия AQP-белки, можно условно разделить на четыре подсемейства. Первое подсемейство функционирует как водонепроницаемый канал и называется классическим AQP-белком (C-AQP). Следующее подсемейство – акваглицеропорины (AQGP) – транспортируют глицерин. В третье подсемейство включены белки с сильно деградировавшими мотивами NPA, функции которых до сих пор не изучены. Это подсемейство названо супераквапорины или субклеточными аквапорины (SAQP). Его представители могут участвовать в трансмембранном переносе аммиака и некоторых других молекул. Это подсемейство называется “AQP-8” (Jia, Liu, 2020).

У модельных растений семейство аквапоринов представлено разным количеством транспортеров: *Avena sativa* имеет 45 генов AQP, *A. thaliana* – 38, *Solanum lycopersicum* – 47, *Physcomitrella patens* – 35, *Gossypium hirsutum* – 74, *Zea mays* – 41, *Oryza sativa* – 33, *Populus trichocarpa* – 54, *Glycine max* – 66 AQP. У рапса (*Brassica napus*) обнаружено наибольшее количество AQP – 121, из них: PIP – 43, TIP – 35, NIP – 32 и SIP – 11 (Hussain et al., 2020; Zhou X. et al., 2024).

У широко известного модельного растения *M. truncatula* было выявлено 46 предполагаемых локусов, кодирующих гены из пяти подсемейств аквапоринов: 10 PIP, 12 TIP, 18 NIP, 4 SIP и 2 XIP. Первые четыре подсемейства были далее разделены на 2 (PIP1-PIP2), 5 (TIP1-TIP5), 7 (NIP1-NIP7) и 2 (SIP1-SIP2) подгруппы соответственно, подсемейство XIP имело одну подгруппу с двумя представителями (Min et al., 2019). Подсемейство PIP-аквапоринов разделено на две подгруппы, PIP1 и PIP2. Различия между этими двумя подгруппами заключаются в водопроводимости этих белков, а также PIP1 имеют более длинные N-концевые, но более короткие C-концевые хвосты по сравнению с PIP2 (C-концевые концы имеют дополнительный участок из 4–10 аминокислот, расположенный в первой экстрацитозольной петле). PIP1 и PIP2 имеют 5 и 8 изоформ соответственно. Эти две подгруппы взаимодействуют путем гетероолигомеризации, при которой два мономера PIP2 образуют гетеротетрамеры с двумя мономерами PIP1 (Wang Y. et al., 2020).

Аквапорины подсемейства TIP в сравнении с PIP имеют больше изоформ и разделяются на пять подгрупп белков. Так, для *P. trichocarpa* показано, что среди 55 последовательностей белка MIP присутствует 17 TIP (Kapilan et al., 2018). У *Cicer arietinum* L. все TIP филогенетически разделены на 14 подгрупп. В результате построения филогенетического древа отмечено, что из 21 ветви только 4 – межвидовые, остальные – внутривидовые. В связи с этим расширяется их функциональность для видов растений (Hussain et al., 2020).

Белки NIP у растений имеют также много изоформ и делятся на пять подгрупп. Подгруппы NIP встречаются у всех высших растений, при этом NIP3 наблюдается в основном у однодольных (Lu et al., 2018). В частности, у тополя (*P. trichocarpa*) открыто 11 NIP (Gupta, Sankaramakrishnan, 2009). NIP обнаружены у *G. max*, *C. arietinum* и *Phaseolus vulgaris* в связи с симбиозом с азотфиксирующими бактериями. Последовательности NIP значительно различаются как внутри вида, так и между видами (Hussain et al., 2020). Большинство белков NIP имеют сходство с белком нодулином-26, который экспрессируется на мембране симбиосомы, когда корень бобового растения заражается ризобактериями (Kapilan et al., 2018).

Белки SIP небольшие, как и TIP. Основная причина их небольшого размера – очень короткая цитозольная N-концевая область по сравнению с другими AQP растений. На основе мотива NPA SIP1 делится на SIP1;1 и SIP1;2. Различные изоформы SIP-белков могут иметь разную водопроводимость для растворенных веществ (Kapilan et al., 2018).

Первая идентификация сравнительно недавно открытого подсемейства XIP была проведена у горного хлопчатника (*G. hirsutum*) в 2010 г. (Park et al., 2010). Известно 19 представителей XIP, в том числе 5 XIP у *P. trichocarpa*. Остальные 10 представителей XIP были описаны у других двудольных растений, 3 – у мхов и 1 – у простейших. Гомологи XIP отсутствовали у однодольных растений. Анализ экспрессии у *P. trichocarpa* показывает, что XIP у тополя не демонстрируют какого-либо обилия тканеспецифичных транскриптов (Gupta, Sankaramakrishnan, 2009; Kapilan et al., 2018).

Большое количество изоформ AQP в пределах подсемейств может способствовать расширению функций транспортеров и адаптации растений к изменяющимся условиям. Анализ молекулярной структуры AQP *M. truncatula* показал, что среди аквапоринов у 7 генов (15.2 %) выявляется тандемная дупликация, а у 10 генов (21.7 %) – сегментированная (Min et al., 2019). Соответственно, наличие большого количества изоформ и отдельных подгрупп различных подсемейств аквапоринов указывает на их высокую значимость для живых организмов.

Локализация и функции аквапоринов растений

В работе (Maurel et al., 2015) показано, что некоторые члены суперсемейства MIP, включая аквапорины, помимо воды, также могут транспортировать через мембраны глицерин, углекислый газ, мочевины, аммиак, перекись водорода, бор, кремний, мышьяк, антимонит, молочную кислоту и кислород. Некоторые AQP способны проводить одновалентные катионы (Burt et al., 2017). Аквапорины могут участвовать в передаче сигналов гормонов, таких как ауксин, гиббереллины, этилен и абсцизовая кислота (АБК) в растениях (Wang C. et al., 2016). Локализация и функции подсемейств аквапоринов указаны в таблице.

Известно, что высшие растения эволюционировали с особенно высокой степенью субклеточной компартментализации. В связи с чем, в отличие от животных, растительные аквапорины демонстрируют более широкий спектр субклеточных локализаций (на плазматической мембране, тонопласте, хлоропласте, эндоплазматическом ретикулуме, аппарате Гольджи и митохондриях), при этом AQP способны одновременно иметь локализацию в различных клетках и на разных мембранах. Представители одного и того же подсемейства могут иметь разные субклеточные локализации (Zhou X. et al., 2024).

Белки PIP в основном локализируются на плазматической мембране, как правило, в тканях, характеризующихся высоким транспортом воды, например в проводящих тканях (Yanef et al., 2014). У *A. sativa* транспортеры PIP обнаружены и на эндоплазматическом ретикулуме (Zhou X. et al., 2024). Транспортеры подгруппы PIP1 обычно имеют локализацию на плазматической мембране (Kaldenhoff, Fischer, 2006) и обладают низкой водопроводимостью (Kapilan et al., 2018). Часть белков PIP1 не способна действовать независимо, и они должны образовывать гетеротетрамеры с мономерами PIP2, чтобы иметь возможность увеличивать водопроводимость (Schuurmans et al., 2003). У растений табака (*Nicotiana tabacum*) снижение уровня экспрессии *NtAQP1*, члена семейства PIP1, вызывало снижение транспорта воды в корнях. У гороха (*Lathyrus oleraceus*) было продемонстрировано, что PIP1 играют важную роль при снабжении семян водой (Kaldenhoff, Fischer, 2006).

Некоторые исследователи отмечают дополнительную функцию подгруппы PIP1 в растительных клетках, заключающуюся в способности транспортировать CO₂ (Kapilan et al., 2018). Повышенная экспрессия *OsPIP2;7* в рисе улучшает выживаемость риса в условиях низкотемпературного стресса и влияет на уровни экспрессии других генов AQP в рисе (Zhou X. et al., 2024).

Клеточная локализация и функции аквапоринов растений*

Подсемейство	Локализация	Транспорт веществ
Plasma membrane intrinsic proteins (PIPs)	Плазматическая мембрана, внутренняя мембрана хлоропласта, мембрана тилакоидов, мембрана эндоплазматической сети (ЭПС)	Транспорт воды, перекиси водорода, глицерина, углекислого газа
Tonoplast intrinsic proteins (TIPs)	Тонoplast, плазматическая мембрана, внутренняя мембрана хлоропласта, мембрана тилакоидов, митохондрии	Транспорт воды, перекиси водорода, аммония, мочевины, глицерина
Nodulin26-like intrinsic proteins (NIPs)	Мембрана ЭПС, плазматическая мембрана	Проницаемы для большого числа субстратов, включая металлоиды, но слабо проницаемы для воды. Предполагается, что белки NIP участвуют в обмене метаболитами между растением-хозяином и симбионтом
Small basic intrinsic proteins (SIPs)	Мембрана ЭПС	Транспорт воды
Uncharacterized/ X intrinsic proteins (XIPs)	Плазматическая мембрана	Транспорт воды, перекиси водорода, металлоидов, мочевины, борной кислоты

* Согласно (Ishikawa et al., 2005; Kruse et al., 2006; Ma et al., 2006; Maurel et al., 2015; Pommerrenig et al., 2015; Lopez et al., 2016; Noronha et al., 2016; Wang C. et al., 2016; Byrt et al., 2017; Kapilan et al., 2018; Zhou X. et al., 2024).

Считается, что подгруппы PIP1 и PIP2, как правило, локализованы почти во всех частях растения, включая корни и листья (Maurel et al., 2015). Аквапорины подсемейства PIP2 более эффективны в качестве водных каналов, чем представители группы PIP1, и различные изоформы PIP2 считаются основными транспортерами воды через клеточную мембрану (Kaldenhoff, Fischer, 2006). Паттерны экспрессии гена *AQP* у *A. thaliana* существенно отличались при стрессе от засухи (например, экспрессия *AtPIP2;1* и *AtPIP2;2* снижалась при стрессе). Анализ экспрессии *OsPIP1* у риса в условиях засушливого стресса показал, что экспрессия этих двух генов была повышена, тогда как экспрессия всех генов *OsPIP2s* была снижена. Эти результаты указывают на то, что экспрессия *AQP* в растениях при засухе регулируется сложной сигнальной сетью, а механизм регуляции *AQP* в устойчивости растений к засухе требует дальнейшего изучения (Zhou X. et al., 2024).

Белки TIP локализованы на вакуолярных мембранах (Johnson et al., 1990). Пять подгрупп аквапоринов TIP (у арабидопсиса, кукурузы и риса) расположены в тонопластах, но некоторые изоформы TIP обнаружены и на плазматической мембране клеток. У овса семь представителей TIP локализованы в цитоплазме и пять – на вакуолях (Zhou X. et al., 2024). Из-за высокой концентрации аквапоринов на вакуолярных мембранах водопроницаемость тонопласта считается намного выше, чем у плазматической мембраны. Это способствует поддержанию тургорного давления внутри клетки (Luo et al., 2022). Известно, что TIP, помимо функции переноса воды, участвуют в транспорте мочевины, глицерина и аммиака, а также в реакции растения на абиотический стресс (Loque et al., 2005). Некоторые изоформы TIP показывают важную роль в реакции растения на засуху. В работе A. Lopez-Zaplana с коллегами отмечено присутствие TIP на мембранах митохондрий (Lopez-Zaplana et al., 2020). Считается, что изоформы *TIP1* и *TIP2* экспрессируются в тканях вегетативных органов растений, изоформы *TIP3* экспрессируются в семенах, а

изоформы *TIP5* связаны с пылевыми зёрнами (Hussain et al., 2020). TIP являются высокоспецифичным подсемейством и могут выполнять разнообразные функции у разных видов растений.

Интегральные нодулин-26-подобные белки, NIP, впервые были идентифицированы в перибактериоидной мембране клубеньков сои (*G. max*). Например, GmNOD26 стал первым описанным белком NIP (Fortin et al., 1987). Предполагается, что белки подсемейства NIP участвуют в обмене метаболитами между растением-хозяином и симбионтом (Kruse et al., 2006). Хотя продукт гена *GmNOD26* локализовался исключительно в перибактериоидной мембране азотфиксирующих симбиотических клубеньков бобовых, NOD26-подобные белки (NIP), образующие третье подсемейство, также могут встречаться у видов растений, не относящихся к бобовым, у которых они локализируются на плазматической мембране (Ma et al., 2006) или мембране ЭПС (Mizutani et al., 2006).

Таким образом, NIP широко распространены не только у бобовых растений (образующих бобово-ризобиальный симбиоз), что указывает на то, что они могут работать в отсутствие симбиотических отношений (Wayne, Tazawa, 1990). Например, в работе X. Zhou с коллегами показано, что у *A. sativa* L. ген подсемейства NIP – *6Ag0000836.1* – значительно повышал экспрессию при различных абиотических стрессах. Предполагается, что этот ген может быть геном-маркером при ответе на абиотический стресс (Zhou X. et al., 2024). И хотя в сравнении с другими аквапоринами NOD26 и другие NIP имеют более низкую водопроводимость, они обладают также транспортной функцией по отношению к глицерину (Kaldenhoff, Fischer, 2006). Это может свидетельствовать о том, что общий предок различных групп растительных аквапоринов не имел функции транспорта глицерина (Zhang et al., 2020).

Субклеточная локализация большинства транспортеров NIP пока не ясна. Известно, что NIP могут локализоваться на мембране эндоплазматического ретикулума (Lopez et

al., 2016). У *A. thaliana* член подсемейства NIP5;1 обнаружен в плазматической мембране, в то время как другой член подсемейства, NIP2;1, расположен на мембране эндоплазматического ретикулума (Zhou X. et al., 2024). Кроме того, NIP способны транспортировать аммиак, молочную кислоту, бор и кремний (Danielson, Johanson, 2008). Также NIP являются транспортерами металлоидов (Pommettenig et al., 2015), причем NIP не только облегчают диффузию металлоидов из почвы, но также играют ключевую роль в их транспорте внутри растения. Поэтому можно предположить, что семейство NIP способствует поглощению и транслокации металлоидов, тем самым регулируя их количество.

Группа малых белков SIP локализована на мембране эндоплазматического ретикулума (Ishikawa et al., 2005). Подсемейство SIP у растений структурно и функционально изучено недостаточно (Hussain et al., 2020). Строение SIP отличается от других подсемейств AQP благодаря тому, что их цитозольная N-концевая область сравнительно короче (Kapilan et al., 2018). В связи с их укороченным мотивом NPA SIP также могут транспортировать иные молекулы, а не только воду. На сегодняшний день нет единого мнения по поводу роли SIP в транспорте веществ у растений. Например, при исследовании *A. thaliana* из трех аквапоринов этого подсемейства только SIP1.1 и SIP1.2 показали незначительную водопроводимость, в то время как у SIP2.1 этой функции не было (Ishikawa et al., 2005). Белки SIP1 переносят воду через мембрану эндоплазматического ретикулума, тогда как белок SIP2 действует как канал эндоплазматического ретикулума для небольших молекул или ионов (Hussain et al., 2020). На сегодняшний день известно, что у *A. sativa* два гена SIP, *4Dg0000047.3* и *5Ag0000631.1*, показали экспрессию в тканях надземных органов растения (Zhou X. et al., 2024).

Представители подсемейства XIP встречаются у простейших, грибов и растений, но их функции пока недостаточно изучены (Kapilan et al., 2018). У растений табака продукты генов семейства XIP, *NtXIP1;1α* и *NtXIP1;1β*, локализованы на плазматической мембране. А *NtXIP1;1* показал экспрессию во всех растительных тканях. Известно, что это подсемейство отсутствует у таких растений, как арабидопсис, кукуруза и рис. Последовательности белков подсемейства XIP короче, чем у других MIP. Но при этом их структура остается высококонсервативной и схожа с другими подсемействами (Wang C. et al., 2016). У различных видов растений XIP демонстрирует контрастные транспортные функции. Например, у виноградной лозы *VvXIP1* играет роль в осмотической регуляции в дополнение к транспорту H₂O₂ и регулировании концентрации металлоидов (Nogonha et al., 2016). Гетерологичная экспрессия генов семейства XIP у пасленовых в ооцитах *Xenopus laevis* и различных штаммах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* показала, что эти изоформы способствуют переносу крупных молекул, таких как глицерин, мочевины и борная кислота. Но водопроводимость для них не показана. Эти данные свидетельствуют о том, что XIP в отдельных растительных тканях принимают участие в переносе незаряженных молекул через плазматическую мембрану клетки (Kapilan et al., 2018).

Аквапорины в растительно-микробных системах

Микробно-растительные взаимодействия являются основой жизни на планете. Взаимодействия могут быть: специфические, эволюционно закрепленные и неспецифические, временные, случайные. Известно, что высшие растения могут вступать в симбиотические отношения с микроорганизмами. Это отношения различных видов – мутуализм, комменсализм, аменсализм, паразитизм и нейтраллизм (Яценко-Степанова и др., 2014). Симбиотические отношения зависят от условий, в которых они существуют. То есть одна и та же комбинация хозяина и симбионта может быть взаимовыгодной в одном случае, но паразитической в другом (Chiu, Paszkowski, 2019). Например, для *A. thaliana* гриб *Colleotrichum toefieldiae* оказался полезным только в условиях недостатка фосфора, в других же случаях гриб становился паразитом (Hiruma et al., 2016).

Растения постоянно подвергаются атаке патогенов, включая вирусы, бактерии и грибы. Это приводит к различным заболеваниям сельскохозяйственно важных растений и, соответственно, к значительным продовольственным потерям (Savary et al., 2019). Все больше данных свидетельствует о том, что AQP играют роль в защите растения от патогенов, модулируя иммунитет растений и устойчивость к инвазиям (Li et al., 2020). Индуцированный бактериальным патогеном AtPIP1;4 транспортирует воду из апопласта в цитоплазму для активации системной приобретенной устойчивости и иммунных реакций у *A. thaliana* (Tian et al., 2016). Растения обладают способностью закрывать свои устьица, сохраняя влагу, после восприятия молекулярных паттернов, ассоциированных с патогеном, чтобы ограничить инвазию. Известно, что гормон стресса АБК участвует в регуляции смыкания устьиц. Было показано, что AtPIP1;2 облегчает транспорт воды через плазматическую мембрану, вызывая АБК- и патоген-индуцированное закрытие устьиц у *A. thaliana* (Exposito-Rodriguez et al., 2017).

На начальных этапах заражения грибные патогены регулируют свое развитие для проникновения специализированных инфекционных гиф в организм хозяина и получения питательных веществ. У *Fusarium graminearum* белок FgAQP1, локализованный на ядерной мембране в конидиях, имеет значение для роста гиф, развития и вторичного метаболизма. Делеция в *FgAQP1* влияет на экспрессию генов, что снижает эффективность заражения растений, это указывает на то, что *FgAQP1* может играть ключевую роль во взаимодействии *F. graminearum* с хозяином (Ding et al., 2018).

В то же время известны бактерии, стимулирующие рост растений как в благоприятных условиях, так и в условиях стресса (*Pseudomonas mandelii*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* и др.). В исследованиях Е. Martynenko с коллегами была показана связь между активностью AQP и образованием апопластических барьеров в растительно-микробной системе “*Pisum sativum*+*Pseudomonas mandelii*”. *Pseudomonas mandelii* повышает активность аквапоринов, что компенсирует возможное снижение водопроводимости в корнях гороха (Martynenko et al., 2023).

В сравнении с патогенами, АМГ в кортексе корня не нарушают целостность клеток растения-хозяина (Mosse et al., 1981; Spatafora et al., 2016). Обмен питательными веществами и транспорт воды между симбионтами происходит в арбускулах (Zhang et al., 2019). Кроме того, колонизация растений АМ-грибами способствует плавному закрытию устьиц растений при засухе. АМ-симбиоз улучшает устьичную проводимость и транспирацию в листьях для адаптации к засушливым условиям среды (Ni et al., 2024). Выступая в качестве «расширенных корней» растений, АМГ улучшают эффективность фотосинтеза, осморегуляцию и усиливают антиоксидантный метаболизм растений (Evelin et al., 2019). Гены *AQP* могут разнонаправленно экспрессироваться в ответ на микоризацию (Asadollahi et al., 2023). В условиях стресса для растения АМГ влияют на экспрессию *AQP* на транскрипционном, трансляционном и посттранскрипционном (фосфорилирование, мультимеризация, циклирование и интернализация *AQP*) уровнях, что способствует активной регуляции экспрессии *AQP* и обилия белка, тем самым улучшая эффективность транспорта H_2O , CO_2 , глицерина, NH_3 и пр. (Kakouridis et al., 2022).

В растительно-микробной системе (РМС) “*Triticum aestivum* + *Rhizophagus irregularis* (ранее известный как *Glomus intraradices* Schenck & Smith)” было показано, что колонизация растений АМ-грибами активирует гены, участвующие в пути биосинтеза фенилпропаноидов, и факторов транскрипции, которые играют жизненно важную роль в защите растений от биотических и абиотических стрессов (Mashini et al., 2022).

АМ-колонизация связана с модификациями мембранных транспортеров, особенно белков аквапоринов. Например, в РМС “*Triticum aestivum* + *Funneliformis mosseae*” были проанализированы гены, экспрессия которых изменяется при дефиците воды, а именно: из подсемейства *PIP* подгруппы *PIP1* – *TaPIP1-6* и *TaPIP1-8*; из *PIP2* – *TaPIP2-2C1*, *TaPIP2-2C3*, *TaPIP2-3C1*, *TaPIP2-7*, *TaPIP2-22*; из *NIP3* – только *TaNIP3-1*; из *TIP4* – *TaTIP2-5*, *TaTIP4-1*, *TaTIP4-2*, *TaTIP4-6*. Гены *AQP* с понижением экспрессии относились к подсемействам *PIP1*, *PIP2*, *TIP2*, *TIP4* и *NIP*. Продукты генов были локализованы на плазматической мембране или тонопласте. В отличие от других *AQP*, помимо функции переносчика воды, у *TaNIP3-1* также выявлена активность в трансмембранной передаче арсенита и солей борных кислот. В данной РМС “*T. aestivum* + *F. mosseae*” дефицит воды не влиял на экспрессию *SIP*. У пшеницы 25 генов аквапоринов из 96 известных при инокуляции АМ-грибом меняли свою экспрессию. При этом только четыре гена, *TaNIP1-10*, *TaNIP3-3*, *TaNIP3-4* и *TaTIP1-5*, показали повышенную экспрессию. Половина анализируемых *AQP* пшеницы с пониженной экспрессией генов была локализована на плазматической мембране, остальные – на тонопласте (*TIP1*, *TIP2*, *TIP4*, *PIP1*, *PIP2*, *NIP2*, *SIP2* и *NIP3*). Интересно, что экспрессия *TaPIP2-2C3*, *TaPIP2-2C1*, *TaTIP4-6*, *TaPIP1-6* и *TaPIP2-3C1* подавлялась в микоризованных растениях при дефиците воды, а экспрессия *TaNIP1-10*, *TaNIP3-3*, *TaNIP3-4*, *TaNIP1-5* и *TaPIP2-7* повышалась при тех же условиях (Asadollahi et al., 2023).

Известно, что у кукурузы АМ-симбиоз подавлял несколько аквапоринов, включая *ZmPIP1-1*, *ZmPIP1-3*, *ZmPIP1-4*, *ZmPIP1-6*, *ZmPIP2-2*, *ZmPIP2-4*, *ZmTIP1-1* и *ZmTIP2-3*, но усиливал экспрессию *TIP4-1*. В то же время у засухоустойчивого сорта кукурузы показаны другие результаты. Только три из изученных генов *AQP*, *ZmPIP1;6*, *ZmPIP2;2* и *ZmTIP4;1*, меняли экспрессию при симбиозе с АМГ. Результаты эксперимента с засухоустойчивым сортом кукурузы согласуются с гипотезой о том, что понижение экспрессии генов аквапоринов при недостатке воды может быть способом минимизации ее потери (Quiroga et al., 2017).

В РМС “*Daucus carota* + *Rhizophagus irregularis*” в условиях засухи была оценена экспрессия генов *GiAQP1*, *RiAQP1* и *RiAQP2*. Дифференциально экспрессировался только *RiAQP2* (Keller-Pearson et al., 2023).

При совместной колонизации кукурузы *R. irregularis* и *Exophiala pisciphila* (DSE, темный септированный эндофит) отмечены высокая водопроводимость через устьица в листьях растения и понижение экспрессии генов *ZmPIP1;1*, *ZmPIP1;2*, *ZmPIP2;1*, *ZmPIP2;5* и *ZmPIP2;6* относительно контрольных растений без заражения микроорганизмами и с их присутствием по отдельности. Показано, что экспрессия *GintAQP1* и *GintAQP2* у *R. irregularis* достоверно меняется в условиях стресса от засухи. В ходе эксперимента наблюдались конкурентные отношения при микоризации между АМГ и DSE. С другой стороны, для АМГ и DSE также известны и синергетические отношения при регуляции транспорта электролитов из мембран, окислительного стресса, фотосинтеза и экспрессии аквапоринов, например у проростков кукурузы (Gong et al., 2023).

В работе D. Wang с коллегами показано, что экспрессия гена *ZmTIP2;3* в РМС “*Zea mays* + *Rhizophagus irregularis* (ранее относимый к *Glomus intraradices*)” значительно повышалась в условиях засухи за счет симбиоза с АМГ. *ZmTIP2;3* представляет собой аквапорин с шестью трансмембранными доменами и двумя высококонсервативными мотивами NPA. Его промоторная область содержит много цис-действующих элементов, связанных с индукцией АМ-симбиоза. В опыте мутация в гене *ZMTIP2;3* приводила к снижению биомассы, скорости колонизации, фотосинтеза, содержания пролина и уровню экспрессии нескольких генов, связанных с засухой (*LEA3*, *P5CS4* и *NECD1*) по сравнению с диким типом после инокуляции АМ-грибом в условиях засухи. Это позволило предположить, что *ZmTIP2;3* повышает засухоустойчивость кукурузы за счет симбиоза с АМ-грибом (Wang D. et al., 2024).

Заключение

Открытие аквапоринов стало значительным событием в биологии и медицине. Важная функция аквапоринов – регулирование трансмембранного водного транспорта как между клетками, так и внутри клеток (Maloy, Hughes, 2013). Количество изоформ аквапоринов может сильно различаться в зависимости от вида организма и условий его существования. В зависимости от условий окружающей среды может варьироваться активность работы аквапоринов, изменяться их регуляторная функция в транспор-

те воды. Такие стратегические модели экспрессии генов аквапоринов и их функционального разнообразия являются инструментом для адаптации к меняющимся факторам окружающей среды, в том числе стрессовым (Jia, Liu, 2020). В симбиозе с АМГ регулируется значительное количество аквапоринов растения-хозяина. Регуляция их генов может, в частности, зависеть от силы стресса, вызванного засухой. Некоторые из этих аквапоринов, кроме транспорта воды, могут переносить и другие молекулы, имеющие физиологическое значение для жизни растений. Результаты исследований в самых разных условиях подтверждают, что микоризованные растения растут и развиваются лучше, чем растения без микоризы. При этом у микоризованных растений эффективнее сохраняется и осуществляется перенос воды между тканями, а также повышаются эффективность мобилизации соединения азота, накопления глицерина, синтез сигнальных молекул, накопление металлов, играющих роль в устойчивости к абиотическим стрессам.

Будущие исследования должны расширить знания о специфических функциях изоформ аквапоринов, регулируемых АМ-симбиозом, для понимания того, как этот симбиоз изменяет приспособленность растений к стрессовым условиям. Мониторинг транскрипционных реакций генов аквапоринов на различные факторы окружающей среды может повысить наши знания для разработки программ биотехнологического улучшения сельскохозяйственных культур.

Список литературы / References

- Яценко-Степанова Т.Н., Немцева Н.В., Игнатенко М.Е. Многообразие симбиозов и их роль в эволюции органического мира. *Вестник Оренбургского государственного университета*. 2014; 13(174):142-147
- [Yatsenko-Stepanova T.N., Nemtseva N.V., Ignatenko M.E. The diversity of symbioses and their part in the evolution of the organic world. *Vestnik Orenburgskogo Gosudarstvennogo Universiteta* = *Vestnik of the Orenburg State University*. 2014;13(174):142-147 (in Russian)]
- Abascal F., Irisarri I., Zardoya R. Diversity and evolution of membrane intrinsic proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(5):1468-1481. doi 10.1016/j.bbagen.2013.12.001
- Agre P., Preston G.M., Smith B.L., Jung J.S., Raina S., Moon C., Guggino W.B., Nielsen S. Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *Am J Physiol*. 1993;265(4):F463-F476. doi 10.1152/ajprenal.1993.265.4.F463
- Afzal Z., Howton T., Sun Y., Mukhtar M. The roles of aquaporins in plant stress responses. *J Dev Biol*. 2016;4(1):9. doi 10.3390/jdb 4010009
- Ahanger M.A., Agarwal R.M. Salinity stress induced alterations in antioxidant metabolism and nitrogen assimilation in wheat (*Triticum aestivum* L.) as influenced by potassium supplementation. *Plant Physiol Biochem*. 2017;115:449-460. doi 10.1016/j.plaphy.2017.04.017
- Aroca R., Bago A., Sutka M., Paz J.A., Cano C., Amodeo G., Ruiz-Lozano J.M. Expression analysis of the first arbuscular mycorrhizal fungi aquaporin described reveals concerted gene expression between salt-stressed and nonstressed mycelium. *Mol Plant Microbe Interact*. 2009;22(9):1169-1178. doi 10.1094/MPMI-22-9-1169
- Asadollahi M., Iranbakhsh A., Ahmadvand R., Ebadi M., Mehregan I. Synergetic effect of water deficit and arbuscular mycorrhizal symbiosis on the expression of aquaporins in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots: insights from NGS RNA-sequencing. *Physiol Mol Biol Plants*. 2023;29(2):195-208. doi 10.1007/s12298-023-01285-w
- Byrt C.S., Zhao M., Kourghi M., Bose J., Henderson S.W., Qiu J., Gilliam M., Schultz C., Schwarz M., Ramesh S.A., Yool A., Tyerman S. Non-selective cation channel activity of aquaporin AtPIP2;1 regulated by Ca²⁺ and pH. *Plant Cell Environ*. 2017;40(6):802-815. doi 10.1111/pce.12832
- Chaumont F., Tyerman S.D. Aquaporins: highly regulated channels controlling plant water relations. *Plant Physiol*. 2014;164(4):1600-1618. doi 10.1104/pp.113.233791
- Chiu C.H., Paszkowski U. Mechanisms and impact of symbiotic phosphate acquisition. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2019;11(6):a034603. doi 10.1101/cshperspect.a034603
- Chrispeels M.J., Agre P. Aquaporins: water channel proteins of plant and animal cells. *Trends Biochem Sci*. 1994;19(10):421-425. doi 10.1016/0968-0004(94)90091-4
- Danielson J.Å., Johanson U. Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol*. 2008;8(1):45. doi 10.1186/1471-2229-8-45
- Ding M., Li J., Fan X., He F., Yu X., Chen L., Zou S., Liang Y., Yu J. Aquaporin1 regulates development, secondary metabolism and stress responses in *Fusarium graminearum*. *Curr Genet*. 2018; 64(5):1057-1069. doi 10.1007/s00294-018-0818-8
- Evelin H., Devi T.S., Gupta S., Kapoor R. Mitigation of salinity stress in plants by arbuscular mycorrhizal symbiosis: current understanding and new challenges. *Front Plant Sci*. 2019;10:470. doi 10.3389/fpls.2019.00470
- Exposito-Rodriguez M., Laissie P.P., Yvon-Durocher G., Smirnov N., Mullineaux P.M. Photosynthesis-dependent H₂O₂ transfer from chloroplasts to nuclei provides a high-light signalling mechanism. *Nat Commun*. 2017;29;8(1):49. doi 10.1038/s41467-017-00074-w
- Fortin M.G., Morrison N.A., Verma D.P.S. Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. *Nucleic Acids Res*. 1987;15(2): 813-824. doi 10.1093/nar/15.2.813
- Gong M., Bai N., Wang P., Su J., Chang Q., Zhang Q. Co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes under drought stress: synergistic or competitive effects on maize growth, photosynthesis, root hydraulic properties and aquaporins? *Plants*. 2023;12(14):2596. doi 10.3390/plants12142596
- Gupta A., Sankaramakrishnan R. Genome-wide analysis of major intrinsic proteins in the tree plant *Populus trichocarpa*: characterization of XIP subfamily of aquaporins from evolutionary perspective. *BMC Plant Biol*. 2009;9(1):134. doi 10.1186/1471-2229-9-134
- Hiruma K., Gerlach N., Sacristán S., Nakano R.T., Hacquard S., Kracher B., Neumann U., Ramirez D., Bucher M., O'Connell R.J., Schulze-Lefert P. Root endophyte *Colletotrichum tofieldiae* confers plant fitness benefits that are phosphate status dependent. *Cell*. 2016;165(2):464-474. doi 10.1016/j.cell.2016.02.028
- Huey C.J., Gopinath S.C.B., Uda M.N.A., Zulhaimi H.I., Jaafar M.N., Kasim F.H., Yaakub A.R.W. Mycorrhiza: a natural resource assists plant growth under varied soil conditions. *3 Biotech*. 2020;10(5): 204. doi 10.1007/s13205-020-02188-3
- Hussain A., Tanveer R., Mustafa G., Farooq M., Amin I., Mansoor S. Comparative phylogenetic analysis of aquaporins provides insight into the gene family expansion and evolution in plants and their role in drought tolerant and susceptible chickpea cultivars. *Genomics*. 2020;112(1):263-275. doi 10.1016/j.ygeno.2019.02.005
- Irisarri I., Lorente-Martínez H., Strasser J.F.H., Agorreta A., Zardoya R., San Mauro D., De Vries J. Early diversification of membrane intrinsic proteins (MIPs) in eukaryotes. *Genome Biol Evol*. 2024;16(8):evae164. doi 10.1093/gbe/evae164
- Ishikawa F., Suga S., Uemura T., Sato M.H., Maeshima M. Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*. 2005;579(25):5814-5820. doi 10.1016/j.febslet.2005.09.076
- Jia Y., Liu X. Polyploidization and pseudogenization in allotetraploid frog *Xenopus laevis* promote the evolution of aquaporin family in higher vertebrates. *BMC Genomics*. 2020;21(1):525. doi 10.1186/s12864-020-06942-y

- Johnson K.D., Höfte H., Chrispeels M.J. An intrinsic tonoplast protein of protein storage vacuoles in seeds is structurally related to a bacterial solute transporter (GIpF). *Plant Cell*. 1990;2(6):525-532. doi 10.1105/tpc.2.6.525
- Kakouridis A., Hagen J.A., Kan M.P., Mambelli S., Feldman L.J., Herman D.J., Weber P.K., Pett-Ridge J., Firestone M.K. Routes to roots: direct evidence of water transport by arbuscular mycorrhizal fungi to host plants. *New Phytol*. 2022;236(1):210-221. doi 10.1111/nph.18281
- Kaldenhoff R., Fischer M. Functional aquaporin diversity in plants. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758(8):1134-1141. doi 10.1016/j.bbame.2006.03.012
- Kaplan R., Vaziri M., Zwiazek J.J. Regulation of aquaporins in plants under stress. *Biol Res*. 2018;51(1):4. doi 10.1186/s40659-018-0152-0
- Keller-Pearson M., Bortolazzo A., Willems L., Smith B., Peterson A., Ané J.-M., Silva E.M. A dual transcriptomic approach reveals contrasting patterns of differential gene expression during drought in arbuscular mycorrhizal fungus and carrot. *Mol Plant Microbe Interact*. 2023;36(12):821-832. doi 10.1094/MPMI-04-23-0038-R
- Knepper M.A., Nielsen S. Peter Agre, 2003 Nobel Prize winner in chemistry. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(4):1093-1095. doi 10.1097/01.ASN.0000118814.47663.7D
- Krajinski F., Biela A., Schubert D., Gianinazzi-Pearson V., Kaldenhoff R., Franken P. Arbuscular mycorrhiza development regulates the mRNA abundance of *Mtaqpl* encoding a mercury-insensitive aquaporin of *Medicago truncatula*. *Planta*. 2000;211(1):85-90. doi 10.1007/s004250000263
- Kruse E., Uehlein N., Kaldenhoff R. The aquaporins. *Genome Biol*. 2006;7(2):206. doi 10.1186/gb-2006-7-2-206
- Kuila D., Ghosh S. Aspects, problems and utilization of Arbuscular Mycorrhizal (AM) application as bio-fertilizer in sustainable agriculture. *Curr Res Microb Sci*. 2022;3:100107. doi 10.1016/j.crmicr.2022.100107
- Lagrée V., Froger A., Deschamps S., Hubert J.-F., Delamarque C., Bonnee G., Thomas D., Gouranton J., Pellerin I. Switch from an aquaporin to a glycerol channel by two amino acids substitution. *J Biol Chem*. 1999;274(11):6817-6819. doi 10.1074/jbc.274.11.6817
- Li G., Chen T., Zhang Z., Li B., Tian S. Roles of aquaporins in plant-pathogen interaction. *Plants*. 2020;9(9):1134. doi 10.3390/plants9091134
- Lopez D., Amira M.B., Brown D., Muries B., Brunel-Michac N., Bourgerie S., Porcheron B., Lemoine R., Chrestin H., Mollison E., Di Cola A., Frigerio L., Julien J.-L., Gousset-Dupont A., Fumana B., Label P., Pujade-Renaud V., Auguin D., Venisse J.-S. The *Hevea brasiliensis* XIP aquaporin subfamily: genomic, structural and functional characterizations with relevance to intensive latex harvesting. *Plant Mol Biol*. 2016;91(4-5):375-396. doi 10.1007/s11103-016-0462-y
- Lopez-Zaplana A., Nicolas-Espinosa J., Carvajal M., Bárzana G. Genome-wide analysis of the aquaporin genes in melon (*Cucumis melo* L.). *Sci Rep*. 2020;10(1):22240. doi 10.1038/s41598-020-79250-w
- Loque D., Ludewig U., Yuan L., von Wirén N. Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH₃ transport into the vacuole. *Plant Physiol*. 2005;137(2):671-680. doi 10.1104/pp.104.051268
- Lu L., Dong C., Liu R., Zhou B., Wang C., Shou H. Roles of soybean plasma membrane intrinsic protein GmPIP2;9 in drought tolerance and seed development. *Front Plant Sci*. 2018;9:530. doi 10.3389/fpls.2018.00530
- Luo Y., Ma L., Du W., Yan S., Wang Z., Pang Y. Identification and characterization of salt- and drought-responsive *AQP* family genes in *Medicago sativa* L. *Int J Mol Sci*. 2022;23(6):3342. doi 10.3390/ijms23063342
- Ma J.F., Tamai K., Yamaji N., Mitani N., Konishi S., Katsuhara M., Ishiguro M., Murata Y., Yano M. A silicon transporter in rice. *Nature*. 2006;440(7084):688-691. doi 10.1038/nature04590
- Maloy S., Hughes K. (Eds) Brenner's Encyclopedia of Genetics. London: Elsevier, 2013
- Martynenko E., Arkhipova T., Akhiyarova G., Sharipova G., Galin I., Seldimirova O., Ivanov R., Nuzhnaya T., Finkina E., Ovchinnikova T., Kudoyarova G. Effects of a *Pseudomonas* strain on the lipid transfer proteins, appoplast barriers and activity of aquaporins associated with hydraulic conductance of pea plants. *Membranes*. 2023;13(2):208. doi 10.3390/membranes13020208
- Mashini A.G., Oakley C.A., Grossman A.R., Weis V.M., Davy S.K. Immunolocalization of metabolite transporter proteins in a model cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Appl Environ Microbiol*. 2022;88(12):e00412-22. doi 10.1128/aem.00412-22
- Maurel C., Reizer J., Schroeder J.I., Chrispeels M.J. The vacuolar membrane protein gamma-TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *EMBO J*. 1993;12(6):2241-2247. doi 10.1002/j.1460-2075.1993.tb05877.x
- Maurel C., Boursiac Y., Luu D.-T., Santoni V., Shahzad Z., Verdoucq L. Aquaporins in plants. *Physiol Rev*. 2015;95(4):1321-1358. doi 10.1152/physrev.00008.2015
- Min X., Wu H., Zhang Z., Wei X., Jin X., Ndayambaza B., Wang Y., Liu W. Genome-wide identification and characterization of the aquaporin gene family in *Medicago truncatula*. *J Plant Biochem Biotechnol*. 2019;28(3):320-335. doi 10.1007/s13562-018-0484-4
- Mizutani M., Watanabe S., Nakagawa T., Maeshima M. Aquaporin NIP2;1 is mainly localized to the ER membrane and shows root-specific accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 2006;47(10):1420-1426. doi 10.1093/pcp/pc1004
- Mosse B., Stribley D.P., LeTacon F. Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi. In: Alexander M. (Ed.) Advances in Microbial Ecology, vol. 5. Boston, MA: Springer US, 1981;5137-5210. doi 10.1007/978-1-4615-8306-6_4
- Ni Y., Bao H., Zou R., Wang Y., Xie K., Cheng B., Li X. Aquaporin ZmPIP2;4 promotes tolerance to drought during arbuscular mycorrhizal fungi symbiosis. *Plant Soil*. 2024. doi 10.1007/s11104-024-06778-5
- Nielsen S., Frøkiær J., Marples D., Kwon T.-H., Agre P., Knepper M.A. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev*. 2002;82(1):205-244. doi 10.1152/physrev.00024.2001
- Noronha H., Araújo D., Conde C., Martins A.P., Soveral G., Chaumont F., Delrot S., Gerós H. The grapevine uncharacterized intrinsic protein 1 (VvXIP1) is regulated by drought stress and transports glycerol, hydrogen peroxide, heavy metals but not water. *PLoS One*. 2016;11(8):e0160976. doi 10.1371/journal.pone.0160976
- Park W., Scheffler B.E., Bauer P.J., Campbell B.T. Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *BMC Plant Biol*. 2010;10(1):142. doi 10.1186/1471-2229-10-142
- Pommerrenig B., Diehn T.A., Bienert G.P. Metalloido-porins: essentiality of Nodulin 26-like intrinsic proteins in metalloid transport. *Plant Sci*. 2015;238:212-227. doi 10.1016/j.plantsci.2015.06.002
- Preston G.M., Carroll T.P., Guggino W.B., Agre P. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*. 1992;256(5055):385-387. doi 10.1126/science.256.5055.385
- Quiroga G., Erice G., Aroca R., Chaumont F., Ruiz-Lozano J.M. Enhanced drought stress tolerance by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in a drought-sensitive maize cultivar is related to a broader and differential regulation of host plant aquaporins than in a drought-tolerant cultivar. *Front Plant Sci*. 2017;8:1056. doi 10.3389/fpls.2017.01056
- Savary S., Willocquet L., Pethybridge S.J., Esker P., McRoberts N., Nelson A. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nat Ecol Evol*. 2019;3(3):430-439. doi 10.1038/s41559-018-0793-y
- Schachtman D.P., Reid R.J., Ayling S.M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol*. 1998;116(2):447-453. doi 10.1104/pp.116.2.447

- Schuurmans J.A.M.J., Van Dongen J.T., Rutjens B.P.W., Boonman A., Pieterse C.M.J., Borstlap A.C. Members of the aquaporin family in the developing pea seed coat include representatives of the PIP, TIP, and NIP subfamilies. *Plant Mol Biol.* 2003;53(5):655-667. doi 10.1023/B:PLAN.0000019070.60954.77
- Seka A.M., Zhang J., Prodhan F.A., Ayele G.T., Finsa M.M., Sharma T.P.P., Melesse A.M. Hydrological drought impacts on water storage variations: a focus on the role of vegetation changes in the East Africa region. A systematic review. *Environ Sci Pollut Res.* 2022;29(53):80237-80256. doi 10.1007/s11356-022-23313-0
- Singh R.K., Deshmukh R., Muthamilarasan M., Rani R., Prasad M. Versatile roles of aquaporin in physiological processes and stress tolerance in plants. *Plant Physiol Biochem.* 2020;149:178-189. doi 10.1016/j.plaphy.2020.02.009
- Spatafora J.W., Chang Y., Benny G.L., Lazarus K., Smith M.E., Berbee M.L., Bonito G., Corradi N., Grigoriev I., Gryganskyi A., James T.Y., O'Donnell K., Roberson R.W., Taylor T.N., Uehling J., Vilgalys R., White M.M., Stajich J.E. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia.* 2016;108(5):1028-1046. doi 10.3852/16-042
- Tian S., Wang X., Li P., Wang H., Ji H., Xie J., Qiu Q., Shen D., Dong H. Plant aquaporin AtPIP1;4 links apoplastic H₂O₂ induction to disease immunity pathways. *Plant Physiol.* 2016;171(3):1635-1650. doi 10.1104/pp.15.01237
- Wang C., Hu H., Qin X., Zeise B., Xu D., Rappel W.-J., Boron W.F., Schroeder J.I. Reconstitution of CO₂ regulation of SLAC1 anion channel and function of CO₂ – permeable PIP2;1 aquaporin as CARBONIC ANHYDRASE4 interactor. *Plant Cell.* 2016;28(2):568-582. doi 10.1105/tpc.15.00637
- Wang D., Ni Y., Xie K., Li Y., Wu W., Shan H., Cheng B., Li X. Aquaporin ZmTIP2;3 promotes drought resistance of maize through symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi. *Int J Mol Sci.* 2024;25(8):4205. doi 10.3390/ijms25084205
- Wang Y., Zhao Z., Liu F., Sun L., Hao F. Versatile roles of aquaporins in plant growth and development. *Int J Mol Sci.* 2020;21(24):9485. doi 10.3390/ijms21249485
- Wayne R., Tazawa M. Nature of the water channels in the internodal cells of *Nitellopsis*. *J Membrin Biol.* 1990;116(1):31-39. doi 10.1007/BF01871669
- Yanef A., Sigaut L., Marquez M., Alleva K., Pietrasanta L.I., Amodeo G. Heteromerization of PIP aquaporins affects their intrinsic permeability. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111(1):231-236. doi 10.1073/pnas.1316537111
- Zhang X., Han C., Gao H., Cao Y. Comparative transcriptome analysis of the garden asparagus (*Asparagus officinalis* L.) reveals the molecular mechanism for growth with arbuscular mycorrhizal fungi under salinity stress. *Plant Physiol Biochem.* 2019;141:20-29. doi 10.1016/j.plaphy.2019.05.013
- Zhang X., Zhuang L., Liu Y., Yang Z., Huang B. Protein phosphorylation associated with drought priming-enhanced heat tolerance in a temperate grass species. *Hortic Res.* 2020;7(1):207. doi 10.1038/s41438-020-00440-8
- Zhou X., Yi D., Ma L., Wang X. Genome-wide analysis and expression of the aquaporin gene family in *Avena sativa* L. *Front Plant Sci.* 2024;14:1305299. doi 10.3389/fpls.2023.1305299
- Zhou Y., MacKinnon R. The occupancy of ions in the K⁺ selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *J Mol Biol.* 2003;333(5):965-975. doi 10.1016/j.jmb.2003.09.022

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.10.2024. После доработки 09.12.2024. Принята к публикации 10.12.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-28

Transcriptomic analysis of the symbiotic responsivity trait in pea (*Pisum sativum* L.)

D.O. Kuzmina , E.A. Zorin , A.S. Sulima , D.A. Romanyuk , M.L. Gordon , A.I. Zhernakov ,
O.A. Kulaeva , G.A. Akhtemova, O.Y. Shtark , I.A. Tikhonovich , V.A. Zhukov  

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin 8, St. Petersburg, Russia

 vzhukov@arriam.ru

Abstract. Pea (*Pisum sativum* L.) is an important crop culture and a model object for studying the molecular genetic bases of nitrogen-fixing symbiosis and arbuscular mycorrhiza (AM). Pea genotypes with high and low responsivity to inoculation with nodule bacteria (rhizobia) and AM fungi have been described: the 'responsive' genotypes demonstrate an increase in seed weight under inoculation, while 'non-responsive' ones do not show such a reaction. In order to get insight into the molecular genetic mechanisms underlying the symbiotic responsivity, a transcriptomic analysis of whole root systems of pea plants of the 'responsive' genotype k-8274 (cv. Vendevil, France) and 'non-responsive' genotype k-3358 (unnamed cultivar, Saratov region, Russia) grown in soil without inoculation (control) and inoculated either with rhizobia (single inoculation) or with rhizobia together with AM fungi (double inoculation) was performed. It was shown that the 'responsive' genotype, indeed, demonstrated a pronounced transcriptomic response to single and double inoculation, in contrast to the 'non-responsive' genotype. In k-8274, single inoculation led to specific up-regulation of genes related to catabolism of polyamines, lipid metabolism, and jasmonic acid and salicylic acid signaling. Under double inoculation, the specifically up-regulated genes in k-8274 were related to arbuscular mycorrhiza infection, and the down-regulated genes were related to nodulation. This fact matches the phenotype of the plants: the number of nodules was lower in k-8274 under double inoculation as compared to the control. Thus, strict control over the nodule number may be one of the mechanisms underlying the symbiotic responsivity of pea. Finally, a comparison of expression profiles in k-8274 and k-3358 roots under double inoculation also allowed us to identify the transcriptomic signatures characteristic of the symbiotically responsive genotype. Further work will be focused on validation of these transcriptomic markers of the symbiotic responsivity trait in pea.

Key words: pea; legume-rhizobial symbiosis; arbuscular mycorrhiza; symbiotic responsivity; transcriptomics

For citation: Kuzmina D.O., Zorin E.A., Sulima A.S., Romanyuk D.A., Gordon M.L., Zhernakov A.I., Kulaeva O.A., Akhtemova G.A., Shtark O.Y., Tikhonovich I.A., Zhukov V.A. Transcriptomic analysis of the symbiotic responsivity trait in pea (*Pisum sativum* L.). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(2):248-258. doi 10.18699/vjgb-25-28

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation (grant # 22-16-00109, <https://rscf.ru/project/22-16-00109/>).

Транскриптомный анализ признака симбиотической отзывчивости у гороха посевного (*Pisum sativum* L.)

Д.О. Кузьмина , Е.А. Зорин , А.С. Сулима , Д.А. Романюк , М.Л. Гордон , А.И. Жернаков ,
О.А. Кулаева , Г.А. Ахтемова, О.Ю. Штарк , И.А. Тихонович , В.А. Жуков  

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Пушкин-8, Санкт-Петербург, Россия

 vzhukov@arriam.ru

Аннотация. Горох посевной (*Pisum sativum* L.) является важной сельскохозяйственной культурой и модельным объектом для изучения молекулярно-генетических основ азотфиксирующего симбиоза и арбускулярной микоризы (АМ). Описаны генотипы гороха с высокой и низкой отзывчивостью на инокуляцию клубеньковыми бактериями (ризобиями) и АМ грибами: «отзывчивые» генотипы демонстрируют прибавку массы семян при инокуляции, а для «неотзывчивых» генотипов такая реакция не характерна. С целью описания молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе симбиотической отзывчивости, был проведен транскриптомный анализ целых корневых систем растений гороха «отзывчивого» генотипа к-8274 (сорт Vendevil, Франция) и «неотзывчивого» генотипа к-3358 (сорт из Саратовской области, Россия), выращенных в почве без инокуляции (контроль) и при инокуляции ризобиями (одиночная инокуляция) и ризобиями совместно с АМ грибами (двойная инокуляция). «Отзывчивый» генотип действительно продемонстрировал выраженный ответ на уровне транскриптома на одиночную и двойную инокуляцию, в отличие от «неотзывчивого» генотипа. Одиночная инокуляция привела у к-8274 к специфическому повы-

шению экспрессии генов, связанных с катаболизмом полиаминов, метаболизмом липидов и сигналингом на основе жасмоновой и салициловой кислот. При двойной инокуляции у к-8274 была повышена экспрессия генов, связанных с арбускулярно-микорризной инфекцией, и понижена экспрессия генов, связанных с клубенькообразованием. Данный факт соответствует фенотипу растений: число клубеньков у к-8274 было снижено при двойной инокуляции по сравнению с контролем. Таким образом, одним из механизмов, лежащих в основе симбиотической отзывчивости у гороха, может быть строгий контроль над числом клубеньков. Наконец, сравнение экспрессионных профилей корней растений к-8274 и к-3358 в условиях двойной инокуляции позволило идентифицировать «транскриптомные сигнатуры», характерные для симбиотически отзывчивого генотипа к-8274. Дальнейшая работа будет направлена на подтверждение возможности использования выявленных генов в качестве транскриптомных маркеров признака симбиотической отзывчивости у гороха посевного.

Ключевые слова: горох; бобово-ризобийный симбиоз; арбускулярная микорриза; симбиотическая отзывчивость; транскриптомика

Introduction

Legume plants (family Fabaceae) are an important component of modern agricultural practices due to their ability to fix atmospheric nitrogen in symbiosis with nodule bacteria (rhizobia) (Rubiales, Mikic, 2015). The symbiotic nitrogen fixation provides plants with combined nitrogen, and this feature allows legumes to grow on lower doses of mineral fertilizers, which is economically advantageous and beneficial for the environment (Goyal et al., 2021). The N₂ fixation occurs in specific organs called root nodules, which are formed on the roots of legume plants, where rhizobia are hosted within the plant cells (Yang et al., 2022). In addition to nitrogen fixation, legumes, like most terrestrial plants, form arbuscular mycorrhiza (AM), which helps plants cope with water deficiency and lack of mineral phosphorus (Smith, Read, 2008). This tendency to form mutualistic symbioses with beneficial microorganisms makes legumes profitable crops for use according to the concept of sustainable agriculture.

It is generally accepted that the root nodule (RN) symbiosis of legumes has evolved on the base of pre-existing AM (Parniske, 2008; Oldroyd, 2013). This idea is supported by the fact that some components of signaling systems are shared between the two symbioses. The first example of such shared signaling system is the so-called CSSP (common symbiosis signaling pathway), the signal transduction pathway that is activated during the early steps of the development of both AM and RN symbioses (Harrison, 2012; Wang D. et al., 2022). The second one is the autoregulation system, which exercises systemic control over the nodule number and the rate of mycorrhizal colonization of roots (autoregulation of nodulation (AON)/autoregulation of mycorrhization (AOM)), depending on the amount of available nitrogen and phosphorus in the growth substrate, respectively (Reid et al., 2011; Ferguson et al., 2019; Müller, Harrison, 2019). Interestingly, nodulation systemically influences mycorrhization, and *vice versa*, as was shown in split-root experiments in alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Catford et al., 2003).

Pea (*Pisum sativum* L.) is a profitable legume crop that has also served as a model to study the genetic system controlling the development of RN symbiosis and AM, similar to model legumes *Medicago truncatula* Gaertn., *Lotus japonicus* (Regel.) K. Larsen and *Glycine max* (L.) Merr. (Roy et al., 2020; Tsyganov, Tsyganova, 2020). Different genotypes have been described in pea with high and low responsiveness to inoculation with rhizobia and AM fungi: the ‘responsive’ genotypes increase their seed productivity under inoculation, and the ‘non-responsive’ ones do not demonstrate such a reaction to

inoculation (Shtark et al., 2006). This symbiotic responsiveness trait was also called EIBSM, standing for Effectiveness of Interaction with Beneficial Soil Microorganisms, and was proposed for breeding of pea and other legumes (Shtark et al., 2012, 2015).

Recent development of pea genomics makes it possible to use post-genomic technologies such as transcriptomics and proteomics for studying agriculturally important traits (Parihar et al., 2022; Rubiales et al., 2023). Most such works, however, are devoted to studying resistance to pathogens rather than responsiveness to symbionts (Castillejo et al., 2015; Cerna et al., 2017; Liu et al., 2023; Kálin et al., 2024), so the molecular mechanisms underlying the symbiotic responsiveness in pea remain largely unexplored (Zhukov et al., 2021a). Therefore, the aim of this work was to reveal the molecular genetic bases of this trait by describing the transcriptomic changes in roots of two contrasting pea genotypes, the ‘responsive’ k-8274 and the ‘non-responsive’ k-3358, after inoculation with rhizobia (Rh) and rhizobia plus AM fungi (Rh+AM), as compared to a non-treated control.

Materials and methods

Vegetation experiments. The plant material (whole root systems) for RNA extraction was taken from the previously conducted vegetation experiment described in detail in (Zhukov et al., 2017). Briefly, the plants of the genotypes k-8274 and k-3358 (VIR collection of pea, St. Petersburg, Russia) were grown in non-sterile sod-podzolic light loamy soil (Leningrad Oblast, area of the Belogorka Science and Production Association, C_{humus} 1.27 % and N_{total} 0.11 %, pH_{sat} 4.92), three plants per 5-liter pot, in a greenhouse during the summer period at ARRIAM, St. Petersburg, Russia in the following variants: non-inoculated plants (control), plants inoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain RCAM1026 (Rh), plants inoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain RCAM1026 together with a mixture of arbuscular mycorrhizal fungi *Rhizophagus irregularis* BEG144, *R. irregularis* BEG53 and *Glomus* sp. ST3 (Rh+AM). After 4 weeks of growth, the plants were harvested; root systems were washed with water, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until further processing. For a biological replicate, three plants from one pot were collected. In total, there were three biological replicates per treatment per plant genotype.

In the experiment on phenotypic characterization of k-8274 and k-3358, plants were grown in 2-liter pots with sterile sand, 4 plants per pot, without inoculation (control) and under inoculation with either *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

RCAM1026 (Rh) or *Rhizophagus irregularis* BEG144 (AM), or their combination (Rh+AM), in four replicates (pots) per treatment. The seeds were pre-sterilized with concentrated sulphuric acid, rinsed 5 times with autoclaved distilled water, and germinated in Petri dishes on filter paper at 28 °C in the dark. Inoculation with rhizobia was performed by pouring 3 ml of water suspension (10^6 CFU \times l $^{-1}$) of *Rh. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM1026 under each seedling; inoculation with AM fungi was performed by adding 60 g of dry roots of *Sorghum* sp. colonized by AM fungi (the details of the AM inoculation method are described in Shtark et al., 2019). At planting, the seedlings were supplied with mineral nutrition solution with a low content of phosphorus and nitrogen (Sulima et al., 2019), 150 ml per pot.

The plants were grown in a VB 1014 (Vötsch Industrietechnik, Germany) growth chamber under the following conditions: day/night 16/8 h, temperature 21 ± 1 °C, relative humidity 75 %, light irradiation 600 μ mol of photons \times m $^{-2}$ \times s $^{-1}$. The plants were watered by 200 ml of distilled water twice a week. At 4 weeks after planting/inoculation, the plants were harvested, and the root systems were washed with water. The number of nodules was counted during visual examination of the root systems; the shoots were air-dried and weighted.

Statistical analysis was carried out in the R environment using the core package 'stats' (version 4.3.0). A two-way ANOVA was used to assess the effects of inoculations and their action on shoot dry weight, and a one-way ANOVA was used to evaluate the impact of mycorrhiza on nodulation.

RNA extraction, library preparation and sequencing. The frozen whole root systems were grinded in liquid nitrogen using mortars and pistils; the resulting powder was used for total RNA extraction using Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific, USA). The quality of RNA was assessed using a 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent Technologies, USA). RNA of sufficient quality (RNA integrity number (RIN) > 8) was obtained from only two replicates of the samples from the control conditions, single inoculation and combined (double) inoculation, which allowed us to study the effect of single and combined inoculation on plants of the k-8274 and k-3358 genotypes.

The extracted RNA was used for RNAseq library preparation using the MACE v1.0 kit (GenXPro GmbH, Frankfurt am Main, Germany). The libraries were sequenced in GenXPro GmbH (Frankfurt am Main, Germany) on Illumina HiSeq2000. Raw sequencing data were uploaded to the NCBI database (BioProject number PRJNA1154300).

Bioinformatic analysis. The quality of raw reads was assessed using FastQC (version 0.11.9) (Andrews, 2010) and multiqc (Ewels et al., 2016). Trimmomatic (version 0.39) with default parameters was employed to remove adapter sequences and low-quality sequences (Bolger et al., 2014). Clean reads were aligned to the reference genome of cv. Frisson (NCBI: JANEYU000000000; Zorin et al., 2022) with STAR (version 2.7.10b) (Dobin et al., 2013) and sorted using SAMtools (version 1.17) (Danecek et al., 2021). Using multi-mapping, featureCounts (version 2.0.3) was used to count the number of reads that were aligned to genes or exons (Liao et al., 2014).

The BLAST+ command line tool (version 2.9.0) was used to annotate genes to which reads were mapped, with an E-value threshold of $1e^{-5}$ against *Medicago truncatula*

functional annotation (genomic assembly Medtra17_4.0) (Camacho et al., 2009). PCA plots were generated using the R packages DESeq2 and ggplot2 (Love et al., 2014; Wickham, 2016). R (version 4.1.3) was used to perform differential gene expression analysis with the DESeq2 package. Genes were considered differentially expressed if the Wald test was passed with the False Discovery Rate (FDR) value of no more than 0.05 and a log₂-fold change less than or more than 0.5. Additionally, a targeted analysis of differential gene expression was performed on gene lists (listed in the Supplementary Table S1)¹ that were acquired from earlier research projects. These gene lists included *Sym* genes and genes involved in the systemic process of autoregulation of nodulation.

GO enrichment analysis was carried out using the topGO packages (version 2.42.0) (Alexa, Rahnenführer, 2024), with the use of the weight01 method and Fisher's exact test. Genes, the expression of which was considerably elevated or decreased, were used independently to search for biological processes. Biological pathways with statistically significant up/down-regulation were counted at p -value < 0.05 and depicted using ggplot2. The p -value indicates the probability of this value occurring by chance, and suggests that the biological process under investigation is enriched in the transcriptomic data.

The heatmap is based on a matrix containing the values of 1–R (R is the Pearson correlation coefficient). The correlation is calculated based on the values of normalized expression (the number of normalized reads per million was obtained using DESeq2, VST (Variance Stabilizing Transformation)), which were additionally logarithmically transformed (log₂), and then transformed into a z-scale, which for each gene for each sample reflects the number of standard deviations from the average value for all samples for this gene. Further, the genes were clustered based on these values using the hierarchical clustering method. The obtained matrix was displayed as heat maps with pheatmap (version 1.0.12) (Kolde, 2015). The R packages VennDiagram (version 1.7.3) and EnhancedVolcano (version 1.18.0) were used to show the results of the differential gene expression study (Chen, Boutros, 2011).

Results

Transcriptomic response to single inoculation (Rh)

Inoculation with rhizobia changed the gene expression profiles in roots of both studied genotypes. The response to inoculation was more pronounced in k-8274: 440 unique genes were differentially expressed as compared to control; for k-3358, there were only 14 such genes. Additionally, 81 genes changed their expression similarly in both genotypes (Fig. 1A), and for all but one, the expression level increased. Enrichment analysis for the similarly up-regulated genes showed that these genes were related to the biological processes connected with nodulation and nitrogen fixation, such as biosynthesis of glutamate from proline, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate biosynthesis, polyamine transmembrane transport, etc. (Table 1). The genes additionally activated in k-8274 were related to such biological processes as catabolism of polyamines, lipid metabolism, and jasmonic acid and salicylic acid signaling (Table 1).

¹ Supplementary Tables S1, S2 and Fig. S1 are available at: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx9.pdf>

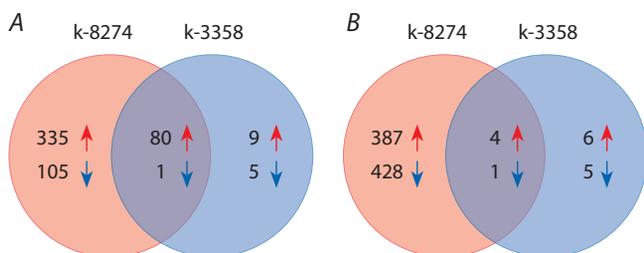


Fig. 1. The number of differentially expressed genes in roots of k-8274 and k-3358 under single (A) and double (B) inoculation as compared to uninoculated control.

Interestingly, the same genes in k-3358 were not classified as DEGs due to their low expression level both in control and under inoculation with rhizobia. Further, in k-8274, the down-regulated genes were related to ion transport, growth and response to fungi, which may indicate a decrease in the AM fungi spread in k-8274 roots. In k-3358, the down-regulated genes were related to the electron transport chain, as well to the response to abscisic acid and water deprivation.

Transcriptomic response to double inoculation (Rh+AM)

The transcriptomic response to double inoculation was different in the studied genotypes (Fig. 1B). Double inoculation of the responsive k-8274 genotype altered the expression of 815 unique genes in the roots, while only 11 unique genes in

the non-responsive genotype k-3358 changed their expression level, and 5 genes showed identical expression changes in both genotypes (Fig. 1B). The absolute expression level of the same 815 genes in k-3358 in all tested conditions was comparable to that of k-8274 in control conditions and did not change significantly due to inoculation (the effect similar to that observed under mono-inoculation with rhizobia), reflecting the low responsivity of k-3358 to double inoculation.

Enrichment analysis showed that several up-regulated DEGs in k-8274 under double inoculation (Rh+AM) were related to the same biological processes as in k-8274 under single inoculation (Rh), namely, jasmonic acid signaling, defense response and response to wounding (Table 2). The common down-regulated biological processes included pectin catabolism, inorganic anion transport, and regulation of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase activity. Further, many genes specifically up-regulated in k-8274 under double inoculation (Rh+AM) are associated with arbuscular mycorrhiza infection (GO biological processes: oxylipin biosynthetic process, defense response, response to chitin). In turn, the specific down-regulated genes in k-8274 are related to nodulation and assimilation of combined nitrogen (GO biological processes: nodulation, nitrate transmembrane transport) (Table 2). The observed down-regulation of the nodulation-related genes matches the result of phenotypic analysis of the plants (Zhukov et al., 2017): k-8274 plants formed significantly less nodules under double inoculation than in control conditions and under single inoculation with rhizobia.

Table 1. Up-regulated biological processes under single inoculation with rhizobia (Rh) in the studied genotypes

GO category	Biological process	p-value
Common up-regulated biological processes in k-8274+Rh and k-3358+Rh (as compared to control)		
GO:0098869	Cellular oxidant detoxification	0.012
GO:0010133	Proline catabolic process to glutamate	0.013
GO:0009873	Ethylene-activated signaling pathway	0.013
GO:0042218	1-Aminocyclopropane-1-carboxylate biosynthesis	0.017
GO:1902047	Polyamine transmembrane transport	0.017
GO:0055085	Transmembrane transport	0.032
GO:0006979	Response to oxidative stress	0.039
Specific up-regulated biological processes in k-8274+Rh (as compared to control)		
GO:0016311	Dephosphorylation	0.0012
GO:0006598	Polyamine catabolic process	0.0025
GO:0009269	Response to desiccation	0.0025
GO:0006629	Lipid metabolic process	0.0030
GO:0009805	Coumarin biosynthetic process	0.0043
GO:0006538	Glutamate catabolic process	0.0079
GO:0009694	Jasmonic acid metabolic process	0.0114
GO:0009696	Salicylic acid metabolic process	0.0116
GO:0052746	Inositol phosphorylation	0.0116

Table 2. Up- and down-regulated biological processes under double inoculation with rhizobia (Rh) and AM fungi (AM) in the studied genotypes

GO category	Biological process	p-value
Common up-regulated biological processes in k-8274+Rh+AM and k-8274+Rh (as compared to control)		
GO:0009611	Response to wounding	1.6e-07
GO:2000022	Regulation of jasmonic acid mediated signaling pathway	2.0e-07
GO:0031347	Regulation of defense response	6.7e-05
GO:0009695	Jasmonic acid biosynthetic process	0.00012
GO:0005992	Trehalose biosynthetic process	0.00064
GO:0052746	Inositol phosphorylation	0.00084
GO:0043086	Negative regulation of catalytic activity	0.00172
GO:0016311	Dephosphorylation	0.00240
GO:0030026	Cellular manganese ion homeostasis	0.00325
GO:0009269	Response to desiccation	0.00375
Common down-regulated biological processes in k-8274+Rh+AM and k-8274+Rh (as compared to control)		
GO:0006873	Cellular ion homeostasis	0.00028
GO:0045490	Pectin catabolic process	0.00563
GO:0015698	Inorganic anion transport	0.00765
GO:0071577	Zinc ion transmembrane transport	0.00926
GO:0006355	Regulation of DNA-templated transcription	0.00984
GO:0046622	Positive regulation of organ growth	0.00985
GO:0071836	Nectar secretion	0.00985
GO:1902395	Regulation of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase activity	0.00985
GO:0061087	Positive regulation of histone H3-K27 methylation	0.00985
GO:0010322	Regulation of isopentenyl diphosphate biosynthetic process, methylerythritol 4-phosphate pathway	0.01959
Specific up-regulated biological processes in k-8274+Rh+AM (as compared to control)		
GO:0015824	Proline transport	4.7e-05
GO:0080163	Regulation of protein serine/threonine phosphatase activity	0.0011
GO:0009269	Response to desiccation	0.0015
GO:0031408	Oxylipin biosynthetic process	0.0016
GO:0009695	Jasmonic acid biosynthetic process	0.0019
GO:0006952	Defense response	0.0024
GO:0010200	Response to chitin	0.0026
GO:0009805	Coumarin biosynthetic process	0.0034
GO:0043086	Negative regulation of catalytic activity	0.0034
GO:0010286	Heat acclimation	0.0051
Specific down-regulated biological processes in k-8274+Rh+AM (as compared to control)		
GO:0009877	Nodulation	1.7e-05
GO:0006465	Signal peptide processing	5.0e-05
GO:0015671	Oxygen transport	0.00053
GO:0009228	Thiamine biosynthetic process	0.00083
GO:0010044	Response to aluminum ion	0.00375
GO:0015706	Nitrate transmembrane transport	0.00483
GO:1903401	L-lysine transmembrane transport	0.00614
GO:0006873	Cellular ion homeostasis	0.00615
GO:0034220	Ion transmembrane transport	0.00675
GO:0015713	Phosphoglycerate transmembrane transport	0.00905

Comparison of k-8274 and k-3358 under double inoculation

In order to get an insight into the molecular bases of the symbiotic responsiveness in pea, we compared the transcriptomes of the ‘responsive’ k-8274 and ‘non-responsive’ k-3358 genotypes treated with Rh+AM. The biological processes up-regulated in k-8274 roots include lignin biosynthesis and cell wall biogenesis, as well as phosphatidylinositol biosynthesis (Table 3). In turn, responses to glucose and fructose, and biosynthesis and metabolism of glutathione and cysteine in k-8274 were down-regulated compared to those in k-3358 (Table 3). The corresponding genes with higher expression level in k-8274 or k-3358 roots are listed in Table S2.

In our previous study, root transcriptomes of three highly responsive (high-EIBSM) and three low-responsive (low-

EIBSM) pea genotypes grown in experimental conditions similar to those of the present experiment (i. e., in pots with soil under combined inoculation with nodule bacteria and AM fungi) were compared, and 90 differentially expressed genes were identified (Afonin et al., 2021). The intersection of the lists of DEGs from the previous and the present experiment revealed 11 genes that were similarly up- or down-regulated in the following comparisons: ‘three high-EIBSM vs three low-EIBSM genotypes’ and ‘k-8274 vs k-3358’ (Table 4). They can be considered as transcriptomic markers of the symbiotic responsiveness trait. Interestingly, 5 out of 9 up-regulated genes are related to abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid metabolism and signaling, which points towards the activation of defense reactions in the roots of the high-EIBSM pea plants.

Table 3. Biological processes that are differentially regulated in roots of k-8274 and k-3358 under double inoculation (Rh+AM)

GO category	Biological process	p-value
Up-regulated biological processes in k-8274+Rh+AM as compared to k-3358+Rh+AM		
GO:1901430	Positive regulation of syringal lignin biosynthesis	0.0019
GO:2000652	Regulation of secondary cell wall biogenesis	0.0056
GO:0009664	Plant-type cell wall organization	0.0332
GO:0006661	Phosphatidylinositol biosynthetic processes	0.0495
Down-regulated biological processes in k-8274+Rh+AM as compared to k-3358+Rh+AM		
GO:0016487	Farnesol metabolic process	0.0022
GO:0009269	Response to desiccation	0.0022
GO:0009788	Negative regulation of abscisic acid-activated signalling pathway	0.0130
GO:1990961	Xenobiotic detoxification by transmembrane export across the plasma membrane	0.0130
GO:0009749	Response to glucose	0.0173
GO:0009750	Response to fructose	0.0238
GO:0009853	Photorespiration	0.0259
GO:0006749	Glutathione metabolic process	0.0323
GO:0019344	Cysteine biosynthetic process	0.0365
GO:0006414	Translational elongation	0.0365

Table 4. Differentially expressed genes of k-8274 (Rh+AM) as compared to k-3358 (Rh+AM) that overlap in the present study and Afonin et al., 2021

Gene ID in the genome of <i>P. sativum</i> cv. Frisson	Functional annotation according to Mercator4 ver.6.0	Log2FoldChange	Adjusted p-value
evm.TU.contig_1396.103	Jasmonoyl-amino acid hydroxylase / (CYP94B) & Cytochrome P450 94B3	3.1922	1.28e-07
evm.TU.scaffold_1292.71	Jasmonic acid oxidase / (JOX/JAO) & Jasmonate-induced oxygenase 2	2.0252	1.01e-09
evm.TU.scaffold_443.110	EC_2.4 glycosyltransferase & Probable alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 11	1.9831	0.0456
evm.TU.contig_941.42	H-type thioredoxin / (Trx-H) & Thioredoxin H-type	1.8029	0.0053
evm.TU.scaffold_2090.181	Receptor component / (PYL/RCAR) of cytoplasm-localized abscisic acid receptor complex & Abscisic acid receptor PYL4	1.6877	0.0001
evm.TU.contig_1345.208	EC_2.3 acyltransferase & Benzyl alcohol O-benzoyltransferase	1.3998	0.0238
evm.TU.scaffold_1655.224	Proline dehydrogenase & Proline dehydrogenase 2	1.3108	0.0495
evm.TU.scaffold_1169.2	HD-ZIP I/II-type transcription factor & Homeobox-leucine zipper protein HAT22	0.9947	0.0006
evm.TU.scaffold_1535.577	Receptor component / (PYL/RCAR) of cytoplasm-localized abscisic acid receptor complex & Abscisic acid receptor PYL4	0.9145	0.0044
evm.TU.scaffold_1535.556	Iron storage protein / (FER) & Ferritin-3	-0.8532	0.0192
evm.TU.scaffold_783.526	Organic cation transporter / (OCT) & Organic cation/carnitine transporter 3	-1.0481	0.0256

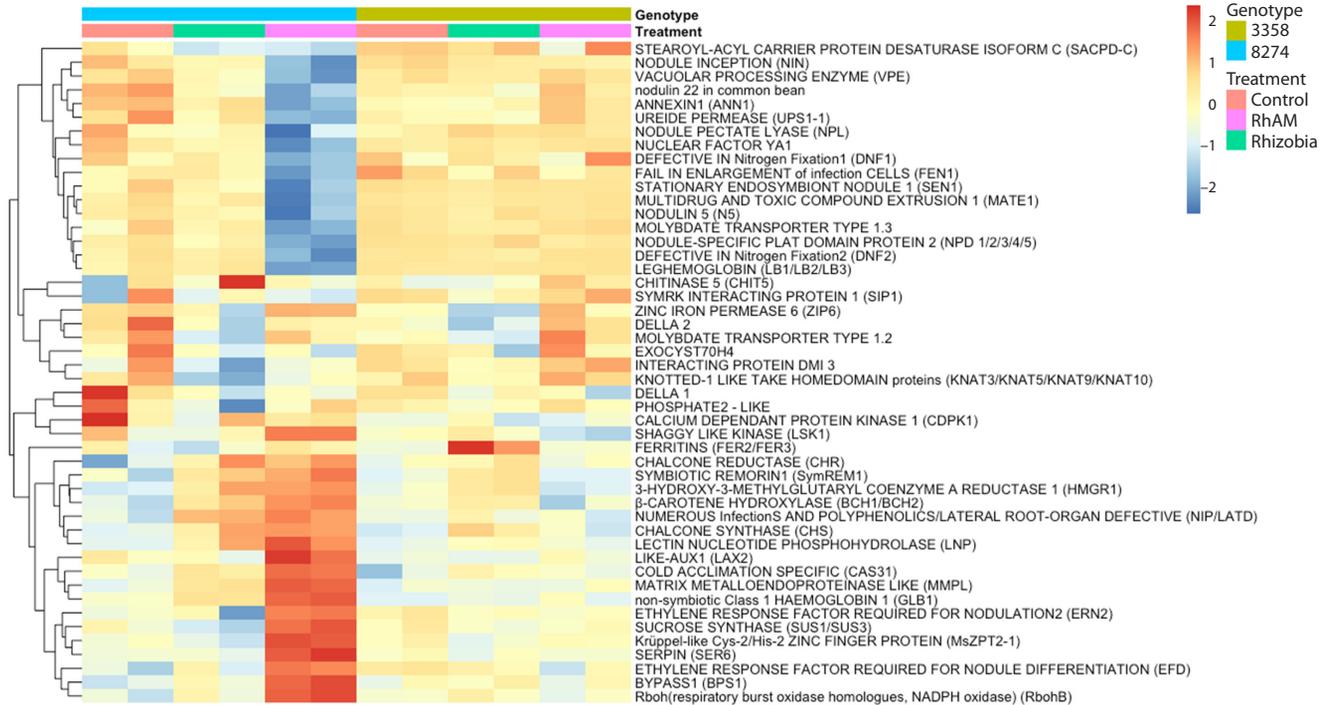


Fig. 2. Expression level of selected *Sym*-genes in roots of k-8274 and k-3358 in control conditions and under single and double inoculation. The heatmap is based on a matrix containing the values of 1-R (R = Pearson correlation coefficient). The raw data were normalized to the size of the dataset, logarithmically transformed, and converted to a z-scale. The lowest gene expression value is represented in blue; the highest value is represented in red.

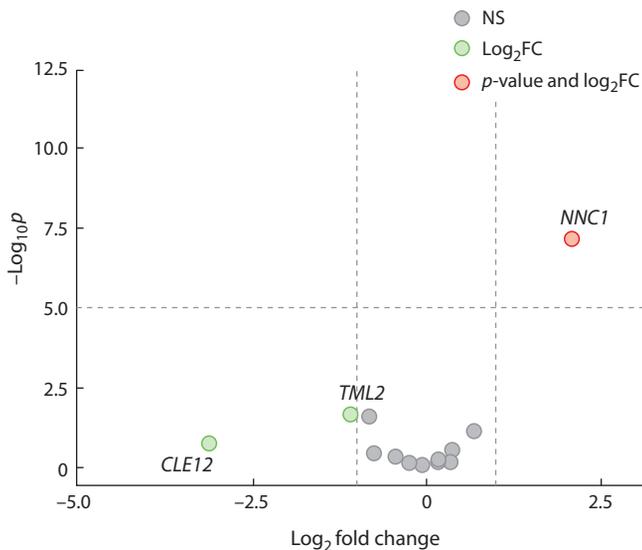


Fig. 3. Differential expression of genes related to autoregulation of nodulation in roots of k-8274 under double inoculation as compared to uninoculated control.

Log₂ fold change (Log₂FC) – the binary logarithm of the ratio of a transcript's expression values in two different conditions; -Log₁₀p – negative logarithm to base 10 of the p-value. For ease of visualization, the p-values for each gene were log-transformed on the graph; NS – statistically non-significant difference in expression (-Log₁₀p < 5.0, or p < 0.00001). The threshold p-value (p < 0.00001) was chosen taking into account the correction for multiple comparisons.

The red color: the *NNC1* gene passed both the p-value (-Log₁₀p > 5.0) and expression level (log₂FC > 1.5) significance thresholds; the green color: the *CLE12* and *TML2* genes have significantly reduced expression levels (log₂FC < -1.5), but this reduction is not statistically significant (-Log₁₀p < 5.0).

Targeted analysis of marker genes

The expression level of the symbiotic (*Sym*) genes (i. e., genes, the role of which in AM and/or RN symbiosis was experimentally verified by mutation analysis or RNAi experiments in model legumes) was examined across all RNAseq samples (39 genes, see Table S1). Interestingly, the samples of k-8274 under double inoculation (Rh+AM) strikingly differed from all other samples, showing two clusters of *Sym* genes, the expression level of which was either higher or lower as compared to other samples (although several genes in the up-regulated cluster had similar expression level in the samples under mono-inoculation with rhizobia) (Fig. 2). The cluster of down-regulated genes contains 15 genes that are normally expressed during nodule development (which again reflects the decreased nodule number in k-8274 plants under double inoculation) and 2 genes (*VPE*, *ANN1*) involved in the infection process in both Rh and AM symbioses (Table S1). The cluster of 18 up-regulated genes includes the genes of the common symbiotic signaling pathway (CSSP) (*SymREM1*, *HMGR1*). Interestingly, the other genes belonging to CSSP do not demonstrate altered expression, which suggests that the early steps of both AM and nodule development are not disturbed in k-8274.

The expression level of the genes related to the AON system was also examined. Out of 13 genes tested, the expression level of only one gene, *NNC1*, was increased in roots of k-8274 under double inoculation (Fig. 3) compared to control. The *NNC1* protein in soybean is a suppressor of the master transcriptional regulator NIN (Wang L. et al., 2019), so it seems that the observed down-regulation of *Nin* in k-8274 under

double inoculation (Fig. 2) is also controlled via up-regulation of *NNC1*, resulting in reduction of nodule formation.

Finally, the expression level of the *PsGLP2* gene was tested, which was recently identified as a transcriptional marker of high symbiotic responsiveness of k-8274 and its descendent breeding line ‘Triumph’ (Zorin et al., 2023). We detected the trend of up-regulation of *PsGLP2* in k-8274 under both mono- and double inoculation, as compared to control, although this change in expression level was not statistically significant (Fig. S1). In k-3358, the expression of *PsGLP2* was not altered under either single or double inoculation.

The suppression of nodulation in k-8274 is condition-dependent

We reanalyzed the raw data of nodule number from Zhukov et al., 2017 by one-way ANOVA and confirmed that AM significantly influenced the nodulation in k-8274 but not k-3358 plants grown in a non-sterile soil (Table 5). However, this result was not reproduced in a new experiment in other experimental conditions (in sterile sand): both k-3358 and k-8274 genotypes demonstrated a decrease in nodulation under combined inoculation (rhizobia + AM fungi) as compared to single inoculation with rhizobia, but the effect was not statistically significant (Table 6).

In sand, AM treatment decreased the shoot dry weight of the non-responsive genotype k-3358 and did not alter the shoot dry weight of the responsive genotype k-8274, compared to the untreated control (Table 7). One can suggest that in some environments (sterile sand) mycorrhiza begins to harm an ineffective genotype, but not an effective one; thus, the trait of symbiotic responsiveness may manifest itself differently in different experimental conditions.

Discussion

The trait of symbiotic responsivity, or EIBSM (Efficiency of Interaction with Beneficial Soil Microorganisms), is a quantitative trait which is determined as an increase in seed biomass due to inoculation with rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi (Shtark et al., 2012). Apparently, the genetic control of this trait is complex; therefore, preliminary works aimed at molecular genetic characterization of plant genotypes with different symbiotic responsivity are required. In pea, two contrasting genotypes, the ‘responsive’ k-8274 and the ‘non-responsive’ k-3358, are used as models to study different aspects of manifestation of this trait. Previously, by proteomic analysis of pea seeds, it was shown that the high responsivity to combined inoculation with rhizobia and AM fungi is connected with prolongation of the seed filling period in the

Table 5. ANOVA results assessing the effect of arbuscular mycorrhiza on nodulation (non-sterile soil, data from Zhukov et al., 2017)

Genotype	Factor	Impact	Degrees of freedom	Mean square	F value	p-value
k-8274	Arbuscular mycorrhiza	-	1	5280.7	20.114	0.000185
	Residuals		22	262.5		
k-3358	Arbuscular mycorrhiza	+	1	600.25	2.7627	0.1159
	Residuals		16	217.27		

Note. Here and in Tables 6 and 7: the ‘Impact’ column indicates an increase (+) or decrease (-) in the mean value due to the estimated factor.

Table 6. ANOVA results assessing the effect of arbuscular mycorrhiza on nodulation (sterile sand)

Genotype	Factor	Impact	Degrees of freedom	Mean square	F value	p-value
k-8274	Arbuscular mycorrhiza	-	1	22.702	0.318	0.5778
	Residuals		25	71.379		
k-3358	Arbuscular mycorrhiza	-	1	896.53	3.0379	0.09232
	Residuals		28	295.12		

Table 7. Two-way ANOVA results assessing effects of rhizobia and arbuscular mycorrhiza on shoot weight (sterile sand)

Genotype	Factor	Impact	Degrees of freedom	Mean square	F value	p-value
k-8274	Rhizobia	+	1	0.004	2.377	0.1295
	Arbuscular mycorrhiza	+	1	0.000186	0.1103	0.7412
	Rhizobia × Arbuscular mycorrhiza		1	0.000751	0.4464	0.5071
	Residuals		50	0.001683		
k-3358	Rhizobia	+	1	0.01206	0.7278	0.397358
	Arbuscular mycorrhiza	-	1	0.1853	11.1826	0.001506
	Rhizobia × Arbuscular mycorrhiza		1	0.007641	0.4611	0.499996
	Residuals		54	0.01657		

‘responsive’ genotype (Mamontova et al., 2019). The results of the present work expand the description of the responsivity trait: it was demonstrated that the roots of the ‘responsive’ genotype showed a more pronounced reaction to inoculation at the transcriptomic level than the roots of the ‘non-responsive’ one, and that the reaction of the ‘responsive’ genotype to combined inoculation (rhizobia + AM fungi) involved down-regulation of the nodule-related genes, which is in line with the suppression of nodulation shown in the earlier experiments (Zhukov et al., 2017).

Although the bulk transcriptome analysis of the entire root system does not allow accurate assessment of gene expression (since the development of nodules and/or arbuscular mycorrhiza may be regulated differently in different zones of the roots), the effect of inoculation was clearly visible in the ‘responsive’ genotype in contrast to the ‘non-responsive’ one. The list of genes with an elevated expression in the roots of k-8274 (as compared to k-3358) under double inoculation includes the genes encoding Lipid Transfer Protein (LTP) family member, putative SOUL heme-binding protein, MYB-like transcription factor, expansin, and metallothionein protein (Table S2). Some of these genes are directly linked to nodulation and/or mycorrhization: one of the members of the LTP family in *M. truncatula* known as Nodulin 5 is required for the successful symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* (Pii et al., 2009); expansins play a role in arbuscular mycorrhiza formation (Mohanty et al., 2018); a member of metallothionein family is involved in rhizobial infection and nodulation in *Phaseolus vulgaris* (Fonseca-García et al., 2022).

Interestingly, several DEGs obtained in this comparison were also found within the previously published list of transcriptomic signatures characteristic of roots of symbiotically responsive pea genotypes grown in a non-sterile soil (Afonin et al., 2021). It is important to note that the experiment of Afonin and colleagues did not include either k-8274 or k-3358, thus, the resulting intersection of the gene lists from Afonin et al., 2021 and the present study may be considered as a list of reliable transcriptomic markers of the EIBSM trait (Table 4). These markers include the up-regulated genes that encode the enzymes jasmonoyl-amino acid hydroxylase and jasmonic acid oxidase, two different genes encoding the abscisic acid receptor PYL4 (which is also involved in jasmonic acid signaling; Lackman et al., 2011), and a benzyl alcohol O-benzoyltransferase, which is involved in biosynthesis of salicylic acid (Kotera et al., 2023). Salicylic acid and jasmonates play a key role in plant defense and have a strong influence on plants metabolism (Jeyasri et al., 2023; Monte, 2023); thus, the manifestation of the EIBSM trait may be based on the fine-tuning of defense reactions accompanied by metabolic changes. Moreover, it can be hypothesized that interaction with beneficial soil microorganisms may have a positive effect on systemic resistance of k-8274 plants, and this aspect of the EIBSM trait manifests itself in non-sterile soil but not in sterile sand.

In k-8274, the double inoculation with nodule bacteria and AM fungi led to down-regulation of the genes normally expressed in nodules, which corresponds to the previously described phenotype of plants (suppression of nodulation; Zhukov et al., 2017) and perhaps reflects the optimization of the nitrogen nutrition of the plants. Interestingly, the early

symbiotic genes were not suppressed under double inoculation, indicating that CSSP, which is common for both AM and RN symbioses, functioned normally in these conditions. This means that the down-regulation of RN symbiosis takes place after the common signaling pathway, apparently, in order not to block the development of both symbioses together. Probably, a similar block of the symbiosis development occurs when pea interacts with non-specific rhizobia (this is the case for Afghanistan peas, a group of varieties which can form nodules only with a low number of specific strains, as opposed to European peas, which are nodulated by a broad spectrum of strains (Lie, 1984; Firmin et al., 1993)). In this case, the phenotypic analysis suggests that the early steps of symbiosis (encoded by CSSP genes) proceed normally, but the penetration of rhizobia into the root hairs is blocked due to absence of the signal transduction mediated by the receptor kinase LykX (=Sym2) (Sulima et al., 2017, 2019). It would be interesting to assess the expression level of the *PsNNC1* gene, which was up-regulated in k-8274 under double inoculation, in Afghanistan peas interacting with non-specific rhizobia, in order to check whether it participates in signal transduction during specific and non-specific interactions with rhizobia.

The nodulation suppression detected in k-8274 under double inoculation is accompanied by a decrease in the expression level of the *PsCLE12* and *PsTML2* genes ($\text{Log}_2\text{FC} < -1.0$, although this decrease is not statistically significant, see Fig. 3). Orthologs of these genes in *M. truncatula* act as negative regulators of nodule development and are parts of the AON (autoregulation of nodulation) system (Gautrat et al., 2019). This observation is consistent with our previous suggestion regarding the possible connection between the AON system and symbiosis efficiency (Zhukov et al., 2021b).

The phenomenon of nodulation suppression was observed in non-sterile soil (Zhukov et al., 2017), where plenty of microorganisms occur, whereas in sterile sand, the decrease in nodule number under double inoculation (Rh+AM) was visible but non-significant for both studied genotypes. Also, in sand, the inoculation with AM fungi had a negative effect on the ‘non-responsive’ genotype k-3358 and was neutral to the ‘responsive’ genotype k-8274. One can conclude that the responsivity trait may be dependent on several environmental factors such as temperature, humidity, the presence of indigenous microorganisms in the growth substrate, etc. Therefore, large-scale experiments are required to estimate the percentage of genotype (G) effect on the manifestation of the symbiotic responsivity trait in comparison to environment (E) and genotype-environment ($G \times E$) interaction.

Recently we showed that the plant’s habitus plays a role in manifestation of the responsivity trait: pea genotypes bearing a natural mutation *le* (p.A229T) in the *Le* gene encoding gibberellin 3-beta-dioxygenase (Martin et al., 1997) have shortened internodes, lower biomass and are more responsive to double inoculation (Rh+AM) than wild-type genotypes (Zhukov et al., 2021a). One of the explanations for this phenomenon was that smaller plants could react more quickly to change in the nitrogen/phosphorous content in the roots and inhibit formation of new symbiotic structures, since this reaction is mediated by long-distance signaling involving CLE and CEP peptides (Okamoto et al., 2016). Indeed, we showed that pea genotypes with long stems had more AM in their roots than the

genotypes with short stems (Zhukov et al., 2021a), and in the present study, we found that the down-regulation of nodule-related genes in non-sterile soil is characteristic of k-8274, which has the *le* phenotype, as opposed to k-3358 with the *Le* phenotype. Thus, the pleiotropic effect of the *le* mutation may also include influence on the plants' symbiotic responsivity, probably due to quicker signaling, which leads to suppression of formation of excessive symbiotic structures; however, further experiments are required to prove this statement.

Conclusion

Due to the development of pea genomics, genome- and transcriptome-wide analyses became available, making it possible to uncover the molecular bases of the traits of interest, including the symbiotic responsivity trait. Here, we described the transcriptomic signatures characteristic of roots of the symbiotically responsive k-8274 genotype. The biological processes associated with the functions of the identified genes include lignin biosynthesis, cell wall biogenesis, and biosynthesis of phosphatidylinositol. Also, the 'responsive' genotype k-8274 demonstrated the pronounced change in the gene expression profiles in roots, as opposite to the 'non-responsive' genotype k-3358, which reflects the observed differences in the effect of inoculation with symbiotic microorganisms. Further work should be devoted to the search for specific genes that affect EIBSM, which will form the basis for marker-assisted selection of new pea cultivars with high effectiveness of interaction with nodule bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi.

References

- Afonin A.M., Gribchenko E.S., Zorin E.A., Sulima A.S., Romanuk D.A., Zhermakov A.I., Shtark O.Y., Akhtemova G.A., Zhukov V.A. Unique transcriptome features of pea (*Pisum sativum* L.) lines with differing responses to beneficial soil microorganisms. *Ecol Genet.* 2021;19(2):131-141. doi 10.1078/16/COGEN54703
- Alexa A., Rahnenfuhrer J. topGO: enrichment analysis for gene ontology. R Package Version 2.58.0. 2024. doi 10.18129/B9.bioc.topGO. <https://bioconductor.org/packages/topGO>
- Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Available at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114-2120. doi 10.1093/bioinformatics/btu170
- Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T. L. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics.* 2009;10:421. doi 10.1186/1471-2105-10-421
- Castillejo M.Á., Bani M., Rubiales D. Understanding pea resistance mechanisms in response to *Fusarium oxysporum* through proteomic analysis. *Phytochemistry.* 2015;115(1):44-58. doi 10.1016/j.phytochem.2015.01.009
- Catford J., Staehelin C., Lerat S., Piché Y., Vierheilig H. Suppression of arbuscular mycorrhizal colonization and nodulation in split-root systems of alfalfa after pre-inoculation and treatment with Nod factors. *J Exp Bot.* 2003;54(386):1481-1487. doi 10.1093/jxb/erg156
- Cerna H., Černý M., Habánová H., Šafařová D., Abushamsiya K., Navrátil M., Brzobohatý B. Proteomics offers insight to the mechanism behind *Pisum sativum* L. response to pea seed-borne mosaic virus (PSbMV). *J Proteomics.* 2017;153:78-88. doi 10.1016/j.jprot.2016.05.018
- Chen H., Boutros P.C. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics.* 2011;12:35. doi 10.1186/1471-2105-12-35
- Danecek P., Bonfield J.K., Liddle J., Marshall J., Ohan V., Pollard M.O., Whitwham A., Keane T., McCarthy S.A., Davies R.M. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience.* 2021;10(2):giab008. doi 10.1093/gigascience/giab008
- Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T.R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15-21. doi 10.1093/bioinformatics/bts635
- Ewels P., Magnusson M., Lundin S., Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics.* 2016;32(19):3047-3048. doi 10.1093/bioinformatics/btw354
- Ferguson B.J., Mens C., Hastwell A.H., Zhang M., Su H., Jones C.H., Chu X., Gresshoff P.M. Legume nodulation: the host controls the party. *Plant Cell Environ.* 2019;42(1):41-51. doi 10.1111/pce.13348
- Firmin J.L., Wilson K.E., Carlson R.W., Davies A.E., Downie J.A. Resistance to nodulation of cv. Afghanistan peas is overcome by *nodX*, which mediates an O-acetylation of the *Rhizobium leguminosarum* lipo-oligosaccharide nodulation factor. *Mol Microbiol.* 1993;10(2):351-360. doi 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01961.x
- Fonseca-García C., López-García C.M., Pacheco R., Armada E., Nava N., Pérez-Aguilar R., Solís-Miranda J., Quinto C. Metallothionein1A regulates rhizobial infection and nodulation in *Phaseolus vulgaris*. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3):1491. doi 10.3390/ijms23031491
- Gautrat P., Mortier V., Laffont C., De Keyser A., Fromentin J., Frugier F., Goormachtig S. Unraveling new molecular players involved in the autoregulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *J Exp Bot.* 2019;70(4):1407-1417. doi 10.1093/jxb/ery465
- Goyal R.K., Mattoo A.K., Schmidt M.A. Rhizobial-host interactions and symbiotic nitrogen fixation in legume crops toward agriculture sustainability. *Front Microbiol.* 2021;12:669404. doi 10.3389/fmicb.2021.669404
- Harrison M.J. Cellular programs for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr Opin Plant Biol.* 2012;15(6):691-698. doi 10.1016/j.pbi.2012.08.010
- Jeyasri R., Muthuramalingam P., Karthick K., Shin H., Choi S.H., Ramesh M. Methyl jasmonate and salicylic acid as powerful elicitors for enhancing the production of secondary metabolites in medicinal plants: an updated review. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2023;153(3):447-458. doi 10.1007/s11240-023-02485-8
- Kálin C., Piombo E., Bourras S., Brantestam A.K., Dubey M., Elfstrand M., Karlsson M. Transcriptomic analysis identifies candidate genes for Aphanomyces root rot disease resistance in pea. *BMC Plant Biol.* 2024;24(1):144. doi 10.1186/s12870-024-04817-y
- Kolde R. Package 'pheatmap.' *R Package.* 2015;1(7):790
- Kotera Y., Komori H., Tasaki K., Takagi K., Imano S., Katou S. The peroxisomal β -oxidative pathway and benzyl alcohol O-benzoyltransferase HSR201 cooperatively contribute to the biosynthesis of salicylic acid. *Plant Cell Physiol.* 2023;64(7):758-770. doi 10.1093/pcp/pcad034
- Lackman P., González-Guzmán M., Tilleman S., Carqueijeiro I., Pérez A.C., Moses T., Seo M., Kanno Y., Häkkinen S.T., Van Montagu M.C.E. Jasmonate signaling involves the abscisic acid receptor PYL4 to regulate metabolic reprogramming in *Arabidopsis* and tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(14):5891-5896. doi 10.1073/pnas.1103010108
- Liao Y., Smyth G.K., Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics.* 2014;30(7):923-930. doi 10.1093/bioinformatics/btt656
- Lie T.A. Host genes in *Pisum sativum* L. conferring resistance to European *Rhizobium leguminosarum* strains. *Plant Soil.* 1984;82(3):415-425. doi 10.1007/BF02184279
- Liu C., Han X., Steenwyk J.L., Shen X.-X. Temporal transcriptomics provides insights into host-pathogen interactions: a case study of *Didymella pinodella* and disease-resistant and disease-susceptible pea varieties. *Crop Health.* 2023;1(1):5. doi 10.1007/s44297-023-00005-w

- Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014; 15(12):550. doi 10.1186/s13059-014-0550-8
- Mamontova T., Afonin A.M., Ihling C., Soboleva A., Lukasheva E., Sulima A.S., Shtark O.Y., Akhtemova G.A., Povydysh M.N., Sinz A., Frolov A., Zhukov V.A., Tikhonovich I.A. Profiling of seed proteome in pea (*Pisum sativum* L.) lines characterized with high and low responsivity to combined inoculation with nodule bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecules.* 2019;24(8):1603. doi 10.3390/molecules24081603
- Martin D.N., Proebsting W.M., Hedden P. Mendel's dwarfing gene: cDNAs from the *Le* alleles and function of the expressed proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(16):8907-8911. doi 10.1073/pnas.94.16.8907
- Mohanty S.K., Arthikala M.-K., Nanjareddy K., Lara M. Plant-symbiont interactions: the functional role of expansins. *Symbiosis.* 2018; 74:1-10. doi 10.1007/s13199-017-0501-8
- Monte I. Jasmonates and salicylic acid: evolution of defense hormones in land plants. *Curr Opin Plant Biol.* 2023;76:102470. doi 10.1016/j.pbi.2023.102470
- Müller L.M., Harrison M.J. Phytohormones, miRNAs, and peptide signals integrate plant phosphorus status with arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr Opin Plant Biol.* 2019;50:132-139. doi 10.1016/j.pbi.2019.05.004
- Okamoto S., Tabata R., Matsubayashi Y. Long-distance peptide signaling essential for nutrient homeostasis in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 2016;34:35-40. doi 10.1016/j.pbi.2016.07.009
- Oldroyd G.E.D. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(4):252-263. doi 10.1038/nrmicro2990
- Parihar A.K., Kumar J., Gupta D.S., Lamichaney A., Naik S.J.S., Singh A.K., Dixit G.P., Gupta S., Toklu F. Genomics enabled breeding strategies for major biotic stresses in pea (*Pisum sativum* L.). *Front Plant Sci.* 2022;13:861191. doi 10.3389/fpls.2022.861191
- Parniske M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(10):763-775. doi 10.1038/nrmicro1987
- Pii Y., Astegno A., Peroni E., Zaccardelli M., Pandolfini T., Crimi M. The *Medicago truncatula* N5 gene encoding a root-specific lipid transfer protein is required for the symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2009;22(12):1577-1587. doi 10.1094/MPMI-22-12-1577
- Reid D.E., Ferguson B.J., Hayashi S., Lin Y.H., Gresshoff P.M. Molecular mechanisms controlling legume autoregulation of nodulation. *Ann Botany.* 2011;108(5):789-795. doi 10.1093/aob/mcr205
- Roy S., Liu W., Nandety R.S., Crook A., Mysore K.S., Pislariu C.I., Frugoli J., Dickstein R., Udvardi M.K. Celebrating 20 years of genetic discoveries in legume nodulation and symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell.* 2020;32(1):15-41. doi 10.1105/tpc.19.00279
- Rubiales D., Barilli E., Rispaill N. Breeding for biotic stress resistance in pea. *Agriculture.* 2023;13(9):1825. doi 10.3390/agriculture13091825
- Rubiales D., Mikic A. Introduction: legumes in sustainable agriculture. *Crit Rev Plant Sci.* 2015;34(1-3):2-3. doi 10.1080/07352689.2014.897896
- Shtark O.Y., Danilova T.N., Naumkina T.S., Vasilchikov A.G., Chebotar V.K., Kazakov A.E., Zhernakov A.I., Nemankin T.A., Prilepskaya N.A., Borisov A.U. Analysis of pea (*Pisum sativum* L.) source material for breeding of cultivars with high symbiotic potential and choice of criteria for its evaluation. *Ecol Genet.* 2006;4(2):22-28. doi 10.17816/ecogen4222-28
- Shtark O.Y., Borisov A.Y., Zhukov V.A., Tikhonovich I.A. Mutually beneficial legume symbioses with soil microbes and their potential for plant production. *Symbiosis.* 2012;58(1-3):51-62. doi 10.1007/s13199-013-0226-2
- Shtark O.Y., Zhukov V.A., Sulima A.S., Singh R., Naumkina T.S., Borisov A.Y. Prospects for the use of multi-component symbiotic systems of the Legumes. *Ecol Genet.* 2015;13(1):33-46. doi 10.17816/ecogen13133-46
- Shtark O.Y., Puzanskiy R.K., Avdeeva G.S., Yurkov A.P., Smolikova G.N., Yemelyanov V.V., Kliukova M.S., Shavarda A.L., Kirpichnikova A.A., Zhernakov A.I. Metabolic alterations in pea leaves during arbuscular mycorrhiza development. *PeerJ.* 2019;7:e7495. doi 10.7717/peerj.7495
- Smith S.E., Read D. The symbionts forming arbuscular mycorrhizas. In: Smith S.E., Read D. *Mycorrhizal Symbiosis.* Academic Press, 2008;13-41. doi 10.1016/b978-012370526-6.50003-9
- Sulima A.S., Zhukov V.A., Afonin A.A., Zhernakov A.I., Tikhonovich I.A., Lutova L.A. Selection signatures in the first exon of paralogous receptor kinase genes from the Sym2 region of the *Pisum sativum* L. genome. *Front Plant Sci.* 2017;8:1957. doi 10.3389/fpls.2017.01957
- Sulima A.S., Zhukov V.A., Kulaeva O.A., Vasileva E.N., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A. New sources of Sym2^A allele in the pea (*Pisum sativum* L.) carry the unique variant of candidate LysM-RLK gene *LykX*. *PeerJ.* 2019;7:e8070. doi 10.7717/peerj.8070
- Tsyganov V.E., Tsyganova A.V. Symbiotic regulatory genes controlling nodule development in *Pisum sativum* L. *Plants.* 2020;9(12):1741. doi 10.3390/plants9121741
- Wang D., Dong W., Murray J., Wang E. Innovation and appropriation in mycorrhizal and rhizobial Symbioses. *Plant Cell.* 2022;34(5):1573-1599. doi 10.1093/plcell/koac039
- Wang L., Sun Z., Su C., Wang Y., Yan Q., Chen J., Ott T., Li X. A GmNINA-miR172c-NNC1 regulatory network coordinates the nodulation and autoregulation of nodulation pathways in soybean. *Mol Plant.* 2019;12(9):1211-1226. doi 10.1016/j.molp.2019.06.002
- Wickham H. Getting Started with ggplot2. In: ggplot2. Use R! Springer, 2016;11-31. doi 10.1007/978-3-319-24277-4_2
- Yang J., Lan L., Jin Y., Yu N., Wang D., Wang E. Mechanisms underlying legume-rhizobium symbioses. *J Int Plant Biol.* 2022;64(2):244-267. doi 10.1111/jipb.13207
- Zhukov V.A., Akhtemova G.A., Zhernakov A.I., Sulima A.S., Shtark O.Y., Tikhonovich I.A. Evaluation of the symbiotic effectiveness of pea (*Pisum sativum* L.) genotypes in pot experiment. *Agric Biol.* 2017;52(3):607-614. doi 10.15389/agrobiology.2017.3.607eng
- Zhukov V.A., Zhernakov A.I., Sulima A.S., Kulaeva O.A., Kliukova M.S., Afonin A.M., Shtark O.Y., Tikhonovich I.A. Association study of symbiotic genes in pea (*Pisum sativum* L.) cultivars grown in symbiotic conditions. *Agronomy.* 2021a;11(11):2368. doi 10.3390/agronomy11112368
- Zhukov V., Zorin E., Zhernakov A., Afonin A., Akhtemova G., Bovin A., Dolgikh A., Gorshkov A., Gribchenko E., Ivanova K., Kirienko A., Kitaeva A., Kliukova M., Kulaeva O., Kusakin P., Leppyanen I., Pavlova O., Romanyuk D., Rudaya E., Serova T., Shtark O., Sulima A., Tsyganova A., Vasileva E., Dolgikh E., Tsyganov V., Tikhonovich I. Transcriptomic analysis of *sym28* and *sym29* supernodulating mutants of pea (*Pisum sativum* L.) under complex inoculation with beneficial microorganisms. *Biol Commun.* 2021b; 66(3):181-197. doi 10.21638/spbu03.2021.301
- Zorin E.A., Kliukova M.S., Afonin A.M., Gribchenko E.S., Gordon M.L., Sulima A.S., Zhernakov A.I., Kulaeva O.A., Romanyuk D.A., Kusakin P.G., Tsyganova A.V., Tsyganov V.E., Tikhonovich I.A., Zhukov V.A. A variable gene family encoding nodule-specific cysteine-rich peptides in pea (*Pisum sativum* L.). *Front Plant Sci.* 2022;13:884726. doi 10.3389/fpls.2022.884726
- Zorin E.A., Sulima A.S., Zhernakov A.I., Kuzmina D.O., Rakova V.A., Kliukova M.S., Romanyuk D.A., Kulaeva O.A., Akhtemova G.A., Shtark O.Y., Tikhonovich I.A., Zhukov V.A. Genomic and transcriptomic analysis of pea (*Pisum sativum* L.) breeding line 'Triumph' with high symbiotic responsivity. *Plants.* 2023;13(1):78. doi 10.3390/plants13010078

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

Received August 30, 2024. Revised November 28, 2024. Accepted December 16, 2024.

doi 10.18699/vjgb-25-29

Correction of GenBank's taxonomic entry error raises a new issue regarding intergeneric relationships among salangid fishes (Osmeriformes: Salangidae)

E.S. Balakirev  

A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia
 esbalakirev@mail.ru

Abstract. The GenBank database of publicly available nucleotide sequences is the largest genetic repository providing vitally important resources for downstream applications in biology and medicine. The concern raised about reliability of GenBank data necessitates monitoring of possible taxonomic entry errors. A case of mitochondrial genome (or mitogenome) misidentification for a salangid fish belonging to the genus *Neosalanx* (Osmeriformes, Salangidae) is considered in this report. The GenBank database contains four complete mitogenome sequences of *N. taihuensis* with the accession numbers JX524196, KP170510, MH348204, and MW291630. The overall mean *p*-distance for these sequences is quite high ($7.01 \pm 0.14\%$) but becomes 29-fold lower ($0.24 \pm 0.05\%$) after excluding the MW291630 mitogenome. An analysis of all available nucleotide sequences of salangids has shown that the observed inconsistency in the level of divergence between *N. taihuensis* mitogenomes is due to species misidentification. It has turned out that the mitogenome MW291630 available in GenBank does not belong to *N. taihuensis*, but is, in fact, a mitogenome of *N. jordani* misidentified as *N. taihuensis*. The resolved taxonomic identity of the MW291630 mitogenome, as well as an extended sample of species with investigated single-marker sequences, has raised some new issues regarding intergeneric relationships in salangid fishes. In particular, the obtained data do not support synonymization of the genus *Neosalanx* with *Protosalanx*, as was suggested in the last revision of the salangid classification. As the comparative analysis of interspecific and intergeneric divergences shows, *Protosalanx* is not an all-inclusive clade that includes all *Neosalanx* species. Instead, it consists of (at least) two evolutionary distinct lineages with the level of genetic divergence between them matching well the mean value of divergence between the other salangid genera. Further analysis using nuclear genome-wide data is required to have new insights into the evolution of salangid fishes.

Key words: *Neosalanx*; *Protosalanx*; taxonomic misidentification; mitochondrial genomes; *CytB*; single-marker sequences; genetic divergence

For citation: Balakirev E.S. Correction of GenBank's taxonomic entry error raises a new issue regarding intergeneric relationships among salangid fishes (Osmeriformes: Salangidae). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(2):259-267. doi 10.18699/vjgb-25-29

Funding. This study received budget support within the framework of the Research Study entitled "World Ocean biodiversity: taxonomy, barcoding, phylogenetics, reproductive and evolutionary biology, biogeography" (State registry no. 121082600036-9, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation) conducted by A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia.

Acknowledgements. The author greatly appreciates the encouragement and help from Elena I. Balakireva, Alla G. Oleinik, and Larisa G. Erofeeva. Evgeny P. Shvetsov (Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, FEB, RAS, Vladivostok, Russia) kindly proofread the manuscript.

Исправление таксономической ошибки в базе данных GenBank поднимает новый вопрос относительно межродовых отношений у саланксовых рыб (Osmeriformes: Salangidae)

Е.С. Балакирев  

Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия
 esbalakirev@mail.ru

Аннотация. Генетическая база данных GenBank является крупнейшим генетическим хранилищем, предоставляющим жизненно важные ресурсы для последующего применения в биологии и медицине. Вызванная обеспокоенность надежностью GenBank обуславливает необходимость мониторинга возможных таксономических ошибок в записях этой базы данных. Здесь мы сообщаем о случае ошибочной идентификации митохондриального генома (или митогенома) у салангидной рыбы, принадлежащей к роду *Neosalanx* (Osmeriformes, Salangidae). База данных GenBank содержит четыре полные последовательности митогенома *N. taihuensis* с номерами доступа JX524196, KP170510, MN348204 и MW291630. Средняя *p*-дистанция между этими последовательностями довольно велика ($7.01 \pm 0.14\%$), но становится в 29 раз меньше ($0.24 \pm 0.05\%$) после исключения митогенома MW291630. Анализ всех доступных нуклеотидных последовательностей салангид показал, что наблюдаемое несоответствие в уровне дивергенции между митогеномами *N. taihuensis* обусловлено ошибочной идентификацией видов. Оказалось, что митогеном MW291630 не принадлежит *N. taihuensis*, а в действительности представляет митогеном *N. jordani*, ошибочно идентифицированный как *N. taihuensis*. Установленная таксономическая идентичность митогенома MW291630, а также расширенная выборка видов с исследованными маркерными последовательностями выявили некоторые новые аспекты межродовых отношений у салангидных рыб. В частности, полученные данные не подтверждают синонимизацию рода *Neosalanx* с *Protosalanx*, как это было предложено в последней ревизии классификации салангид. Как показывает настоящий анализ, *Protosalanx* не является кладой, включающей все виды *Neosalanx*. Напротив, эта клада состоит по крайней мере из двух эволюционно разных линий, уровень генетической дивергенции между которыми соответствует межродовым значениям дивергенции у салангид. Необходим дальнейший анализ с использованием полных ядерных геномов для выяснения эволюции салангидных рыб.

Ключевые слова: *Neosalanx*; *Protosalanx*; таксономические ошибки идентификации; митохондриальные геномы; *CytB*; маркерные последовательности; генетическая дивергенция

Introduction

The value and reliability of the GenBank database (Sayers et al., 2023) depends on the accuracy of species identification of biological samples, which is quite often not provided when based solely on morphology with an insufficient number of diagnostic characters. Species identification errors have been increasingly referred to as a serious challenge limiting the utility and reliability of public databases. In fact, for organisms such as fungi, which are notoriously difficult to distinguish, up to 20 % (Nilsson et al., 2006) or even 30 % (Hofstetter et al., 2019) of DNA sequence records in GenBank may have erroneous lineage designations. Multiple taxonomic misidentifications were reported for nuclear genome-sequenced strains of medically important lower eukaryotes (e. g., Houbraken et al., 2021), for single-marker sequences of many fishes (e. g., Li et al., 2018), and for complete mitogenomes of many higher eukaryotes, including bivalve mollusks (Salvi et al., 2021; Cunha et al., 2022), ticks (Mohamed et al., 2022), insects (Ožana et al., 2022; Kim et al., 2023), parasitic nematodes (Nielsen et al., 2014), fishes (Cheng et al., 2012; Balakirev et al., 2017, 2024; Oleinik et al., 2019; Sangster, Luksenburg, 2021a; Teske, 2021), amphibians (Mulder et al., 2016), reptiles (Simonov et al., 2018), birds (Sangster, Luksenburg, 2021b), and placental mammals (Botero-Castro et al., 2016).

A taxonomic misidentification causes discordance between the species name and the nucleotide sequence, thus, compromising downstream inferences. Consequently, it is urgently important to disclose such problematic sequences and report them as fast as possible after their deposition in GenBank in order to prevent propagation of incorrect biological information among databases and subsequent publications (e. g., Balakirev et al., 2017, 2024; Sangster, Luksenburg, 2021b).

Here, we report a case of mitochondrial genome misidentification for a salangid fish belonging to the genus *Neosalanx* Wakiya, Takahashi, 1937 (Osmeriformes, Salangidae).

Salangids are endemic to East Asia and inhabit a wide range of marine, brackish-water, and freshwater habitats in China, Vietnam, Korean Peninsula, Japan, and Russia (e. g., Roberts, 1984). These are small, neotenic fishes with early maturation, relatively high fecundity, and a life span of about one year. Species identification of salangid fishes remains a serious challenge.

The taxonomy of salangids, based on morphological, ecological, and genetic approaches, has been subject to various revisions with multiple known synonyms (Fu et al., 2005, 2012; Zhang et al., 2007; Guo et al., 2011). In particular, it was shown that *N. taihuensis* Chen, 1956, *N. tangkahkeii* (Wu, 1931), and *N. pseudotaihuensis* Zhang, 1987 are junior synonyms of *N. brevirostris* (Pellegrin, 1923) (Zhang et al., 2007; Guo et al., 2011). *Hemisanx* Regan, 1908 was shown to be a junior synonym of *Salanx* Cuvier, 1816 (Guo et al., 2011). Somewhat close genetic relationships were also found (Zhang et al., 2007) between *Protosalanx chinensis* (Basilewsky, 1855), *N. anderssoni* (Rendahl, 1923), *N. argentea* (Lin, 1932), and *N. tangkahkeii*. Based on the morphological characters, ecological preferences, and genetic data (mitochondrial *CytB* gene), Zhang et al. (2007) identified a group of species within the genus *Neosalanx*, including *N. reganii* Wakiya, Takahashi, 1937, *N. jordani* Wakiya, Takahashi, 1937, *N. oligodontis* Chen, 1956, and *Neosalanx* sp., which they proposed to treat as a separate new undescribed genus “*Microsalanx*”. Zhang et al. (2007) and Guo et al. (2011) assumed that *N. anderssoni* may also belong to the genus *Protosalanx* Regan, 1908. Using extensive morphological analysis and also genetic markers such as mitochondrial (*CytB*) and seven nuclear genes, Fu et al. (2012) suggested that the genus *Neosalanx* should be considered a junior synonym of *Protosalanx*. These authors also found a distant relationship between *Salangichthys ishikawae* Wakiya, Takahashi, 1913 and *S. microdon* Bleeker, 1860, which proved that the two species belong to different genera: *Salangichthys* Bleeker,

1859 and the newly established *Neosalangichthys* Fu, Li, Xia, Lei, 2012 including a single species, *N. ishikawae*. Fu et al. (2012) found that the genera *Leucosoma* Gray, 1831 and *Salanx* differ significantly in genetic and morphological diagnostic characters and are, therefore, not synonymous.

Yang et al. (2020) deposited a complete mitogenome of the salangid *N. taihuensis* to GenBank under the accession no. MW291630 (taxonomy ID NCBI:txid240825), providing the forth mitogenome for this species in addition to the already available ones: JX524196, KP170510, and MH348204. An analysis of the new *N. taihuensis* MW291630 mitogenome in comparison with all other available mitogenome sequences, as well as the use of single-marker sequences of salangid fishes, has shown that this mitogenome sequence does not belong to *N. taihuensis*. We found that the specimen investigated by Yang et al. (2020) was erroneously identified as *N. taihuensis* and actually represents *N. jordani*. Therefore, the aim of the present study was to document this GenBank entry error and use the correctly identified MW291630 mitogenome, as well as an extended sample of single-marker sequences, to clarify some challenging issues regarding intergeneric relationships among salangid fishes.

Materials and methods

Mitochondrial genomes and single-marker sequences.

A total of 13 complete mitogenome sequences from fishes of the family Salangidae Bleeker, 1859 were accessed from the Genetic Sequence Data Bank (the National Center for Biotechnology Information; NCBI-GenBank Flat File Release 260.0, April 15, 2024). The outgroup species, including *Plecoglossus altivelis* (Temminck, Schlegel, 1846) (family Plecoglossidae Bleeker, 1859) and *Retropinna retropinna* (Richardson, 1848) (family Retropinnidae Gill, 1862), were selected based on the previous molecular evidence of their close relationship to the family Salangidae (Fu et al., 2005; Zhang et al., 2007; Guo et al., 2011) and on a screening of nucleotide sequences available in GenBank using the basic local alignment search tool (BLAST) procedure (Altschul et al., 1990). Additionally, we also analyzed 406 mitochondrial single-marker sequences, including *12S rRNA*, *16S rRNA*, *ND1*, *COI*, and *CytB* published in previous studies on salangids (see Supplementary Table S1 for accession numbers and references)¹.

DNA sequence analysis. Previously, we described the DNA sequence analysis in detail elsewhere (e.g., Balakirev et al., 2017, 2020; Balakirev, 2022). The main steps are summarized in brief below. The nucleotide sequences were aligned using the software MUSCLE (Edgar, 2004). The programs DnaSP v. 6 (Rozas et al., 2017) and MEGA v. 11 (Tamura et al., 2021) were used for intra- and interspecific analysis of polymorphism and divergence based on uncorrected *p*-distance (Kartavtsev, 2011; Collins et al., 2012). Phylogenetic reconstructions were inferred from an analysis of complete mitogenomes by the maximum likelihood methods available in IQ-TREE v. 2 (Nguyen et al., 2015). The trees were constructed using complete mitogenomes or mitochondrial single-marker sequences only (*12S rRNA*, *16S rRNA*, *ND1*, *COI*, and *CytB*). For all reconstructions, the best-fit model of nucleotide substitution

was chosen with the Akaike Information Criterion and the Bayesian Information Criterion in MEGA and IQ-TREE. The ultrafast maximum likelihood bootstrap analysis (Hoang et al., 2018) consisted of 10,000 replicates.

Results and discussion

Variability and divergence of salangid mitogenomes

Figure 1 displays a maximum likelihood tree of complete mitogenome sequences for the salangid species including representatives of the valid genera *Salanx*, *Leucosoma*, *Salangichthys*, *Protosalanx*, and *Neosalanx*. The tree shows the *N. taihuensis* (with synonyms) specimens present in two significantly diverged clusters (Lineage 1 and Lineage 2; Fig. 1) with the overall mean distance equal to 7.01 ± 0.14 %. The *N. taihuensis* mitogenome sequences from Lineage 1 (JX524196, KP170510, and MH348204) were very similar to each other (with an average *p*-distance of 0.24 ± 0.05 %), thus, demonstrating a typical level of intraspecific nucleotide diversity in fishes (e.g., Kartavtsev et al., 2016; Li et al., 2018). Lineage 1, except for *N. taihuensis*, also included *P. chinensis* and *N. anderssoni*. The overall mean distance between the species from Lineage 1 (using a single randomly picked sequence per species) was 7.70 ± 0.17 % with pairwise *p*-distances varying from 4.82 ± 0.17 % between *P. chinensis* and *N. anderssoni* to 9.21 ± 0.22 % between *P. chinensis* and *N. taihuensis*, which matched well the known interspecific nucleotide diversity in fishes (e.g., Kartavtsev et al., 2016; Li et al., 2018). Lineage 2 (Fig. 1) included the *N. taihuensis* MW291630 mitogenome only, which demonstrated a high level of divergence (14.08 ± 0.27 %) with the representative sequence of the *N. taihuensis* mitogenome from Lineage 1. With the use of all mitogenomes for the species from Lineage 1 for comparison (*P. chinensis*, *N. anderssoni*, and *N. taihuensis*; Fig. 1), the difference between Lineages 1 and 2 still remained markedly higher (13.78 ± 0.24 %) than the overall mean distance (7.70 ± 0.17 %) estimated for Lineage 1.

We found the diagnostic 15-bp deletion that occurs within the *ND5* gene (at coordinates 79–93, Supplementary Fig. S2) and the 1-bp and 2-bp diagnostic deletions that occur within the non-coding (control) region (at coordinates 534, 963, 1051–1052, and 1071; Supplementary Fig. S3). These are shared by the *P. chinensis*, *N. anderssoni*, and *N. taihuensis* mitogenomes (Lineage 1) and distinguish them clearly from the *N. taihuensis* MW291630 (Lineage 2) and the rest of the salangid mitogenomes. The 15-bp deletion within the *ND5* gene is the only sequence length variability detected for the protein-coding genes in the mitogenomes of salangid fishes. Taking into account the high phylogenetic informativeness of gaps (e.g., Giribet, Wheeler, 1999), these diagnostic deletions provide robust evidence for the close relationships of the species belonging to Lineage 1 and their distinct difference from Lineage 2.

To scale the value of full mitogenome divergence between Lineages 1 and 2, we estimated the average level of divergence based on the representative genera including *Protosalanx*, *Salanx*, *Leucosoma*, and *Salangichthys*. To be conservative, we excluded *N. anderssoni* and *N. taihuensis* (with synonyms) in order to prevent underestimation of *p*-distance values due

¹ Supplementary Table S1 and Figs. S1–S3 are available at: <https://doi.org/10.5281/zenodo.13455533>

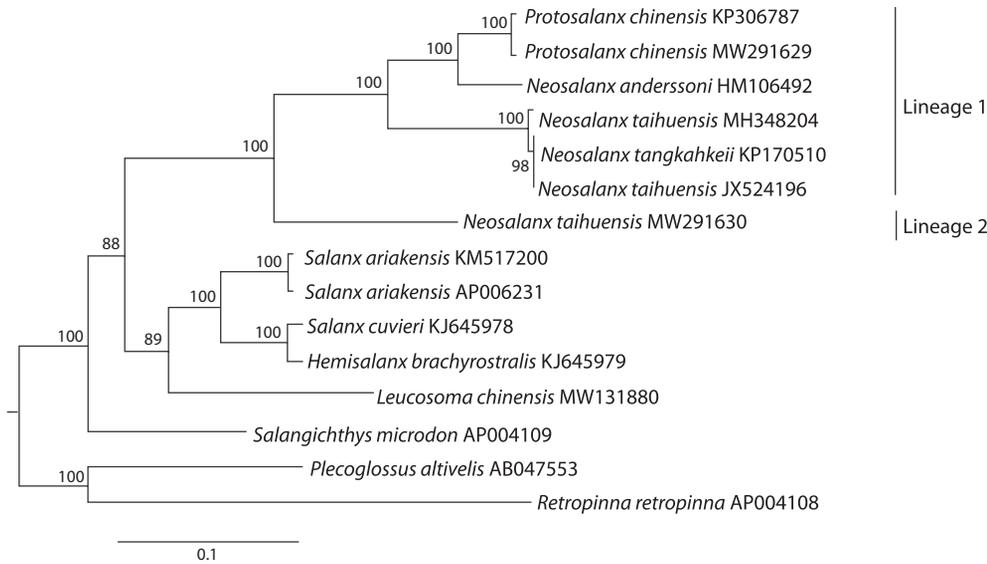


Fig. 1. Maximum likelihood tree inferred from an analysis of the complete mitochondrial genomes for fishes of the family Salangidae.

The TIM2+F+I+G4 model was used to construct the tree. The numerals at the nodes are bootstrap probability (percentage) values based on 10,000 replicates (values lower than 75 % are omitted). The tree includes all salangid mitogenomes available in GenBank except the three recombinant sequences of *Protosalanx chinensis* under the accession nos. HM106494, MH330683, and KJ499917 (Balakirev, 2022). The synonymous species names *N. taihuensis* or *N. tangkahkeii* were used for the originally published KP170510, MW291630, JX524196, and MH348204 mitogenomes. To avoid any confusion, we leave the names as they were originally assigned for the salangid species considered in this paper.

Table 1. Pairwise *p*-distances between salangid genera based on complete mitogenomes

Genus	<i>Salanx</i>	<i>Leucosoma</i>	<i>Salangichthys</i>	<i>Protosalanx</i>
<i>Salanx</i>		0.0026	0.0026	0.0028
<i>Leucosoma</i>	0.1251		0.0027	0.0029
<i>Salangichthys</i>	0.1342	0.1461		0.0029
<i>Protosalanx</i>	0.1507	0.1704	0.1658	

Note. The salangid genera *Salanx*, *Leucosoma*, *Salangichthys*, and *Protosalanx* are represented by the following species: *Salanx ariakensis* Kishinouye, 1902 (AP006231), *Leucosoma chinensis* (Osbeck, 1765) (MW131880), *Salangichthys microdon* (AP004109), and *Protosalanx chinensis* (KP306787). The *p*-distances are below the diagonal line. The standard errors, obtained with 10,000 bootstrap replications, are above the diagonal line.

to possible congeneric relationships of these species (Zhang et al., 2007; Guo et al., 2011). We also excluded the MW291630 mitogenome sequence with uncertain identity. The obtained overall mean *p*-distance for all available genera of salangid fishes was 14.87 ± 0.21 % with pairwise *p*-distances varying from 12.51 ± 0.26 % between *Leucosoma* and *Salanx* to 17.04 ± 0.29 % between *Leucosoma* and *Protosalanx* (Table 1), which was close to the value of divergence between Lineages 1 and 2 (13.78 ± 0.24 %).

It is worth noting that in pairwise comparisons the divergence between Lineages 1 and 2 (13.78 ± 0.24 %) was not markedly different from the divergence between *Leucosoma* and *Salangichthys*, or was even slightly higher than the divergence between *Leucosoma* and *Salanx*, as well as between *Salangichthys* and *Salanx* (Table 1). Thus, the pairwise comparisons showed that the mitogenome divergence between Lineage 1 and Lineage 2 matched well the intergeneric level of divergence in salangid fishes. The interlineage distance

matched also the average value of divergence between different genera reported for the single-marker sequences or complete mitogenomes in other groups of fishes (e. g., Kartavtsev et al., 2016; Li et al., 2018; Balakirev et al., 2020).

Identification of the MW291630 mitogenome

According to a taxonomic hypothesis based on genetic data, *N. taihuensis*, *N. tangkahkeii*, *N. pseudotaihuensis*, and *N. brevirostris* are synonyms (Zhang et al., 2007; Guo et al., 2011). Consequently, the genus *Neosalanx* is represented in GenBank by only two species, *N. taihuensis* (with synonyms) and *N. anderssoni* (HM106492; Supplementary Table S1), which makes the identification of the problematic complete mitogenome MW291630 impossible. However, the GenBank database contains at least five more *Neosalanx* species, representing the full taxonomic diversity known for the genus *Neosalanx*, that were investigated using mitochondrial single-marker sequences: *N. argentea*, *N. jordani*, *N. oligodontis*,

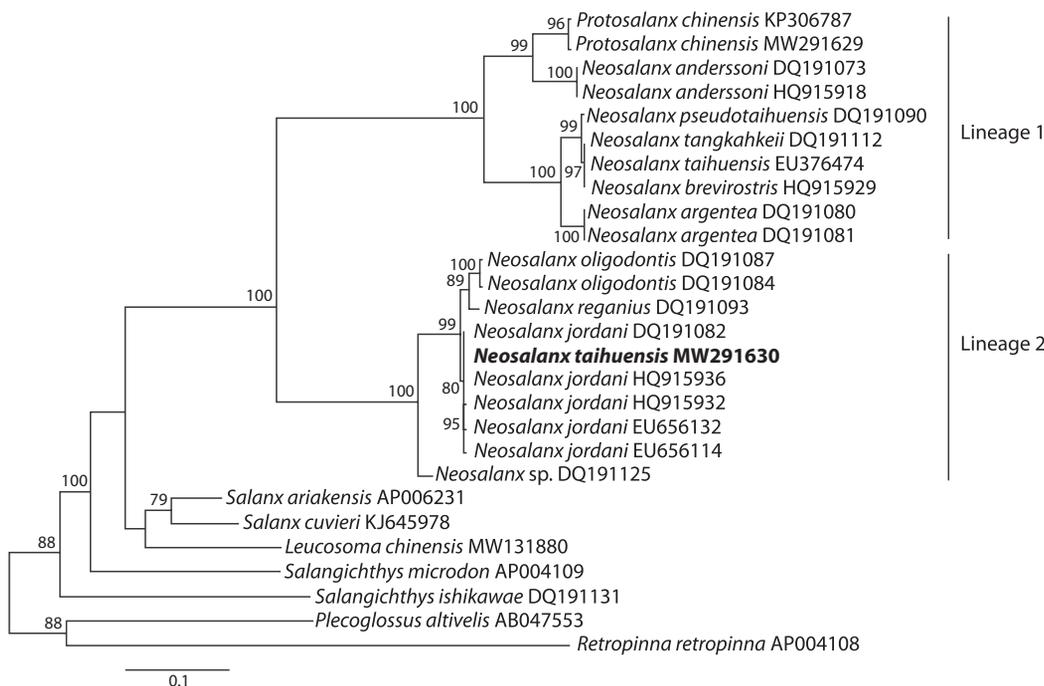


Fig. 2. Maximum likelihood tree for the members of the family Salangidae based on the *CytB* gene sequences.

The Tamura-Nei + gamma (TN93+G) model was used to infer the tree. The *N. jordani* *CytB* sequences are represented by three datasets investigated by Fu et al. (2012) (HQ915932 and HQ915936), Zhang et al. (2007) (DQ191082), and Zhao et al. (2010) (EU656114 and EU656132). The *N. taihuensis* MW291630 mitogenome is highlighted in bold. For tree reconstruction, we used only some representative samples from larger datasets (a full list of the *CytB* sequences is provided in Supplementary Table S1). For other comments, see Figure 1.

N. reganius, and *Neosalanx* sp. (the names of the species are listed as they were identified by the authors who submitted the respective nucleotide sequences to GenBank). The nucleotide sequences obtained for these species can be used to resolve the observed inconsistency detected for the *N. taihuensis* complete mitogenomes and to identify the taxonomically problematic MW291630 mitogenome.

We analyzed the GenBank mitochondrial single-marker sequences that are most frequently used in taxonomic and phylogenetic reconstructions of salangid fishes, including *12S rRNA*, *16S rRNA*, *ND1*, *COI*, and *CytB*. A preliminary analysis revealed that among the single-marker sequences, only *CytB* demonstrated noticeable divergence values. The other markers provided much lower resolution but were still not contradictory to the *CytB* data (see, e.g., the maximum likelihood tree based on the *COI* gene; Supplementary Fig. S1). Consequently, further analysis was based on the *CytB* gene only.

Figure 2 illustrates the maximum likelihood tree based on the *CytB* gene for *N. taihuensis* and other members of the family Salangidae representing almost the entire taxonomic diversity of the genus *Neosalanx*. There were two significantly different clusters that included the species name *N. taihuensis*. These clusters corresponded to Lineages 1 and 2 identified on the basis of mitogenome sequences (Fig. 1). The overall mean *p*-distance for Lineage 1 was 9.13 ± 0.66 % using a single randomly picked sequence per species (with pairwise *p*-distances varying from 3.33 ± 0.54 % between *N. taihuensis* and *N. argentea* to 12.09 ± 0.99 % between *N. taihuensis*

and *N. anderssoni*). Lineage 1 included *P. chinensis* and part of the *Neosalanx* species (*N. anderssoni*, *N. taihuensis*, and *N. argentea*) that Fu et al. (2012) had combined with other *Neosalanx* species and synonymized with the genus *Protosalanx* (see Introduction). The second cluster contained *N. oligodontis*, *N. reganius*, *N. jordani*, *Neosalanx* sp., and the *CytB* portion of the MW291630 mitogenome with an overall mean *p*-distance of 4.69 ± 0.45 % and pairwise *p*-distances varying from 2.10 ± 0.43 % between *N. oligodontis* and *N. reganius* to 7.01 ± 0.76 % between *N. reganius* and *Neosalanx* sp. This cluster included a group of species that were placed in the genus “*Microsalanx*” erected by Zhang et al. (2007). The mean *p*-distance between the clusters (Lineage 1 and Lineage 2, Fig. 2) was 19.03 ± 1.06 % with a single randomly picked sequence per species or 18.97 ± 1.09 % with all 146 sequences available for Lineages 1 and 2 (Supplementary Table S1). This value fit well into the range of intergeneric divergences of fishes (e.g., Kartavtsev et al., 2016; Li et al., 2018; Balakirev et al., 2020).

An analysis of pairwise *p*-distances showed a surprisingly high level of sequence divergence (18.89 ± 1.16 %) (Table 2) between the GenBank *CytB* sequences of *N. taihuensis*, including 70 isolates obtained from different localities by various authors (Zhang et al., 2007; Zhao et al., 2008; see also Supplementary Table S1) with low intraspecific variability (0.44 ± 0.09 %), and the respective *CytB* portion of the MW291630 mitogenome. The result was consistent with the data obtained for the complete mitogenomes (see above), which showed a substantial difference between the MW291630

Table 2. Pairwise *p*-distances between the *CytB* sequences for *Neosalanx* species

	1	2	3	4	5	6	7	8
1		0.0003	0.0041	0.0044	0.0075	0.0116	0.0119	0.0120
2	0.0012		0.0040	0.0044	0.0075	0.0115	0.0119	0.0120
3	0.0189	0.0196		0.0042	0.0078	0.0114	0.0117	0.0119
4	0.0219	0.0229	0.0198		0.0077	0.0115	0.0117	0.0120
5	0.0657	0.0666	0.0686	0.0701		0.0112	0.0114	0.0115
6	0.1889	0.1890	0.1837	0.1853	0.1848		0.0052	0.0099
7	0.1906	0.1909	0.1855	0.1836	0.1862	0.0332		0.0097
8	0.2004	0.2003	0.1964	0.1986	0.1841	0.1215	0.1172	

Note. All available *CytB* sequences for each included species were used for this analysis (the number of sequences is in parentheses). 1: MW291630 (1); 2: *N. jordani* (25); 3: *N. oligodontis* (7); 4: *N. reganius* (1); 5: *Neosalanx* sp. (1); 6: *N. taihuensis* (70); 7: *N. argentea* (2); and 8: *N. anderssoni* (10). For other comments, see Table 1 and Figure 2.

mitogenome and the other *N. taihuensis* (with synonyms) mitogenomes, JX524196, KP170510, and MH348204, available in GenBank.

The *CytB* portion of the *N. taihuensis* MW291630 mitogenome demonstrated very close affinity to the *N. jordani* single-marker sequences obtained from different localities by various authors (25 isolates; Zhang et al., 2007; Zhao et al., 2010; Fu et al., 2012) with low intraspecific variability (0.24 ± 0.05 %; see also Fig. 2). The *p*-distance between the *CytB* gene of the MW291630 mitogenome and the GenBank *CytB* sequences of *N. jordani* was surprisingly low (0.12 ± 0.03 %; Table 2); it fit well into the range of intraspecific variability in fishes (e. g., Kartavtsev et al., 2016; Li et al., 2018). The maximum likelihood tree based on the *COI* gene showed a similar topology (Supplementary Fig. S1).

Three species, *N. oligodontis*, *N. reganius*, and *Neosalanx* sp., demonstrated more pronounced differences from the MW291630 mitogenome than *N. jordani* (Table 2, Fig. 2). Zhang et al. (2007) suggested that *N. reganius* and *N. oligodontis* could be considered as subspecies of *N. jordani*. Indeed, *N. jordani*, *N. oligodontis*, *N. reganius*, *Neosalanx* sp., and the *CytB* portion of the MW291630 mitogenome were all in the same cluster (Fig. 2) with an overall mean *p*-distance of 4.69 ± 0.45 %, which suggested close relationships for these salangid species.

Thus, the single-marker sequences clearly showed that the GenBank accession no. MW291630 represents the mitogenome of *N. jordani* mistaken for *N. taihuensis*. The observed

inconsistency in the level of divergence between the *N. taihuensis* mitogenomes (see above) is due to incorrect species identification. The *CytB* analysis of within- and between lineage variability confirmed the data obtained with complete mitogenomes.

MtDNA data indicates a generic level of divergence between Lineage 1 and Lineage 2

The close relationships between *N. jordani*, *N. oligodontis*, *N. reganius*, and *Neosalanx* sp. had been reported previously, as well as the significant difference of this group from other *Neosalanx* and *Protosalanx* species including *N. taihuensis*, *N. argentea*, *N. anderssoni*, and *P. chinensis* (Fig. 2, Table 2) (Zhang et al., 2007; Guo et al., 2011). Based on integrative data, Zhang et al. (2007) erected the genus “*Microsalanx*” (see Introduction). The results of the present analysis do not contradict this hypothesis. Both the complete mitogenomes (Fig. 1) and the single-marker sequences (Fig. 2) clearly demonstrated two significantly diverged clusters (Lineage 1 and Lineage 2). The interlineage divergence based on the *CytB* gene was high (18.97 ± 1.09 %). It was significantly higher than the average divergences within each of the lineages: the overall mean distances for Lineage 1 and Lineage 2 separately were 9.13 ± 0.66 and 4.69 ± 0.45 %, respectively.

To evaluate the scale of divergence between Lineages 1 and 2, we estimated the average level of divergence based on the *CytB* gene for the salangid genera available in GenBank including *Protosalanx*, *Salanx*, *Leucosoma*, *Neosalangichthys*,

Table 3. Pairwise *p*-distances between salangid genera based on the *CytB* gene

Genus	<i>Protosalanx</i>	<i>Salanx</i>	<i>Leucosoma</i>	<i>Neosalangichthys</i>	<i>Salangichthys</i>
<i>Protosalanx</i>		0.0118	0.0123	0.0124	0.0125
<i>Salanx</i>	0.1876		0.0093	0.0106	0.0108
<i>Leucosoma</i>	0.2068	0.1174		0.0103	0.0113
<i>Neosalangichthys</i>	0.2077	0.1472	0.1411		0.0109
<i>Salangichthys</i>	0.2147	0.1490	0.1648	0.1613	

Note. The salangid genera *Protosalanx*, *Salanx*, *Leucosoma*, *Neosalangichthys*, and *Salangichthys* are represented by the following species: *Protosalanx chinensis* (KP306787), *Salanx ariakensis* (AP006231), *Leucosoma chinensis* (MW131880), *Neosalangichthys ishikawae* (Wakiya, Takahashi, 1913) (DQ191127), and *Salangichthys microdon* (AP004109). For other comments, see Table 1.

and *Salangichthys* (Table 3). The obtained overall mean p -distance was 16.98 ± 0.78 % (with pairwise p -distances varying from 11.74 ± 0.93 % between *Leucosoma* and *Salanx* to 21.47 ± 1.25 % between and *Protosalanx* and *Salangichthys*; Table 3), which was close to the value of divergence between Lineages 1 and 2 (18.97 ± 1.09 %) based on the multiple *CytB* gene sequences (see above). The divergence between Lineages 1 and 2 (18.97 ± 1.09 %) was not markedly different from that between *Protosalanx* and *Salanx* or it was even higher than the p -distances in pairwise comparisons of *Leucosoma* vs. *Salanx*, *Neosalangichthys*, and *Salangichthys*; *Salanx* vs. *Neosalangichthys* and *Salangichthys*; and *Neosalangichthys* vs. *Salangichthys* (Table 3).

Thus, an analysis of the multiple *CytB* sequences encompassing the full diversity of salangid fishes showed a high level of divergence between Lineage 1 and Lineage 2 (18.97 ± 1.09 %), which fit into the range of intergeneric distances reported for salangids (see above) and other fishes (see the references above). Lineage 1 included a group of species (*P. chinensis*, *N. anderssoni*, *N. taihuensis*, and *N. argentea*; Fig. 2) comprising a part of the reorganized genus *Protosalanx* (Fu et al., 2012). The group of species from Lineage 1 was previously divided in two sub-groups (“primitive lineages”) (Zhang et al., 2007; Guo et al., 2011). Indeed, the pairwise p -distances for Lineage 1 varied within a relatively wide range from 3.32 ± 0.52 % between *N. taihuensis* and *N. argentea* to 12.15 ± 0.99 % between *N. taihuensis* and *N. anderssoni* (Table 2). However, the overall mean sub-group divergence (*P. chinensis* + *N. anderssoni* vs. *N. taihuensis* + *N. argentea*) within Lineage 1 was still markedly lower (11.42 ± 0.87 %) than the divergence between Lineages 1 and 2 (18.97 ± 1.09 %). Thus, unlike Zhang et al. (2007) and Guo et al. (2011), we did not find sufficient grounds to split Lineage 1 into two sub-groups and consider it a single evolutionary lineage representing the genus *Protosalanx*. This conclusion was supported by the diagnostic deletions detected within the *ND5* gene and the control region in the salangids’ mitogenomes (see the “Variability and divergence of salangid mitogenomes” section above). Nevertheless, the relationships between the “primitive lineages” *P. chinensis* + *N. anderssoni* and *N. taihuensis* + *N. argentea* need to be further clarified using a more representative array of genetic markers (see below).

Lineage 2 contained a group of species (*N. oligodontis*, *N. reganius*, *N. jordani*, and *Neosalanx* sp.) placed in the genus “*Microsalanx*” by Zhang et al. (2007). This subdivision was reasonable (see Introduction) to distinguish this group of species from the rest of the *Neosalanx* species. However, the transfer of *N. taihuensis* (with synonyms), *N. anderssoni*, and *N. argentea* to the genus *Protosalanx*, as suggested earlier (Zhang et al., 2007; Guo et al., 2011; Fu et al., 2012) and supported by our data (Figs. 1 and 2, Tables 1 and 2), gives reason to abolish the genus name “*Microsalanx*” (at least until the generic heterogeneity is proven for Lineage 1; see above). Consequently, the original genus name *Neosalanx* is appropriate for the salangid species *N. oligodontis*, *N. reganius*, *N. jordani*, and *Neosalanx* sp. comprising Lineage 2 (Figs. 1 and 2).

Thus, in contrast to Fu et al. (2012), our analysis based on complete mitogenomes and mtDNA single-marker sequences,

as well as the analysis of Zhang et al. (2007) based on morphological, ecological, and genetic data, did not support the synonymization of all *Neosalanx* species with *Protosalanx*. The data clearly show two substantially diverged evolutionary lineages (Figs. 1 and 2): (1) *P. chinensis*, *N. anderssoni*, *N. taihuensis* (with synonyms), and *N. argentea* representing the genus *Protosalanx* and (2) *N. oligodontis*, *N. reganius*, *N. jordani*, and *Neosalanx* sp. representing the genus *Neosalanx*.

For phylogenetic analysis of salangid fishes, Fu et al. (2012) used a concatenated multigene dataset including the mitochondrial *CytB* gene and seven nuclear sequences (*28S rRNA*, *RAG1*, *zic1*, *ENC1*, *RNF213*, *glyt*, and *SH3PX3*). As a result (among others), these authors (Fu et al., 2012, p. 853) discovered that “all species from the ‘*Neosalanx*–*Protosalanx*’ complex belong to a same genus” and considered *Neosalanx* as a junior synonym of *Protosalanx*.

Compared to mtDNA markers and complete mitogenomes, the nuclear markers (*28S rRNA*, *RAG1*, *zic1*, *ENC1*, *RNF213*, *glyt*, and *SH3PX3*), mostly used by Fu et al. (2012), demonstrated a much lower divergence between the salangid genera. For the genera *Protosalanx* (except *Neosalanx*), *Salanx*, *Leucosoma*, *Neosalangichthys*, and *Salangichthys*, the values of the overall mean distance for the nuclear markers were low and varied in a narrow range (from 1.98 ± 0.36 % for *zic1* to 3.56 ± 0.54 % for *RAG1*). The low divergence of the nuclear markers can be explained by the fact that they mostly represent highly conserved sequences developed for analyzing deep phylogenetic relationships on a scale of dozens to hundreds of millions of years, e. g., to infer phylogenetic relationships of all bony fishes, which requires analysis of genomic regions with slow rates of evolution (e. g., Betancur-R et al., 2017). These markers might be not sensitive enough for salangid fishes that experienced most speciation events around 1.1–9.9 Ma (Zhang et al., 2007). As a consequence, we suggest that the phylogenetic signal of *CytB*, also used by Fu et al. (2012), was significantly “diluted” by the effect of strongly conserved nuclear sequences. Indeed, the overall mean p -distance between the genera *Protosalanx* (except *Neosalanx*), *Salanx*, *Leucosoma*, *Neosalangichthys*, and *Salangichthys* was equal to 16.98 ± 0.78 % based on the *CytB* gene only (see above). However, it decreased significantly, to 2.72 ± 0.17 %, when the nuclear multigene dataset of Fu et al. (2012) was used.

Although the suggested relationships in salangid fishes seem robust, we expect them to be modified, possibly, as new genetic data become available. In particular, the mitochondrial sequences have revealed a relatively high level of divergence between two sub-groups within the genus *Protosalanx* (*P. chinensis* + *N. anderssoni* and *N. taihuensis* + *N. argentea*; Fig. 2) (see also Zhang et al., 2007; Guo et al., 2011), which may indicate a supra-species taxonomical range. Consequently, more nuclear genome-wide data are necessary to further address this and other issues concerning the taxonomic composition and the evolutionary relationships among salangid fishes.

Conclusion

Misidentified nucleotide sequences, including complete mitogenomes, are becoming increasingly frequent in GenBank, which leads to an explosive spread of incorrect biological information in subsequent scientific publications over time.

The misidentified *N. taihuensis* MW291630 mitogenome has been revealed in our study. We argue that the GenBank accession no. MW291630 actually represents the mitogenome of *N. jordani* mistaken for *N. taihuensis*. Thus, GenBank users should be aware of the above-described entry error to avoid conflicting results in their downstream evolutionary and comparative genomic studies.

The data obtained have raised a new issue regarding intergeneric relationships among salangid fishes. In contrast to the study by Fu et al. (2012), our data from the comparative analyses of interspecific and intergeneric divergences do not support the synonymization of the genus *Neosalanx* with *Protosalanx* and oppose the suggestion to consider *Neosalanx* as a junior synonym of *Protosalanx*. Genome-wide studies are needed to further clarify the evolutionary relationships of salangid fishes.

The introduction and spread of misidentified nucleotide sequences in genetic databases, which compromises downstream applications, is unlikely to be completely curbed. However, some appropriate steps can be undertaken (see, e. g., Balakirev et al., 2017, 2024; Sangster, Luksenburg, 2021b) to minimize their massive accumulation and subsequent propagation in scientific publications, thereby increasing the reliability of findings reported in them.

References

- Altschul S., Gish W., Miller W., Myers E., Lipman D. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215:403-410. doi 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Balakirev E.S. Recombinant mitochondrial genomes reveal recent interspecific hybridization between invasive salangid fishes. *Life.* 2022;5:661. doi 10.3390/life12050661
- Balakirev E.S., Saveliev P.A., Ayala F.J. Complete mitochondrial genomes of the Cherskii's sculpin *Cottus cherskii* and Siberian taimen *Hucho taimen* reveal GenBank entry errors: incorrect species identification and recombinant mitochondrial genome. *Evol Bioinform Online.* 2017;13:1176934317726783. doi 10.1177/1176934317726783
- Balakirev E.S., Kravchenko A.Y., Semenchenko A.A. Genetic evidence for a mixed composition of the genus *Myoxocephalus* (Cottoidei: Cottidae) necessitates generic realignment. *Genes.* 2020;11:1071. doi 10.3390/genes11091071
- Balakirev E.S., Sharina S.N., Balanov A.A. Misidentified mitogenomes of two *Lycodes* species (Perciformes: Zoarcidae) in GenBank. *Russ J Genet.* 2024;60(10):1375-1382. doi 10.1134/S1022795424700911
- Betancur-R R., Wiley E.O., Arratia G., Acero A., Bailly N., Miya M., Lecointre G., Ortí G. Phylogenetic classification of bony fishes. *BMC Evol Biol.* 2017;17:162. doi 10.1186/s12862-017-0958-3
- Botero-Castro F., Delsuc F., Douzery E.J.P. Thrice better than once: quality control guidelines to validate new mitogenomes. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal.* 2016;27(1):449-454. doi 10.3109/19401736.2014.900666
- Cheng J., Ma G.-Q., Song N., Gao T.-X. Complete mitochondrial genome sequence of bighead croaker *Collichthys niveatus* (Perciformes, Sciaenidae): a mitogenomic perspective on the phylogenetic relationships of Pseudosciaenidae. *Gene.* 2012;491(2):210-223. doi 10.1016/j.gene.2011.09.020
- Collins R.A., Boykin L.M., Cruickshank R.H., Armstrong K.F. Barcoding's next top model: an evaluation of nucleotide substitution models for specimen identification. *Methods Ecol Evol.* 2012;3: 457-465. doi 10.1111/j.2041-210x.2011.00176.x
- Cunha R.L., Nicastro K.R., Zardi G.I., Madeira C., McQuaid C.D., Cox C.J., Castilho R. Comparative mitogenomic analyses and gene rearrangements reject the alleged polyphyly of a bivalve genus. *PeerJ.* 2022;10:e13953. doi 10.7717/peerj.13953
- Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:1792-1797. doi 10.1093/nar/gkh340
- Fu C., Luo J., Wu J., López J.A., Zhong Y., Lei G., Chen J. Phylogenetic relationships of salangid fishes (Osmeridae, Salanginae) with comments on phylogenetic placement of the salangids based on mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol.* 2005;35:76-84. doi 10.1016/j.ympev.2004.11.024
- Fu C., Guo L., Xia R., Li J., Lei G. A multilocus phylogeny of Asian noodlefishes Salangidae (Teleostei: Osmeriformes) with a revised classification of the family. *Mol Phylogenet Evol.* 2012;62(3):848-855. doi 10.1016/j.ympev.2011.11.031
- Giribet G., Wheeler W.C. On gaps. *Mol Phylogenet Evol.* 1999;13(1): 132-143. doi 10.1006/mpev.1999.0643
- Guo L., Li J., Wang Z., Fu C. Phylogenetic relationships of noodlefishes (Osmeriformes: Salangidae) based on four mitochondrial genes. *Acta Hydrobiol.* 2011;35:449-459. doi 10.3724/SP.J.1035.2011.00449
- Hoang D.T., Chernomor O., von Haeseler A., Minh B.Q., Vinh L.S. UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol Biol Evol.* 2018;35:518-522. doi 10.1093/molbev/msx281
- Hofstetter V., Buyck B., Eyssartier G., Schnee S., Gindro K. The unbearable lightness of sequenced-based identification. *Fungal Divers.* 2019;96:243-284. doi 10.1007/s13225-019-00428-3
- Houbraken J., Visagie C.M., Frisvad J.C. Recommendations to prevent taxonomic misidentification of genome-sequenced fungal strains. *Microbiol Resour Ann.* 2021;10:e01074-20. doi 10.1128/MRA.01074-20
- Kartavtsev Y.P. Sequence divergence at mitochondrial genes in animals: applicability of DNA data in genetics of speciation and molecular phylogenetics. *Mar Genomics.* 2011;4(2):71-81. doi 10.1016/j.margen.2011.02.002
- Kartavtsev Y.P., Rozhkovan K.V., Masalkova N.A. Phylogeny based on two mtDNA genes (*Co-I*, *Cyt-B*) among sculpins (Scorpaeniformes, Cottidae) and some other scorpionfish in the Russian Far East. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal.* 2016;27(3):2225-2240. doi 10.3109/19401736.2014.984164
- Kim D.E., Kim P., Lee H., Kim N.H., Kim D., Lee M.J., Ban Y.G., Jang B., Park J. Comprehensive analysis of the complete mitochondrial genome of *Melanoplus differentialis* (Acrididae: Melanoplinae) captured in Korea. *Entomol Res.* 2023;53:66-81. doi 10.1111/1748-5967.12633
- Li X., Shen X., Chen X., Xiang D., Murphy R.W., Shen Y. Detection of potential problematic *Cytb* gene sequences of fishes in GenBank. *Front Genet.* 2018;9:30. doi 10.3389/fgene.2018.00030
- Mohamed W.M.A., Moustafa M.A.M., Kelava S., Barker D., Matsuno K., Nonaka N., Shao R., Mans B.J., Barker S.C., Nakao R. Reconstruction of mitochondrial genomes from raw sequencing data provides insights on the phylogeny of *Ixodes* ticks and cautions for species misidentification. *Ticks Tick Borne Dis.* 2022;13(1):101832. doi 10.1016/j.ttbdis.2021.101832
- Mulder K.P., Lourenço A., Carneiro M., Velo-Antón G. The complete mitochondrial genome of *Salamandra salamandra* (Amphibia: Urodela: Salamandridae). *Mitochondrial DNA Part B.* 2016;1:880-882. doi 10.1080/23802359.2016.1253042
- Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol.* 2015;32:268-274. doi 10.1093/molbev/msu300
- Nielsen M.K., Wang J., Davis R., Bellaw J.L., Lyons E.T., Lear T.L., Goday C. *Parasaris univalens* – a victim of large-scale misidentification? *Parasitol Res.* 2014;113:4485-4490. doi 10.1007/s00436-014-4135-y
- Nilsson R.H., Ryberg M., Kristiansson E., Abarenkov K., Larsson K.H., Koljalg U. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. *PLoS One.* 2006;1(1):e59. doi 10.1371/journal.pone.0000059
- Oleinik A.G., Skurikhina L.A., Kuchlevsky A.D. Clarification of taxonomic assignment of smelt complete mitochondrial genome:

- GenBank accession number KP281293.1 (NC_026566.1). *Mitochondrial DNA Part B*. 2019;4:1696-1697. doi 10.1080/23802359.2019.1607578
- Ožana S., Dolný A., Pánek T. Nuclear copies of mitochondrial DNA as a potential problem for phylogenetic and population genetic studies of Odonata. *Syst Entomol*. 2022;47:591-602. doi 10.1111/syen.12550
- Roberts T.R. Skeletal anatomy and classification of the neotenic Asian Salmoniform superfamily Salangoidea (icefishes or noodlefishes). *Proc Calif Acad Sci*. 1984;43:179-220
- Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J.C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S.E., Sánchez-Gracia A. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism analysis of large datasets. *Mol Biol Evol*. 2017;34:3299-3302. doi 10.1093/molbev/msx248
- Salvi D., Berrilli E., Garzia M., Mariottini P. Yet another mitochondrial genome of the Pacific cupped oyster: the published mitogenome of *Alectryonella plicatula* (Ostreinae) is based on a misidentified *Magallana gigas* (Crassostreinae). *Front Mar Sci*. 2021;8:741455. doi 10.3389/fmars.2021.741455
- Sangster G., Luksenburg J.A. The published complete mitochondrial genome of the milk shark (*Rhizoprionodon acutus*) is a misidentified Pacific spadenose shark (*Scoliodon macrorhynchus*) (Chondrichthyes: Carcharhiniformes). *Mitochondrial DNA Part B*. 2021a;6:828-830. doi 10.1080/23802359.2021.1884019
- Sangster G., Luksenburg J.A. Sharp increase of problematic mitogenomes of birds: causes, consequences, and remedies. *Genome Biol Evol*. 2021b;13:evab210. doi 10.1093/gbe/evab210
- Sayers E.W., Cavanaugh M., Clark K., Pruitt K.D., Sherry S.T., Yankie L., Karsch-Mizrachi I. GenBank 2023 update. *Nucleic Acids Res*. 2023;51:D141-D144. doi 10.1093/nar/gkac1012
- Simonov E., Lisachov A., Oreshkova N., Krutovsky K.V. The mitogenome of *Elaphe bimaculata* (Reptilia: Colubridae) has never been published: a case with the complete mitochondrial genome of *E. dione*. *Acta Herpetol*. 2018;13:185-189. doi 10.13128/Acta_Herpetol-23394
- Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Mol Biol Evol*. 2021;38:3022-3027. doi 10.1093/molbev/msab120
- Teske P.R. Mitochondrial genome announcements need to consider existing short sequences from closely related species to prevent taxonomic errors. *Conserv Genet Resour*. 2021;13:359-365. doi 10.1007/s12686-021-01214-7
- The National Center for Biotechnology Information. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed on July 29, 2024)
- Yang Y., Sui Z., Liu K., Liu Y. The complete mitochondrial DNA sequence of Linyi small icefish (*Neosalanx taihuensis*). GenBank submission: 24-NOV-2020. Genbank accession number: MW291630
- Zhang J., Li M., Xu M., Takita T., Wei F. Molecular phylogeny of icefish Salangidae based on complete mtDNA *cytochrome b* sequences, with comments on estuarine fish evolution. *Biol J Linn Soc*. 2007;91:325-340. doi 10.1111/j.1095-8312.2007.00785.x
- Zhao L., Zhang J., Liu Z., Funk S.M., Wei F., Xu M., Li M. Complex population genetic and demographic history of the Salangid, *Neosalanx taihuensis*, based on cytochrome *b* sequences. *BMC Evol Biol*. 2008;8:201. doi 10.1186/1471-2148-8-201
- Zhao L., Zhang J., Liu Z., Xu M., Li M. Population genetic structure and demographic history of *Neosalanx jordani* based on cytochrome *b* sequences. *Biodiv Sci*. 2010;18(3):251-261. doi 10.3724/SP.J.1003.2010.251

Conflict of interest. The author declares no conflicts of interest.

Received June 9, 2024. Revised August 29, 2024. Accepted October 25, 2024.

doi 10.18699/vjgb-25-30

Таксономическое разнообразие микробных сообществ холодного сероводородного источника Безымянный (Прибайкальский район, Республика Бурятия)

Т.Г. Банзаракцаева , Е.В. Лаврентьева ^{1,2}, В.Б. Дамбаев¹, И.Д. Ульзетуева³, В.В. Хахинов²¹ Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Улан-Удэ, Россия² Бурятский государственный университет им. Доржи Банзарова, Улан-Удэ, Россия³ Байкальский институт природопользования Сибирского отделения Российской академии наук, Улан-Удэ, Россия tuyana_banz@mail.ru

Аннотация. Экологические условия холодных серосодержащих источников благоприятствуют росту и развитию богатых микробных сообществ со множеством уникальных бактерий цикла серы. В настоящей работе с использованием высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК было изучено таксономическое разнообразие микробных сообществ трех различных биотопов (микробный мат, донный осадок и вода) в холодном сероводородном источнике Безымянный, расположенном на побережье озера Байкал (Прибайкальский район, Республика Бурятия). В результате секвенирования проб микробного мата, донного осадка и воды получено 76 972 последовательности, отнесенных к 1714 ASV (amplicon sequence variant – варианты последовательностей ампликонов). Анализ распределения ASV по биотопам выявил высокий показатель (66–93 %) уникальности трех исследуемых сообществ. Оценка индекса альфа-разнообразия показала, что сообщество донного осадка имело более высокие индексы, сообщество микробного мата отличалось наименьшим разнообразием. В исследуемых сообществах в разных пропорциях доминировали бактерии филумов Pseudomonadota, Bacteroidota, Campylobacterota, Actinomycetota, Desulfobacterota. Установлены особенности структуры сообществ исследуемых биотопов. Сообщество микробного мата было представлено преимущественно бактериями рода *Thiothrix* (43.2 %). В сообществе донного осадка основу составляли бактерии рода *Sulfurovum* (11.2 %), содоминировали неклассифицируемые таксоны (3.2–1 %). Микробное сообщество воды характеризовалось присутствием последовательностей, обнаруженных только в воде. Данные последовательности были отнесены к родам *Novosphingobium*, *Nocardioides*, *Legionella*, *Brevundimonas*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Sphingopyxis*, *Bradyrhizobium* и *Thiomicrothabodus*. Во всех изучаемых сообществах были идентифицированы сероокисляющие бактерии (SOB) и серовосстанавливающие бактерии (SRB), что свидетельствует о протекающих процессах цикла серы в экосистеме источника Безымянный. Необходимо отметить, что во всех сообществах присутствовали последовательности неклассифицированных и некультивируемых бактерий цикла серы, и в целом значительную долю последовательностей (20.3–53.9 %) не удалось классифицировать.

Ключевые слова: холодный сероводородный источник; разнообразие микробных сообществ; микробный мат; донный осадок; вода; сероокисляющие бактерии; сульфатвосстанавливающие бактерии

Для цитирования: Банзаракцаева Т.Г., Лаврентьева Е.В., Дамбаев В.Б., Ульзетуева И.Д., Хахинов В.В. Таксономическое разнообразие микробных сообществ холодного сероводородного источника Безымянный (Прибайкальский район, Республика Бурятия). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(2):268-278. doi 10.18699/vjgb-25-30

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, № 23-27-00131.

Taxonomic diversity of microbial communities in the cold sulfur spring Bezmyanny (Pribaikalsky district, Republic of Buryatia)

Т.Г. Банзаракцаева , Е.В. Лаврентьева ^{1,2}, В.Б. Дамбаев¹, И.Д. Ульзетуева³, В.В. Хахинов²¹ Institute of General and Experimental Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, Russia² D. Banzarov Buryat State University, Ulan-Ude, Russia³ Baikal Institute of Nature Management of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, Russia tuyana_banz@mail.ru

Abstract. The environmental conditions of cold sulfur springs favor the growth and development of abundant and diverse microbial communities with many unique sulfur cycle bacteria. In this work, the taxonomic diversity of microbial communities of three different biotopes (microbial mat, bottom sediment, and water) in the cold sulfur spring Bezmyanny located on the shore of Lake Baikal (Pribaikalsky district, Republic of Buryatia) was studied using high-throughput sequencing of the 16S rRNA gene. By sequencing the microbial mat, bottom sediment, and water samples, 76,972 sequences assigned to 1,714 ASVs (ASV, amplicon sequence variant) were obtained. Analysis of the ASV distribu-

tion by biotopes revealed a high percentage (66–93 %) of uniqueness in the three communities studied. An estimate of the alpha diversity index showed that bottom sediment community had higher indices, while microbial mat community was characterized by a lowest diversity. Bacteria of the phyla Pseudomonadota, Bacteroidota, Campylobacterota, Actinomycetota, Desulfobacterota dominated in different proportions in the studied communities. The features of the community structure of the studied biotopes were established. The microbial mat community was represented mainly by *Thiothrix* (43.2 %). The bottom sediment community was based on *Sulfurovum* (11.2 %) and co-dominated by unclassified taxa (3.2–1 %). Sequences assigned to the genera *Novosphingobium*, *Nocardioidea*, *Legionella*, *Brevundimonas*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Sphingopyxis*, *Bradyrhizobium* and *Thiomicrothrix* were found only in the water microbial community. Sulfur-oxidizing bacteria (SOB) and sulfate-reducing bacteria (SRB) were identified in all the communities studied, which indicates the ongoing processes of the sulfur cycle in the Bezymyanny spring ecosystem. It should be noted that sequences of unclassified and uncultivated sulfur cycle bacteria were present in all communities and a significant proportion of sequences (20.3–53.9 %) were not classified.

Key words: cold sulfur spring; microbial community diversity; microbial mat; bottom sediment; water; sulfur-oxidizing bacteria; sulfate-reducing bacteria

For citation: Banzaraksaeva T.G., Lavrentyeva E.V., Dambaev V.B., Ulzetueva I.D., Khakhinov V.V. Taxonomic diversity of microbial communities in the cold sulfur spring Bezymyanny (Pribaikalsky district, Republic of Buryatia). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(2):268-278. doi 10.18699/vjgb-25-30

Введение

Байкальский регион – это обширная область природных водных объектов, среди которых значительная часть представлена многочисленными выходами минеральных источников. На территории Бурятии имеются практически все известные типы минеральных вод, формирующихся в зоне гипергенеза горных пород (Борисенко, Замана, 1978; Намсараев и др., 2005). В том числе присутствуют сероводородные источники, обогащенные сероводородом в результате биохимического восстановления сульфатов, которые поступают с минеральной водой или минеральной взвесью, содержащей сульфаты в обменном и связанном состоянии (Борисенко, Замана, 1978; Кононов, 1983).

Экологические условия холодных серосодержащих источников благоприятствуют росту и развитию богатых микробных сообществ со множеством уникальных бактерий цикла серы (Douglas S., Douglas D., 2001; Rudolph et al., 2004; Chaudhary et al., 2009; Headd, Engel, 2014; Hahn et al., 2022). Холодные источники характеризуются медленно изменяющимися параметрами, такими как pH, температура, растворенные газы и другие факторы, и являются более стабильными местообитаниями для жизни бактерий по сравнению с другими средами (Nosalova et al., 2023c).

Ранее проведенные исследования в холодных серных источниках с использованием культивируемых и некультивируемых подходов в основном были сфокусированы на составе и структуре сообществ микробных матов (Douglas S., Douglas D., 2001; Chaudhary et al., 2009; Klatt et al., 2016; Sapers et al., 2017; Nosalova et al., 2023b). Исследование с помощью микроскопии в микробных матах холодного серного источника Анкастер (Онтарио, Канада) показало развитие всех основных групп сульфидоксилирующих бактерий, пурпурных, зеленых, цианобактерий и бесцветных сероокисляющих бактерий (Douglas S., Douglas D., 2001). В микробных матах холодных серных источников Словакии с помощью секвенирования гена 16S рРНК было отмечено явное доминирование типов Pseudomonadota и Campylobacterota, а роды *Thiothrix* и *Sulfurovum* были идентифицированы как основная микробиота микробных матов (Nosalova et al., 2023b).

В настоящей работе впервые с использованием высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК изуче-

но таксономическое разнообразие микробных сообществ микробного мата, донного осадка и воды в холодном сероводородном источнике Безымянный, расположенном на побережье оз. Байкал. Цель исследования – установить бактериальный состав микробных сообществ в различных биотопах источника Безымянный (Прибайкальский район, Республика Бурятия).

Материалы и методы

Сероводородный источник Безымянный находится в лесном массиве на побережье оз. Байкал и расположен на высоте 638 м над уровнем моря (53°02'48.95" с. ш., 108°19'57.68" в. д.) (рис. 1). Естественный выход минерального источника просачивается через 25–30-сантиметровую толщу рыхлых донных осадков и образует ручей. В ручье на поверхности донных осадков обнаружены микробные маты.

Пробы микробного мата, донного осадка и воды были взяты в октябре 2023 г. Пробы воды для химического анализа исследуемых объектов отбирали из выхода минерального источника и вытекающего ручья, в чистые полиэтиленовые и стерильные стеклянные бутылки. Образцы микробного мата, донного осадка и воды для микробиологических исследований были отобраны в стерильные 50 мл пробирки Falcon.

В местах взятия пробы измеряли pH и температуру с помощью портативного pH-метра с сенсорным термометром pH-200 HM Digital (Южная Корея). Общую минерализацию измеряли кондуктомером COM-100. Для определения окислительно-восстановительного потенциала использовали портативный измеритель redox-потенциала ORP (Португалия). Концентрацию карбонатов, гидрокарбонатов в анализируемых водах определяли в полевых условиях в момент отбора проб титрованием 0.1 N HCl в присутствии индикаторов – фенолфталеина и метилового оранжевого. Общую жесткость, содержание ионов кальция и магния, хлорид-ионов определяли титриметрическим методом, концентрация ионов аммония, нитрит-, нитрат-, фосфат-, сульфат- и фторид-ионов, кремниевой кислоты – спектрофотометрическим методом. Для анализа использовали однолучевой спектрофотометр CECIL 1000 (Великобритания), концентрация ионов рассчитывали



Рис. 1. Карта-схема расположения источника Безымянный (а), фото источника (б) и фото микробного мата в источнике (в).

по уравнениям регрессии. Содержание сероводорода и сульфидов определяли калориметрическим методом с добавлением железо-аммонийных квасцов при 670 нм, сульфитов и тиосульфатов – путем обратного йодометрического титрования (Фомин, 2000).

Для выделения ДНК из образцов микробного мата, донных осадков и воды применяли набор реагентов (MACHEREY-NAGEL NucleoSpin Soil) фирмы MACHEREY-NAGEL (Дюрен, Германия) в соответствии с инструкциями производителя.

Очищенные препараты ДНК были использованы для создания библиотек фрагментов гена 16S рРНК методом ПЦР с помощью универсальных праймеров для вариабельной области V4: F515/R806 (GTGCCAGCMGCCGG CGGTAA/GGACTACVSGGGTATCTAAT) (Bates et al., 2011), с прикрепленными адаптерами и уникальными штрих-кодами Illumina. ПЦР проводили в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 0.5–1 единицу активности высокоточной ДНК-полимеразы Q5 (NEB, Ипсвич, Массачусетс, США), по 5 пкМ прямого и обратного праймеров, 10 нг ДНК-матрицы и 2 нМ каждого dNTP (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США). Смесь денатуриро-

вали при 94 °С в течение 1 мин, затем провели 35 циклов: 94 °С в течение 30 с, 50 °С – 30 с, 72 °С – 30 с. Окончательное удлинение осуществляли при 72 °С в течение 3 мин. Продукты ПЦР очищали в соответствии с методом, рекомендованным Illumina, с магнитными частицами AMPureXP (BeckmanCoulter, Бреа, Калифорния, США).

Подготовку библиотеки и секвенирование выполняли согласно рекомендациям производителя по эксплуатации прибора Illumina MiSeq (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США), с использованием MiSeq® ReagentKit v3 (600 циклов). Первоначальную обработку данных, а именно демультиплексирование образцов и удаление адаптеров, проводили с программным обеспечением Illumina (Illumina, США). Для последующего шумоподавления, объединения последовательностей, удаления химерных прочтений, восстановления исходных флотипов (ASV, amplicon sequence variant) и дальнейшей таксономической классификации полученных ASV применяли программные пакеты DADA2 (Callahan et al., 2016), PHYLOSEQ (McMurdie, Holmes, 2013) и SILVA (Quast et al., 2013); работа проводилась в программной среде R. Предварительную фильтрацию сырых последовательностей по качеству

выполняли с помощью функции `filterAndTrim` с длиной обрезки последовательности 250 и 200 н для прямого и обратного прочтения соответственно и допустимым уровнем ожидаемой ошибки 2 и 3. Для построения модели ошибок использовалась функция `learnErrors` с параметром `MAX_CONSIST`, равным 20. Процесс дупликации осуществлялся с помощью функции `derepFastq` с параметром `n`, равным 10^7 . Непосредственно деноизинг производился с применением функции `dada` параметром `pool`, равным 'pseudo'. Объединение восстановленных последовательностей осуществляли с функцией `mergePairs`. Таблица численностей полученных филотипов построена с использованием функции `makeSequenceTable`. Проверка на наличие химер и их фильтрация производилась с помощью функции `removeBimeraDenovo` методом 'consensus' и со следующими параметрами: `minFoldParentOverAbundance`, равным 2, и `allowOneOff`, установленным на значение 'TRUE'. Для построения OTU table применяли функцию `otu_table` с параметром `taxa_are_rows`, установленным на 'FALSE'. Файл с репрезентативами для каждого филотипа был сгенерирован с помощью функций `getSequences`, `DNAStringSet` и `writeXStringSet`.

Классификация полученных филотипов производилась с помощью функции `assignTaxonomy` с использованием базы данных SILVA релиз 128 и параметром `minBoot`, установленным на значение 70. Из списка филотипов были удалены фрагменты, относящиеся к ДНК пластид и митохондрий. Построение BIOM таблицы производилось на языке программирования python 3 (пакеты `biom`, `nupru` и `pandas`). Для представления данных таксономического анализа использовались инструменты программного пакета QIIME 1 (Caporaso et al., 2010). Исследование выполнено в ЦКП ГТПиКБ ФГБНУ ВНИИСХМ (Санкт-Петербург, Россия).

Для поиска ближайших гомологов был использован сервер NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Индексы альфа-разнообразия рассчитаны в программе Past 4.16 (Hammer et al., 2001). Построение кривых разрежения проводили в онлайн-ресурсе iNEXT Online (<https://chao.shinyapps.io/iNEXTOnline/>) (Chao et al., 2014, 2016). Диаграмма Венна и тепловая карта построены при помощи онлайн-ресурса SRplot с пакетом `rheatmap` R, где для нормализации данных был применен подход стандартного масштабирования (https://www.bioinformatics.com.cn/plot_basic_cluster_heatmap_plot_024_en) (Tang et al., 2023).

Результаты

Физико-химическая характеристика источника Безымянный

На момент отбора проб температура воды составляла 5.7 °С, значение pH – 8.4, минерализация – 0.12 г/дм³, окислительно-восстановительный потенциал был равен –113 мВ. Гидрохимический анализ состава воды показал содержание ионов гидрокарбоната и хлорида 30.5 и 3.5 мг/дм³ соответственно. Катионы кальция найдены в количестве 36.6 мг/дм³, магния – 15.6 мг/дм³. Определены ионы нитрата и нитрита – 4.7 и 0.01 мг/дм³, а также фосфат- и фторид-ионы – 0.35 и 0.32 мг/дм³ соответственно. Ионы карбоната и аммония не обнаружены,



Рис. 2. Диаграмма Венна ASV бактериальных сообществ микробного мата, донного осадка и воды источника Безымянный.

ионы железа присутствовали в количестве 0.14 мг/дм³. Из серосодержащих соединений были определены сульфат-ионы (42.0 мг/дм³), ионы сульфида (11.0 мг/дм³), а также выявлены небольшие количества ионов сульфита и тиосульфата.

Анализ разнообразия микробных сообществ различных биотопов

Пиросеквенирование фрагмента гена 16S рРНК из образцов микробного мата, донного осадка и воды дало в общей сложности 143 192 прочтения последовательностей. После их фильтрации, выравнивания, предварительной кластеризации и удаления химерных последовательностей и синглтонов в анализ было включено 76972 прочтения. Последовательности были отнесены к 1714 ASV, и их распределение в трех биотопах исследуемого источника показано на диаграмме Венна (рис. 2). Для всех трех биотопов общим был только 21 ASV. Большая часть микробных сообществ исследуемых биотопов источника представлена уникальными последовательностями.

Оценка индексов альфа-разнообразия показала, что микробиота донного осадка характеризовалась наибольшим количеством ASV, наибольшим разнообразием и на 93 % состояла из уникальных ASV (табл. 1).

Кривые разрежения (рис. 3) продемонстрировали результаты, аналогичные приведенным в табл. 1.

Состав бактериального сообщества

Микробные сообщества микробного мата, донного осадка и воды исследуемого сероводородного источника Безымянный представлены доменом Bacteria. К домену Archaea были отнесены единичные последовательности. В каждом сообществе преобладали бактерии филума Pseudomonadota (12.9–53.8 % от всех полученных последовательностей) (рис. 4).

Таблица 1. Количество последовательностей и ASV в образцах источника Безымянный и индексы альфа-разнообразия исследованных образцов

Образец	Количество сырых последовательностей	Количество прочтений в анализе	Количество ASV	Уникальные ASV, %	Simpson	Shannon	Chao 1
Микробный мат	48 694	20 324	167	66	0.8175	3.159	167.2
Донный осадок	45 061	27 011	975	93	0.9857	5.897	975
Вода	49 437	29 637	675	89	0.9892	5.354	675.1

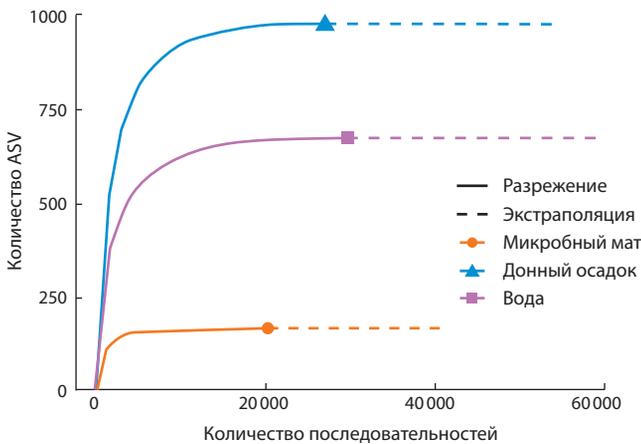


Рис. 3. Кривые разрежения ASV в исследуемых образцах микробного мата, донного осадка и воды.

В филуме Pseudomonadota доминировали Gammaproteobacteria (52 % в микробном мате, 29.4 % в воде и 11.9 % в донном осадке). Количество Alphaproteobacteria варьировало от 0.9 % в донном осадке до 23.4 % в воде. Во всех исследуемых сообществах обнаружена относительно большая доля последовательностей, принадлежащих филуму Bacteroidota (2.3–9.8 %). В сообществах микробного мата и донного осадка были широко распро-

странены последовательности, относящиеся к филуму Campylobacterota, 8.5 и 11.8 % соответственно. Для сообщества воды было характерно присутствие большого количества представителей Actinomycetota (10.1 %) и Bacillota (2.2 %). Сообщество матов отличалось высокой долей Verrucomicrobiota (3.8 %) и Cyanobacterota (2.6 %). В сообществе донного осадка было отмечено высокое содержание Desulfobacterota (6.3 %) и Chloroflexota (2.9 %). Также необходимо отметить, что во всех сообществах от 0.9 до 6 % последовательностей были идентифицированы до уровня домена и значительная доля последовательностей (20.3–53.9 %) не была классифицирована вообще.

Анализ таксономического состава на более глубоком уровне показал, что во всех исследуемых микробных сообществах были отмечены представители родов *Sulfuricurvum*, *Sulfurovum*, *Thiothrix*, *Flavobacterium* и неклассифицированные последовательности: unclassified_Coetmonadaceae, unclassified_Burkholderiales, unclassified_Gammaproteobacteria. Однако их присутствие в разных сообществах менялось от явного доминирования до ≤0.1 % представленности. Установлено, что каждое исследуемое сообщество имело свои особенности на рассматриваемом уровне (рис. 5).

Сообщество микробного мата было представлено в основном бактериями рода *Thiothrix* (43.2 %). Также в состав сообщества мата входили бактерии рода *Flavobacterium*,

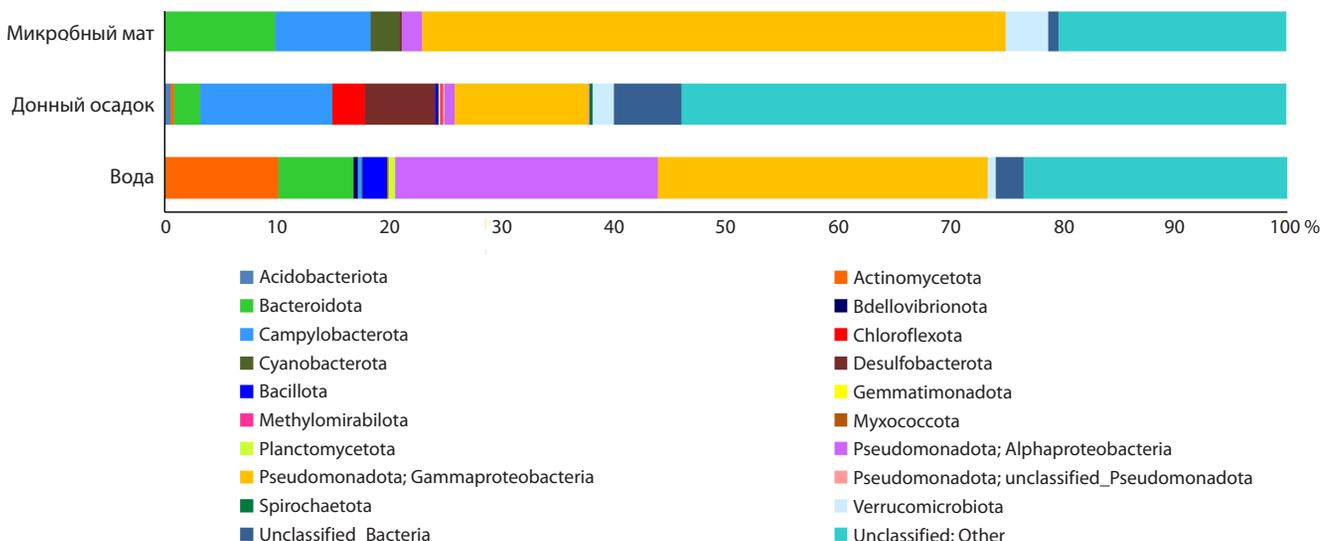


Рис. 4. Таксономическое разнообразие прокариот на уровне филума (классы для Pseudomonadota) в микробном мате, донном осадке и воде источника Безымянный.

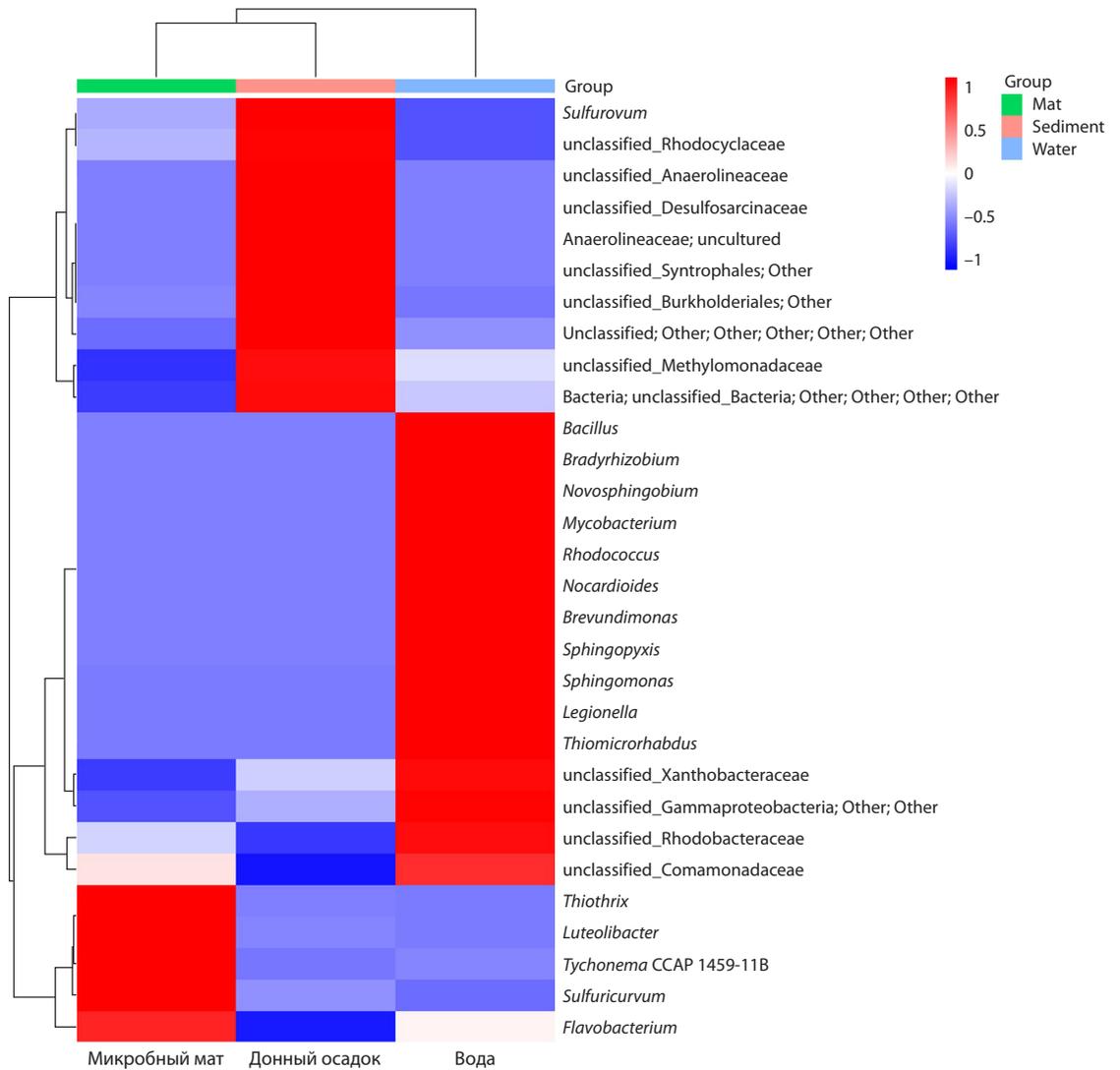


Рис. 5. Тепловая карта таксонов (количество прочтений ≥ 1 %) в микробном мате, донном осадке и воде источника Безымянный.

Цветовая шкала отражает расстояние каждого значения от среднего в единицах стандартного отклонения.

Sulfuricurvum, *Luteolibacter* и цианобактерии *Tychonema* CCAP 1459-11B. В сообществе донного осадка основу составляли бактерии рода *Sulfurovum* (11.2 %) и содоминировали представители таксонов unclassified_Burkholderiales, unclassified_Anaerolineaceae, unclassified_Desulfosarcinaceae, unclassified_Rhodocyclaceae, unclassified_Methylomonadaceae, unclassified_Syntrophales (3.2–1 %). В сообществе воды среди доминантов (>1 % от всех полученных последовательностей) присутствовали последовательности, характерные только для этого сообщества и отнесенные к родам *Novosphingobium*, *Nocardioides*, *Legionella*, *Brevundimonas*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Sphingopyxis*, *Bradyrhizobium* и *Thiomicrothrix*.

Бактерии цикла серы

В таксономическом составе источника Безымянный обнаружены микроорганизмы, участвующие в цикле серы. Среди изученных биотопов большинство полученных

последовательностей составляли роды *Thiothrix* и *Sulfurovum*. Ключевым таксоном в микробном мате был род *Thiothrix* семейства Thiotrichaceae, класса Gammaproteobacteria, его доля составила 43.2 %. В таксономическом составе сообщества донного осадка значительная роль принадлежала роду *Sulfurovum* семейства Sulfurovaceae, класса Campylobacteria, количество обнаруженных последовательностей достигало 11.2 % (табл. 2).

Выявленные сульфатредуцирующие бактерии принадлежат в основном некультивируемым и неклассифицированным unclassified_Desulfosarcinaceae (сем. *Desulfosarcinaceae*), их количество в донных осадках достигает 1.7 %. Другие представители сульфатредуцирующих бактерий составляют <1 % в донном осадке и микробном мате и отнесены к родам *Desulfobulbus*, *Desulfomonile*, *Desulfocapsa*, *Desulfatiglans* (сем. Desulfatiglandaceae) и неклассифицированным unclassified_Syntrophobacteraceae, (*Desulfobacterium*) catecholicum group (сем. Desulfobacteraceae).

Таблица 2. Сравнительная характеристика представленности бактерий серного цикла в микробных сообществах биотопов источника Безымянный (число последовательностей, в %)

Филотип	Микробный мат	Донный осадок	Вода
Сульфатвосстанавливающие бактерии			
<i>Desulfobulbus</i> (сем. Desulfobulbaceae)	0.0	0.1	0.0
<i>Desulfomonile</i> (сем. Syntrophaceae)	0.0	0.4	0.0
unclassified_Syntrophobacteraceae (сем. Syntrophobacteraceae)	0.0	0.1	0.0
(<i>Desulfobacterium</i>) catecholicum group (сем. Desulfobacteraceae)	0.0	0.2	0.0
<i>Desulfocapsa</i> (сем. Desulfobulbaceae)	0.2	0.1	0.0
<i>Desulfatiglans</i> (сем. Desulfatiglandaceae)	0.0	0.4	0.0
SEEP-SRB1 (сем. Desulfosarcinaceae)	0.0	0.1	0.0
unclassified_Desulfosarcinaceae (сем. Desulfosarcinaceae)	0.0	1.7	0.0
uncultured (сем. Desulfosarcinaceae)	0.0	0.2	0.0
unclassified_Desulfobacterales; Other	0.0	0.4	0.0
unclassified_Desulfobacteria; Other; Other	0.0	0.4	0.0
unclassified_Desulfobulbaceae (сем. Desulfobulbaceae)	0.1	0.0	0.0
unclassified_Desulfocapsaceae (сем. Desulfocapsaceae)	0.0	0.7	0.0
unclassified_Desulfobacterales	0.0	0.4	0.0
Сероокисляющие бактерии			
<i>Thiothrix</i> (сем. Thiotrichaceae, Gammaproteobacteria)	43.2	1.1	0.1
<i>Bradyrhizobium</i> (сем. Xanthobacteraceae; Alphaproteobacteria)	0.0	0.0	1.3
<i>Sulfurovum</i> (сем. Sulfurovaceae, Campylobacterota)	2.4	11.2	0.1

Обсуждение

Территория Республики Бурятия чрезвычайно богата минеральными водами с различными физическими свойствами, химическим и газовым составом (Михайлов, Толстихин, 1946; Ткачук и др., 1957; Намсараев и др., 2005). Холодные минеральные источники формируются как в результате взаимодействия воды с вмещающими горными породами, так и вследствие поступления отдельных составных частей из глубинных зон земли. Исследуемый нами сероводородный источник Безымянный характеризуется постоянно низкой температурой с восстановленными условиями. Вода слабощелочная и слабоминерализованная, с преобладанием ионов гидрокарбоната, сульфата и сульфида.

Впервые проведенные исследования микробного мата, донных осадков и воды с помощью секвенирования гена 16S рРНК в холодном сероводородном источнике Безымянный выявили 15 бактериальных филумов, пять из которых были наиболее многочисленными: Pseudomonadota, Bacteroidota, Campylobacterota, Actinomycetota, Desulfobacterota. Pseudomonadota, представленные классом Gammaproteobacteria, и Bacteroidota доминировали во всех образцах, что согласуется с более ранними сведениями о сообществах различных типов серных местообитаний (Elshahed et al., 2003; Gulecal-Pektas, Temel, 2016; Nosalova et al., 2023a). Хемолитотрофные Gammaproteobacteria и Bacteroidota играют основную роль в образовании первичной продукции путем окисления железа и сульфидов в неактивных сульфидных экосистемах (Dong et al., 2021). Тип Campylobacterota присутствовал во всех образ-

цах и доминировал в сообществах донного осадка (11.8 %) и микробного мата (8.5 %). Аналогичные результаты были получены при исследовании сообществ в гидротермальных источниках и афотических (пещерных) сульфидных источниках. В этих экосистемах хемолитотрофия на основе серы в основном осуществляется Campylobacterota (ранее известны как Epsilonproteobacteria) (Karl et al., 1980; Sarbu et al., 1996; Engel et al., 2003, 2004).

Отличительной особенностью сообщества воды источника Безымянный было значительное присутствие представителей Actinomycetota. Известно, что некоторые новые актинобактерии из геотермальных сред способны расти автотрофно с серой в качестве источника энергии (Norris et al., 2011). Использование культивируемого подхода позволило выделить из холодных, с высоким содержанием сульфида и сульфата источников Гипсум-Хилл (Арктика, Канада) сероокисляющие бактерии, филогенетически связанные с Actinomycetota (Perreault et al., 2008). В донном осадке источника Безымянный значительный вклад в сообщество внесли представители Desulfobacterota (6.3 %). Обилие сульфатредуцирующих бактерий, принадлежащих Desulfobacterota, было описано в ряде публикаций о микробиоте холодных соленых источников Канадской Арктики и также обнаружено в высокосульфидном ветlande Солодовка (Самарская область, Россия) (Perreault et al., 2008; Sapets et al., 2017; Colangelo-Lillis et al., 2019; Gorbunov et al., 2022).

Мы уже отмечали, что холодные серные источники содержат уникальные, еще не изученные бактериальные сообщества (Hamilton et al., 2015; Nosalova et al., 2023a).

И в нашем исследовании высокая доля последовательностей осталась неклассифицированной, что предполагает наличие многих неоткрытых и неизученных сообществ и указывает на потенциально новые микроорганизмы в экосистеме холодного сероводородного источника.

Анализ таксономического состава микробных сообществ на уровне родов показал характерные особенности каждого сообщества всех трех исследуемых биотопов. Сообщество микробного мата было представлено преимущественно бактериями рода *Thiothrix* (43.2 %). Анализ последовательности по базе NCBI выявил сходство (100 % гомологии) с *Thiothrix fructosivorans*, которая способна откладывать глобулы серы в инвагинациях цитоплазматической мембраны в присутствии восстановленного неорганического соединения серы (Howarth et al., 1999). В недавнем исследовании по Байкальскому региону был описан некультивируемый *Thiothrix* sp. из зоны смешения вод оз. Байкал и геотермального источника Змеиный (северная котловина оз. Байкал, Россия) (Chernitsyna et al., 2024). Сравнительный анализ полученных нами последовательностей *Thiothrix* и *Thiothrix* из геотермального источника Змеиный выявил 99 % сходство. В состав сообщества мата источника Безымянный входили последовательности, отнесенные к родам *Flavobacterium*, *Sulfuricurvum*, *Luteolibacter*, и цианобактерии *Tychonema* CСAP 1459-11В, ближайшие гомологи которых были выделены в основном из низкотемпературных местообитаний (Kodama, Watanabe, 2004; Jiang et al., 2012; Yang et al., 2019; Conklin et al., 2020).

В сообществе донного осадка основу составляли бактерии рода *Sulfurovum* (11.2 %), ближайшим гомологом (98.81 %) которых являлась мезофильная, факультативно анаэробная серо- и тиосульфат-окисляющая бактерия *Sulfurovum lithotrophicum* (Inagaki et al., 2004). Содоминанты, доля которых варьировала от 1 до 3.2 % от всех последовательностей, были классифицированы только до уровней порядков и семейств. Поиск близкородственных видов в базе NCBI для unclassified_Burkholderiales (3.2 % присутствия) показал 98 % сходство с *Georgfuchsia toluolica* (Pseudomonadota; Betaproteobacteria; Nitrosomonadales; Sterolibacteriaceae), способной использовать Fe(III), Mn(IV) и нитрат в качестве конечных акцепторов электронов для роста на ароматических соединениях (Weelink et al., 2009). Характерные только для донных осадков, unclassified_Anaerolineaceae имели 89 % гомологии с морской термофильной, анаэробной и гетеротрофной бактерией *Thermomarinilinea lacunofontalis* (Nunoura et al., 2013). Ближайшим гомологом (95 % сходство) для unclassified_Desulfosarcinaceae были *Desulfosarcina widdellii*, сульфатредуцирующие бактерии, разлагающие углеводороды (Watanabe et al., 2017).

Среди последовательностей, обнаруженных нами только в сообществе воды, доминировали бактерии родов *Novosphingobium*, *Nocardioides*, *Legionella*, *Brevundimonas*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Sphingopyxis*, *Bradyrhizobium* и *Thiomicrothrix*. Представители этих родов встречаются в различных естественных средах и относятся к гетеротрофным прокариотам, использующим в качестве источника энергии разные соединения углерода, азота и серы (Fliermans, 1996; Kumar R. et al., 2017; Tóth

et al., 2017; Song et al., 2022; Kuang et al., 2023). Известно, что бактерии родов *Novosphingobium*, *Nocardioides*, *Sphingomonas* и *Sphingopyxis* способны развиваться в условиях низкой концентрации питательных веществ и являются важными агентами в биодеградации различных стойких и токсичных органических веществ, включая ароматические соединения, углеводороды, галогеналканы, азотные гетероциклы и полимерные полиэфиры (Song et al., 2022; Ma et al., 2023). В сообществе воды ближайшими гомологами доминирующих последовательностей были бактерии, участвующие в цикле серы. Так, последовательности, отнесенные к роду *Bacillus*, обнаружили 100 % сходство с хемолитоавтотрофной тиосульфатоокисляющей бактерией *Bacillus thioeparus* (Pérez-Ibarra et al., 2007). Идентифицированные как *Thiomicrothrix* последовательности обнаружили близкородственную связь с *Thiomicrothrix aquaedulcis*, пресноводным облигатным хемолитоавтотрофом, окисляющим серу (Kojima, Fukui, 2019).

Микробное окисление и восстановление серы – наиболее активные и древние метаболические процессы в цикле серы, которые протекают в разных экосистемах. Эти процессы осуществляются сероокисляющими (SOB) и серовосстанавливающими бактериями (SRB) во всех экосистемах и рассматриваются как ключевое явление в биогеохимическом круговороте серы (Kumar U. et al., 2018). На родовом уровне установлено, что микробный мат сероводородного источника Безымянный состоит преимущественно из бесцветных сероокисляющих бактерий *Thiothrix*. Виды *Thiothrix* считаются типичной частью сероокисляющих микробных сообществ в богатых серой местообитаниях. С помощью некультивируемого подхода род *Thiothrix* был идентифицирован в холодных серных источниках Словакии (Nosalova et al., 2023b).

В донном осадке доминировали представители рода *Sulfurovum*. В ранее проведенных исследованиях было обнаружено, что род *Sulfurovum* широко распространен в микробных сообществах различных серных сред, включая источники, пещеры, жерла и бескислородные отложения (Nosalova et al., 2023b). Эти факультативные анаэробные хемолитоавтотрофы процветают в экстремальных условиях и являются первичными продуцентами в богатых серой местообитаниях. В работе (Wright et al., 2013) отмечено, что все серные окислительно-восстановительные гены присутствуют в геномах секвенированных представителей *Sulfurovum* и их генетическая способность позволяет им использовать различные соединения серы.

Кроме того, только в воде холодного источника обнаружены облигатные хемолитоавтотрофные сероокисляющие виды бактерий, родственные *Thiomicrothrix*. *Thiomicrothrix* ранее были обнаружены в холодных соленых средах, в том числе в морских отложениях Арктики и антарктических подледных рассолах (Knittel et al., 2005). Также *Thiomicrothrix* найден в изобилии в отложениях соленых холодных источников на острове Аксель Хейберг, расположенном в Канаде (Magnuson et al., 2023). Авторы отмечают, что *Thiomicrothrix* аэробно и хемолитоавтотрофно окисляет сульфид до элементарной серы.

Известно, что в бескислородных, насыщенных сульфатами слоях под поверхностью отложений сульфатредуцирующие микроорганизмы являются одними из наиболее

важных участников, которые опосредуют значительную долю деградации органического вещества (Yin et al., 2024). В изученном нами холодном источнике Безымянный обнаружено наибольшее распространение сульфатовосстанавливающих бактерий в донном осадке, относящихся в основном к филуму *Thermodesulfobacteriota*. Следует отметить, что большое количество неклассифицированных и некультивируемых представителей сульфатредуцирующих бактерий предполагает присутствие новых видов бактерий, восстанавливающих сульфаты в холодном источнике Безымянный.

Заключение

Впервые с помощью современных молекулярно-биологических методов изучено таксономическое разнообразие микроорганизмов и выявлены характерные особенности структуры микробных сообществ различных биотопов (микробный мат, донный осадок и вода) в холодном сероводородном источнике Безымянный (Прибайкальский район, Республика Бурятия). По результатам исследований в сообществах идентифицированы сероокисляющие и серовосстанавливающие бактерии, что свидетельствует о протекающих процессах цикла серы в экосистеме источника Безымянный. Анализ таксономического состава в целом показал высокое содержание в изучаемых сообществах неклассифицированных последовательностей. Полученные данные указывают на то, что микробиота холодных серных источников является пока еще скрытым ресурсом новых таксонов, в том числе бактерий серного цикла. Исследования холодных сероводородных источников в дальнейшем расширят наши знания о бактериях, участвующих в биогеохимическом цикле серы, их особенности и эволюции и могут указать на экологические особенности развития серных микробных сообществ и их связь со средой, в которой они обитают.

Доступность данных: все необработанные последовательности, полученные в результате секвенирования гена 16S рРНК, доступны в архиве NCBI SRA под номером BioProject PRJNA1202704.

Список литературы / References

Борисенко И.М., Замана Л.В. Минеральные воды Бурятской АССР. Улан-Удэ: Бурят. кн. изд-во, 1978
[Borisenko I.M., Zamana L.V. Mineral Waters of Buryat ASSR. Ulan-Ude: Buryat Publ., 1978 (in Russian)]

Кононов В.И. Геохимия термальных областей современного вулканизма (рифтовых зон и островных дуг). М.: Наука, 1983
[Kononov V.I. Geochemistry of Thermal Areas of Modern Volcanism (rift zones and island arcs). Moscow: Nauka Publ., 1983 (in Russian)]

Михайлов М.П., Толстик Н.И. Минеральные источники и грязевые озера Восточной Сибири, их гидрология, бальнеохимия и курортологическое значение. Иркутск, 1946
[Mikhailov M.P., Tolstikhin N.I. Mineral Springs and Mud Lakes of Eastern Siberia, Their Hydrology, Balneochimistry and Balneological Significance. Irkutsk, 1946 (in Russian)]

Намсараев Б.Б., Данилова Э.В., Бархутова Д.Д., Хахинов В.В. Минеральные источники и лечебные озера Южной Бурятии. Улан-Удэ: БГУ, 2005
[Namsaraev B.B., Danilova E.V., Barkhutova D.D., Khakhinov V.V. Mineral Springs and Therapeutic Lakes of South Buryatia. Ulan-Ude: Buryat State University Publ., 2005 (in Russian)]

Ткачук В.Г., Яснитская Н.В., Анкудинова Г.А. Минеральные воды Бурят-Монгольской АССР. Иркутск, 1957
[Tkachuk V.G., Yasnitskaya N.V., Ankudinova G.A. Mineral Waters of the Buryat-Mongolian ASSR. Irkutsk, 1957 (in Russian)]

Фомин Г.С. Вода. Контроль химической, бактериальной и радиационной безопасности по международным стандартам. Энциклопедический справочник. М.: Протектор, 2000
[Fomin G.S. Water. Control of Chemical, Bacterial and Radiation Safety According to International Standards. Encyclopedic reference book. Moscow: Protector Publ., 2000 (in Russian)]

Bates S.T., Berg-Lyons D., Caporaso J.G., Walters W.A., Knight R., Fierer N. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME J.* 2011;5(5):908-917. doi 10.1038/ismej.2010.171

Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J., Holmes S.P. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods.* 2016;13(7):581-583. doi 10.1038/nmeth.3869

Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., ... Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 2010;7(5):335-336. doi 10.1038/nmeth.f.303

Chao A., Gotelli N.J., Hsieh T.C., Sander E.L., Ma K.H., Colwell R.K., Ellison A.M. Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecol Monogr.* 2014;84(1):45-67. doi 10.1890/13-0133.1

Chao A., Ma K.H., Hsieh T.C. iNEXT (iNterpolation and EXTrapolation) Online: Software for Interpolation and Extrapolation of Species Diversity. 2016. Program and User's Guide published at http://chao.stat.nthu.edu.tw/wordpress/software_download/

Chaudhary A., Haack S.K., Duris J.W., Marsh T.L. Bacterial and archaeal phylogenetic diversity of a cold sulfur-rich spring on the shoreline of Lake Erie, Michigan. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(15):5025-5036. doi 10.1128/AEM.00112-09

Chernitsyna S.M., Elovskaya I.S., Bukin S.V., Bukin Y.S., Pogodaeva T.V., Kwon D.A., Zemskaya T.I. Genomic and morphological characterization of a new *Thiothrix* species from a sulfide hot spring of the Zmeinaya bay (Northern Baikal, Russia). *Antonie van Leeuwenhoek.* 2024;117(1):23. doi 10.1007/s10482-023-01918-w

Colangelo-Lillis J., Pelikan C., Herbold C.W., Altschuler I., Loy A., Whyte L.G., Wing B.A. Diversity decoupled from sulfur isotope fractionation in a sulfate-reducing microbial community. *Geobiology.* 2019;17(6):660-675. doi 10.1111/gbi.12356

Conklin K.Y., Stancheva R., Otten T.G., Fadness R., Boyer G.L., Read B., Zhang X., Sheath R.G. Molecular and morphological characterization of a novel dihydroanatoxin-a producing *Microcoleus* species (cyanobacteria) from the Russian River, California, USA. *Harmful Algae.* 2020;93:101767. doi 10.1016/j.hal.2020.101767

Dong X., Zhang C., Li W., Weng S., Song W., Li J., Wang Y. Functional diversity of microbial communities in inactive seafloor sulfide deposits. *FEMS Microbiol Ecol.* 2021;97(8):fiab108. doi 10.1093/femsec/fiab108

Douglas S., Douglas D.D. Structural and geomicrobiological characteristics of a microbial community from a cold sulfide spring. *Geomicrobiol J.* 2001;18(4):401-422. doi 10.1080/01490450175210567

Elshahed M.S., Senko J.M., Najjar F.Z., Kenton S.M., Roe B.A., Dewers T.A., Spear J.R., Krumholz L.R. Bacterial diversity and sulfur cycling in a mesophilic sulfide-rich spring. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(9):5609-5621. doi 10.1128/AEM.69.9.5609-5621.2003

Engel A.S., Lee N., Porter M.L., Stern L.A., Bennett P.C., Wagner M. Filamentous "*Epsilonproteobacteria*" dominate microbial mats from sulfidic cave springs. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(9):5503-5511. doi 10.1128/AEM.69.9.5503-5511.2003

Engel A.S., Porter M.L., Stern L.A., Quinlan S., Bennett P.C. Bacterial diversity and ecosystem function of filamentous microbial mats from

- aphotic (cave) sulfidic springs dominated by chemolithoautotrophic “*Epsilonproteobacteria*”. *FEMS Microbiol Ecol.* 2004;51(1):31-53. doi 10.1016/j.femsec.2004.07.004
- Fliermans C.B. Ecology of *Legionella*: from data to knowledge with a little wisdom. *Microb Ecol.* 1996;32(2):203-228. doi 10.1007/BF00185888
- Gorbunov M.Y., Khlopko Y.A., Kataev V.Y., Umanskaya M.V. Bacterial diversity in attached communities of a cold high-sulfide water body in European Russia. *Microbiology.* 2022;91:77-90. doi 10.1134/S0026261722010040
- Gulecal-Pektas Y., Temel M. A window to the subsurface: microbial diversity in hot springs of a sulfidic cave (Kaklik, Turkey). *Geomicrobiol J.* 2016;34(4):374-384. doi 10.1080/01490451.2016.1204374
- Hahn C.R., Farag I.F., Murphy C.L., Podar M., Elshahed M.S., Youssef N.H. Microbial diversity and sulfur cycling in an early earth analogue: from ancient novelty to modern commonality. *mBio.* 2022;13(2):e0001622. doi 10.1128/mbio.00016-22
- Hamilton T.L., Jones D.S., Schaperdoth I., Macalady J.L. Metagenomic insights into S(0) precipitation in a terrestrial subsurface lithoautotrophic ecosystem. *Front Microbiol.* 2015;5:756. doi 10.3389/fmicb.2014.00756
- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: PAleontological STatistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electronica.* 2001;4(1):1-9
- Headd B., Engel A.S. Biogeographic congruency among bacterial communities from terrestrial sulfidic springs. *Front Microbiol.* 2014;5:473. doi 10.3389/fmicb.2014.00473
- Howarth R., Unz R.F., Seviour E.M., Seviour R.J., Blackall L.L., Pickup R.W., Jones J.G., Yaguchi J., Head I.M. Phylogenetic relationships of filamentous sulfur bacteria (*Thiothrix* spp. and Eikelboom type 021N bacteria) isolated from wastewater-treatment plants and description of *Thiothrix eikelboomii* sp. nov., *Thiothrix unzii* sp. nov., *Thiothrix fructosivorans* sp. nov. and *Thiothrix defluvii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49(Pt.4):1817-1827. doi 10.1099/00207713-49-4-1817
- Inagaki F., Takai K., Neelson K.H., Horikoshi K. *Sulfurovum lithotrophicum* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the ϵ -*Proteobacteria* isolated from Okinawa Trough hydrothermal sediments. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54(Pt.5):1477-1482. doi 10.1099/ijms.0.03042-0
- Jiang F., Li W., Xiao M., Dai J., Kan W., Chen L., Li W., Fang C., Peng F. *Luteolibacter luojiensis* sp. nov., isolated from Arctic tundra soil, and emended description of the genus *Luteolibacter*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2012;62(Pt.9):2259-2263. doi 10.1099/ijms.0.037309-0
- Karl D.M., Wirsén C.O., Jannasch H.W. Deep-sea primary production at the Galápagos hydrothermal vents. *Science.* 1980;207(4437):1345-1347. doi 10.1126/science.207.4437.1345
- Klatt J.M., Meyer S., Häusler S., Macalady J.L., de Beer D., Polerecky L. Structure and function of natural sulphide-oxidizing microbial mats under dynamic input of light and chemical energy. *ISME J.* 2016;10(4):921-933. doi 10.1038/ismej.2015.167
- Knittel K., Kuever J., Meyerdierks A., Meinke R., Amann R., Brinkhoff T. *Thiomicrospira arctica* sp. nov. and *Thiomicrospira psychrophila* sp. nov., psychrophilic, obligately chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacteria isolated from marine Arctic sediments. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005;55(Pt.2):781-786. doi 10.1099/ijms.0.063362-0
- Kodama Y., Watanabe K. *Sulfuricurvum kujiense* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from an underground crude-oil storage cavity. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54(Pt.6):2297-2300. doi 10.1099/ijms.0.63243-0
- Kojima H., Fukui M. *Thiomicrothabodus aquaedulcis* sp. nov., a sulfur-oxidizing bacterium isolated from lake water. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2019;69(9):2849-2853. doi 10.1099/ijsem.0.003567
- Kuang B., Xiao R., Hu Y., Wang Y., Zhang L., Wei Z., Bai J., Zhang K., Acuña J.J., Jorquera M.A., Pan W. Metagenomics reveals biogeochemical processes carried out by sediment microbial communities in a shallow eutrophic freshwater lake. *Front Microbiol.* 2023;13:1112669. doi 10.3389/fmicb.2022.1112669
- Kumar R., Verma H., Haider S., Bajaj A., Sood U., Ponnusamy K., Nagar S., Shakarad M.N., Negi R.K., Singh Y., Khurana J.P., Gilbert J.A., Lal R. Comparative genomic analysis reveals habitat-specific genes and regulatory hubs within the genus *Novosphingobium*. *mSystems.* 2017;2(3):e00020-17. doi 10.1128/mSystems.00020-17
- Kumar U., Panneerselvam P., Gupta V.V.S.R., Manjunath M., Priyadarshinee P., Sahoo A., Dash S.R., Kaviraj M., Annapurna K. Diversity of sulfur-oxidizing and sulfur-reducing microbes in diverse ecosystems. In: *Advances in Soil Microbiology: Recent Trends and Future Prospects. Microorganisms for Sustainability.* Vol. 3. Singapore: Springer, 2018;3:65-89. doi 10.1007/978-981-10-6178-3_4
- Ma Y., Wang J., Liu Y., Wang X., Zhang B., Zhang W., Chen T., Liu G., Xue L., Cui X. *Nocardioideis*: “specialists” for hard-to-degrade pollutants in the environment. *Molecules.* 2023;28(21):7433. doi 10.3390/molecules28217433
- Magnuson E., Altshuler I., Freyria N.J., Leveille R.J., Whyte L.G. Sulfur-cycling chemolithoautotrophic microbial community dominates a cold, anoxic, hypersaline Arctic spring. *Microbiome.* 2023;11(1):203. doi 10.1186/s40168-023-01628-5
- McMurdie P.J., Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One.* 2013;8(4):e61217. doi 10.1371/journal.pone.0061217
- Norris P.R., Davis-Belmar C.S., Brown C.F., Calvo-Bado L.A. Autotrophic, sulfur-oxidizing actinobacteria in acidic environments. *Extremophiles.* 2011;15(2):155-163. doi 10.1007/s00792-011-0358-3
- Nosalova L., Fecskeova L.K., Piknova M., Bonova K., Pristas P. Unique populations of sulfur-oxidizing bacteria in natural cold sulfur springs in Slovakia. *Geomicrobiol J.* 2023a;40(4):315-324. doi 10.1080/01490451.2023.2167021
- Nosalova L., Mekadim C., Mrazek J., Pristas P. *Thiothrix* and *Sulfurovum* genera dominate bacterial mats in Slovak cold sulfur springs. *Environ Microbiome.* 2023b;18(1):72. doi 10.1186/s40793-023-00527-4
- Nosalova L., Piknova M., Kolesarova M., Pristas P. Cold sulfur springs-neglected niche for autotrophic sulfur-oxidizing bacteria. *Microorganisms.* 2023c;11(6):1436. doi 10.3390/microorganisms11061436
- Nunoura T., Hirai M., Miyazaki M., Kazama H., Makita H., Hirayama H., Furushima Y., Yamamoto H., Imach H., Takai K. Isolation and characterization of a thermophilic, obligately anaerobic and heterotrophic marine *Chloroflexi* bacterium from a *Chloroflexi*-dominated microbial community associated with a Japanese shallow hydrothermal system, and proposal for *Thermomarinilinea lacunofontalis* gen. nov., sp. nov. *Microbes Environ.* 2013;28(2):228-235. doi 10.1264/jsme2.me12193
- Pérez-Ibarra B.M., Flores M.E., García-Varela M. Isolation and characterization of *Bacillus thioeparus* sp. nov., chemolithoautotrophic, thiosulfate-oxidizing bacterium. *FEMS Microbiol Lett.* 2007;271(2):289-296. doi 10.1111/j.1574-6968.2007.00729.x
- Perreault N.N., Greer C.W., Andersen D.T., Tille S., Lacrampe-Couloume G., Lollar B.S., Whyte L.G. Heterotrophic and autotrophic microbial populations in cold perennial springs of the high arctic. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(22):6898-6907. doi 10.1128/AEM.00359-08
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:D590-D596. doi 10.1093/nar/gks1219
- Rudolph C., Moissl C., Henneberger R., Huber R. Ecology and microbial structures of archaeal/bacterial strings-of-pearls communities and archaeal relatives thriving in cold sulfidic springs. *FEMS Microbiol Ecol.* 2004;50:1-11. doi 10.1016/j.femsec.2004.05.006
- Sapers H.M., Ronholm J., Raymond-Bouchard I., Comrey R., Osinski G.R., Whyte L.G. Biological characterization of microenviron-

- ments in a hypersaline cold spring Mars analog. *Front Microbiol.* 2017;8:2527. doi 10.3389/fmicb.2017.02527
- Sarbu S.M., Kane T.C., Kinkle B.K. A chemoautotrophically based cave ecosystem. *Science.* 1996;272(5270):1953-1955. doi 10.1126/science.272.5270.1953
- Song D., Chen X., Xu M. Characteristics and functional analysis of the secondary chromosome and plasmids in sphingomonad. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2022;171:105402. doi 10.1016/j.ibiod.2022.105402
- Tang D., Chen M., Huang X., Zhang G., Zeng L., Zhang G., Wu S., Wang Y. SRplot: a free online platform for data visualization and graphing. *PLoS One.* 2023;18(11):e0294236. doi 10.1371/journal.pone.0294236
- Tóth E., Szuróczki S., Kéki Z., Kosztik J., Makk J., Bóka K., Spröer C., Márialigeti K., Schumann P. *Brevundimonas balnearis* sp. nov., isolated from the well water of a thermal bath. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017;67(4):1033-1038. doi 10.1099/ijsem.0.001746
- Watanabe M., Higashioka Y., Kojima H., Fukui M. *Desulfosarcina widelii* sp. nov. and *Desulfosarcina alkanivorans* sp. nov., hydrocarbon-degrading sulfate-reducing bacteria isolated from marine sediment and emended description of the genus *Desulfosarcina*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017;67(8):2994-2997. doi 10.1099/ijsem.0.002062
- Weelink S.A., van Doesburg W., Saia F.T., Rijpstra W.I., Röling W.F., Smidt H., Stams A.J. A strictly anaerobic betaproteobacterium *Georgfuchsia toluolica* gen. nov., sp. nov. degrades aromatic compounds with Fe(III), Mn(IV) or nitrate as an electron acceptor. *FEMS Microbiol Ecol.* 2009;70(3):575-585. doi 10.1111/j.1574-6941.2009.00778.x
- Wright K.E., Williamson C., Grasby S.E., Spear J.R., Templeton A.S. Metagenomic evidence for sulfur lithotrophy by Epsilonproteobacteria as the major energy source for primary productivity in a sub-aerial arctic glacial deposit, Borup Fiord Pass. *Front Microbiol.* 2013;4:63. doi 10.3389/fmicb.2013.00063
- Yang L.L., Liu Q., Liu H.C., Zhou Y.G., Xin Y.H. *Flavobacterium laiguense* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from Laigu glacier on the Tibetan Plateau. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2019;69(6):1821-1825. doi 10.1099/ijsem.0.003400
- Yin X., Zhou G., Wang H., Han D., Maeke M., Richter-Heitmann T., Wunder L.C., Aromokeye D.A., Zhu Q.Z., Nimzyk R., Elvert M., Friedrich M.W. Unexpected carbon utilization activity of sulfate-reducing microorganisms in temperate and permanently cold marine sediments. *ISME J.* 2024;18(1):wrad014. doi 10.1093/ismejo/wrad014

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 24.10.2024. После доработки 26.12.2024. Принята к публикации 26.12.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-31

Терапия муковисцидоза: от симптомов к причине заболевания

Т.Н. Киреева , Д.И. Жигалина , Н.А. Скрыбин 

Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

 tatyana.kireeva@medgenetics.ru

Аннотация. Муковисцидоз (МВ) – заболевание с широким клиническим и генетическим спектром проявлений, оказывающее значительное влияние на качество и продолжительность жизни пациента. В настоящее время диагностика МВ позволяет выявлять заболевание на самых ранних стадиях. Стремительное развитие науки и современные методы исследования изменили подходы в лечении МВ, начиная от симптоматического лечения до методов патогенетической терапии. Подходы патогенетической терапии направлены на поиск способов восстановления функции гена *CFTR*. Целью обзора стали анализ и обобщение имеющихся научных сведений о патогенетической терапии МВ. Рассмотрены подходы патогенетической терапии МВ на основе приема пациентами таргетных препаратов – *CFTR*-модуляторов. Приведены исследования с использованием методов генной терапии МВ, в основе которых лежит целенаправленная доставка нормальной копии кДНК гена *CFTR* в дыхательные пути с помощью вирусных или невирусных агентов. В некоторых исследованиях показано применение методов РНК-терапии для восстановления сплайсинга, продукции зрелой РНК и функционального белка *CFTR*. Также в обзоре проведен анализ литературных данных, в которых рассмотрены методы этиотропной терапии МВ, заключающейся в направленной коррекции гена *CFTR* с использованием искусственных ферментов рестрикции, системы CRISPR/Cas9 и комплекса пептидно-нуклеиновых кислот. В перспективном плане обсуждаются методы клеточной терапии в лечении поражения легких при муковисцидозе.

Ключевые слова: муковисцидоз (МВ); ген *CFTR*; мутации *CFTR*; модуляторы *CFTR*; генная терапия; геномное редактирование; CRISPR/Cas9

Для цитирования: Киреева Т.Н., Жигалина Д.И., Скрыбин Н.А. Терапия муковисцидоза: от симптомов к причине заболевания. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(2):279-289. doi 10.18699/vjgb-25-31

Благодарности. Авторы выражают глубокую признательность А.А. Агафоновой, заведующей отделением наследственных болезней, и В.В. Петровой, врачу-педиатру отделения наследственных болезней Медико-генетического центра (Генетической клиники) НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, Р.Р. Савченко, научному сотруднику лаборатории геномики орфанных болезней НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, за консультативную помощь и рецензирование рукописи.

Cystic fibrosis therapy: from symptoms to the cause of the disease

T.N. Kireeva , D.I. Zhigalina , N.A. Skryabin 

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

 tatyana.kireeva@medgenetics.ru

Abstract. Cystic fibrosis (CF) is a disease with a broad clinical and genetic spectrum of manifestations, significantly impacting the quality and duration of life of patients. At present, a diagnosis of CF enables the disease to be identified at the earliest stages of its development. The accelerated advancement of scientific knowledge and contemporary research techniques has transformed the methodology employed in the treatment of CF, encompassing a spectrum of approaches from symptomatic management to pathogenetic therapies. Pathogenetic therapy represents an approach to treatment that aims to identify methods of restoring the function of the *CFTR* gene. The objective of this review was to analyse and summarize the available scientific data on the pathogenetic therapy of CF. This paper considers various approaches to the pathogenetic therapy of CF that are based on the use of targeted drugs known as *CFTR* modulators. The article presents studies employing gene therapy techniques for CF, which are based on the targeted delivery of a normal copy of the *CFTR* gene cDNA to the respiratory tract via viral or non-viral vectors. Some studies have demonstrated the efficacy of RNA therapeutic interventions in restoring splicing, promoting the production of mature RNA, and increasing the functional expression of the *CFTR* protein. The review also analyzes literature data that consider methods of etiotropic therapy for CF, which consists of targeted correction of the *CFTR* gene using artificial restriction enzymes, the CRISPR/Cas9 system and a complex of peptide-nucleic acids. In a prospective plan, the use of cell therapy methods in the treatment of lung damage in CF is considered.

Key words: cystic fibrosis (CF); *CFTR*; *CFTR* mutations; *CFTR* modulators; gene therapy; genome editing; CRISPR/Cas9

For citation: Kireeva T.N., Zhigalina D.I., Skryabin N.A. Cystic fibrosis therapy: from symptoms to the cause of the disease. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(2):279-289. doi 10.18699/vjgb-25-31

Введение

Муковисцидоз (МВ) (кистозный фиброз, cystic fibrosis) (ОМIM 219700) – моногенное орфанное заболевание, характеризующееся аутосомно-рецессивным типом наследования, системным поражением органов с тяжелым течением и прогнозом (<https://www.omim.org/>). Частота встречаемости МВ составляет в среднем один случай на 2500–3000 новорожденных (Каширская, Капранов, 2014). Наиболее часто МВ регистрируется среди европеоидов, например, в США и Европе числится около 70000 больных МВ, в России – около 4000 пациентов с данным заболеванием (Симонова и др., 2020; Ломунова, Гершович, 2023).

Причина МВ – патогенные варианты в гене муковисцидозного трансмембранного регулятора проводимости (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *CFTR*), который был идентифицирован и клонирован в 1989 г. (Гембицкая и др., 2012; Elborn, 2016; Spielberg, Clancy, 2016). Ген *CFTR* содержит 27 экзонов, локализован в регионе 31.1 длинного плеча 7-й хромосомы (7q31.1). Белок, кодируемый этим геном, – трансмембранный регулятор проводимости (CFTR), является членом суперсемейства белков, относящихся к семейству АВС-транспортеров (ATP-binding cassette). Структурная организация белка CFTR включает в себя два трансмембранных домена (TMD1 и TMD2), два нуклеотидсвязывающих домена (NBD1 и NBD2) и центральный, внутриклеточный регуляторный домен (R-домен). Локализуясь на мембранах эпителиальных клеток, белок CFTR создает хлорный канал, регулируемый циклическим аденозинмонофосфатом (цАМФ). Посредством белка CFTR осуществляется не только регуляция ионов хлора (Cl⁻), но и секреция бикарбоната (HCO₃⁻), которая регулирует pH жидкости на поверхности клеток дыхательных путей. Также CFTR играет важную роль в гидратации секрета и муцинов посредством ингибирования эпителиального натриевого канала (ENaC) (Гинтер, 2000; Moran, 2014; Кондратьева и др., 2018; Bell et al., 2020; Hanssens et al., 2021).

Патогенные варианты в гене *CFTR* ведут к нарушению работы ионных каналов, вызывая снижение проводимости для ионов Cl⁻ и повышение проводимости для ионов Na⁺. Следствием этих нарушений являются изменение гидратационных процессов на мембранах эпителиальных клеток и изменение вязко-эластических свойств веществ, продуцируемых экзокринными железами. Данные изменения в большей степени влияют на работу органов дыхания, поджелудочной железы, печени, желчных путей, желудочно-кишечного тракта, потовых желез и органов мужской половой системы (Смирнихина, Лавров, 2018; Dechecchi et al., 2018; Ломунова, Гершович, 2023).

Генетические варианты в гене *CFTR*

Идентификацией и описанием генетических вариантов в гене *CFTR* занимается международный Консорциум генетического анализа МВ (Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, CFGAC), объединяющий лаборатории, деятельность которых направлена на генетическую диагностику и исследования МВ по всему миру. Для общего доступа полученные результаты помещаются в базу данных генетических вариантов в гене *CFTR* “CFTR1” ([\[www.genet.sickkids.on.ca/cftr/\]\(http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/\)\) и в созданную позднее базу “CFTR2” \(<http://www.cftr2.org/>\). База “CFTR2” включает актуальную информацию о недавно обнаруженных генетических вариантах в гене *CFTR* \(Rommens et al., 2006; Кондратьева и др., 2018; Dechecchi et al., 2018\). В настоящее время в базе данных CFGAC представлено более 2000 генетических вариантов в гене *CFTR*, которые подразделяют на семь классов в зависимости от механизма их воздействия на функцию белка CFTR \(Fanen et al., 2014; Elborn, 2016; Кондратьева и др., 2018; Bell et al., 2020; Lee et al., 2021; Краснова и др., 2023\).](http://</p></div><div data-bbox=)

При генетических вариантах **класса I** (R553X, W1282X, 2143delT, G542X, 1677delTA) отсутствует функциональный белок CFTR в связи с нарушением его транскрипции и трансляции. Примерно 22 % пациентов с МВ имеют по крайней мере один мутантный аллель данного класса (Lee et al., 2021). Результатом генетических вариантов **класса II** (F508del, I507del, N1303K, S549N) является блокировка созревания белка CFTR вследствие неправильной конфигурации его молекулы. Неправильно свернутые молекулы белка не достигают апикальной мембраны клетки, так как подвергаются деградации, ассоциированной с эндоплазматическим ретикуломом (Endoplasmic reticulum-associated protein degradation, ERAD). Примерно у 88 % больных МВ имеется как минимум один мутантный аллель и основной вариант F508del, вызванный делецией аминокислоты фенилаланина в 508-м положении. При генетическом варианте F508del происходит нарушение посттрансляционной модификации белка CFTR, в результате чего молекула белка становится функционально неполноценной и нестабильной либо полностью разрушается (Van Goor et al., 2006; Смирнихина, Лавров, 2018).

В регуляторном домене белка CFTR и его нуклеотидсвязывающих доменах были выявлены генетические варианты **класса III** (G1224E, S1255P, G551D), вызывающие нарушения регуляции хлорного канала. Дефект работы хлорного канала в данном случае связан с тем, что белок CFTR синтезируется и транспортируется к клеточной мембране, но не отвечает на стимуляцию цАМФ. К снижению ионного потока в результате изменения проводимости хлорного канала приводят миссенс-мутации, относящиеся к **классу IV** генетических вариантов в гене *CFTR* (R117H, R347P, R334W). Эти варианты располагаются в трансмембранных доменах и влияют на сокращение времени открытия ионного канала. Примерно у 6 % пациентов с МВ имеется данный тип генетических вариантов. Генетические варианты в гене *CFTR* **класса V** снижают уровень функционального белка и его транспорт на поверхность апикальной мембраны, что характерно для 5 % пациентов с МВ. К **классу VI** относятся генетические варианты в гене *CFTR*, изменяющие стабильность белка, что снижает время нахождения белка на поверхности мембраны. Отмечено, что 5 % пациентов с МВ имеют по крайней мере один аллель этого варианта (Кондратьева и др., 2018; Dechecchi et al., 2018). Выделяют также **класс VII**, генетические варианты которого влияют на экспрессию мРНК белка CFTR. Отсутствие мРНК связано с генетическим вариантом, характеризующимся крупной делецией – CFTRdele2,3 (21 kb) (Lee et al., 2021).

Чтобы предупредить развитие тяжелых осложнений при МВ и в целом улучшить прогноз заболевания, очень важно своевременно начать терапию. Результаты фундаментальных исследований позволили расширить понимание основных патогенетических и патофизиологических механизмов МВ, что способствовало появлению и быстрому развитию новых подходов в лечении данного заболевания. В настоящее время основу лечения больных МВ представляет комплексная терапия, объединяющая методы как симптоматического, так и патогенетического лечения. В перспективе рассматриваются также методы, основанные на применении инструментов для коррекции гена *CFTR* (Гембицкая и др., 2012; Bell et al., 2020).

Симптоматическая терапия муковисцидоза

Симптоматическое лечение направлено на борьбу с инфекцией, улучшение отхождения слизи из бронхов и предотвращение недостаточности питания, включая дефицит макро- и микронутриентов. Пациентам с МВ назначают прием антибиотиков, муколитических и бронхолитических препаратов совместно с приемом ферментов, витаминов и курсом кинезиотерапии (Каширская, Капранов, 2014; Симонова и др., 2020). Для лечения поражений органов дыхания применяют противовоспалительную и массивную антибактериальную терапию, при этом высокой эффективностью обладает ингаляционный путь введения препаратов (муколитиков, бронхолитиков, антибиотиков и глюкокортикоидов) (Гембицкая и др., 2012; Oliveira et al., 2017; Кондратьева и др., 2018; Симонова и др., 2020).

Существенное влияние на течение МВ оказывают методы оптимизированной антибиотикотерапии, где выбор антибиотика зависит от микробиологического статуса больного. Преодоление антибиотикорезистентности осуществляется путем аэрозольной доставки антибиотиков в просвет бронхов, что также снижает побочные эффекты при длительном лечении и применении высоких доз, поскольку концентрация препаратов в сыворотке крови в данном случае невысокая (Горинова и др., 2015; Кондратьева и др., 2018; Симонова и др., 2020).

В терапии МВ для нормализации вязко-эластических свойств мокроты и улучшения ее транспорта назначают муколитические препараты. В этой группе большим преимуществом обладает генно-инженерный препарат – муколитик дорназа альфа, который комплексно действует на инфекцию, воспаление и обструкцию, наблюдаемые при МВ. Применение данного препарата имеет огромное значение в комплексном лечении бронхолегочного процесса у больных МВ, особенно сразу после установления диагноза (Шерман и др., 2011). Для эвакуации мокроты из дыхательных путей пациентам с МВ совместно с муколитическими препаратами назначают проведение специальной дыхательной гимнастики (кинезиотерапии) (Симонова и др., 2020).

Не менее важными в терапии МВ являются коррекция экзокринной панкреатической недостаточности и лечение гепатобилиарных нарушений, а также поддержание нутритивного статуса пациентов с помощью диетотерапии. У больных с панкреатической недостаточностью в дополнение к диетотерапии назначают ферментозаместительную терапию и прием жирорастворимых витаминов

(Каширская, Капранов, 2011, 2014; Кондратьева и др., 2018).

Все разработанные методы и применяемые препараты симптоматической терапии влияют не только на продолжительность, но и на качество жизни больных МВ, в значительной мере улучшая ее. Однако симптоматическая терапия направлена лишь на контроль симптомов и ограничение осложнений при МВ, при этом никак не влияя на работу дефектного белка *CFTR* (Смирнихина, Лавров, 2018; Симонова и др., 2020).

Патогенетическая терапия муковисцидоза

Актуальными становятся разработка и испытания новых методов и препаратов, которые направлены на поиск способов восстановления функции гена *CFTR*. В этом направлении перспективными считаются методы патогенетической терапии (Гембицкая и др., 2012; Rafieeq, Murad, 2017; Bell et al., 2020). С учетом многообразия генетических вариантов в гене *CFTR* и различных их клинических проявлений были проведены исследования по поиску препаратов-супрессоров преждевременной остановки трансляции белка для пациентов, имеющих нонсенс-мутации, относящиеся к классу I, препаратов для носителей часто встречающегося варианта F508del и других генетических вариантов класса II, а также препаратов, работающих при всех классах генетических вариантов (см. таблицу) (Кондратьева и др., 2018; Dechecchi et al., 2018).

В поиске препаратов, способствующих «прочитыванию» стоп-кодонов *CFTR*-mRNA и предотвращению преждевременной терминации синтеза молекулы белка, был предложен препарат аталурен (PTC Therapeutics, США), назначаемый для лечения миодистрофии Дюшенна, вызванной нонсенс-мутациями. Однако в группе больных с нонсенс-мутациями в гене *CFTR* данный препарат оказался неэффективен. В настоящее время для коррекции генетических вариантов в гене *CFTR* класса I препараты еще не разработаны (Kerem et al., 2014; Zainal Abidin et al., 2017; Смирнихина, Лавров, 2018).

Наиболее перспективным терапевтическим средством для лечения МВ оказалась группа модуляторов, представляющих собой низкомолекулярные препараты, которые были идентифицированы в результате высокопроизводительного скрининга для коррекции нарушенного транспорта белка *CFTR* на плазматическую мембрану или для увеличения проводимости хлорного канала (Dechecchi et al., 2018; Sui et al., 2022; Краснова и др., 2023). Выбор препарата-модулятора в терапии МВ зависит от класса генетического варианта в гене *CFTR* и направленности их компенсирующих действий, в связи с чем модуляторы подразделяются на потенциаторы, корректоры, усилители и стабилизаторы (Lee et al., 2021).

Потенциаторы

Действие потенциаторов направлено на усиление открытия ионного канала, образованного мутантным белком *CFTR*, на поверхности клетки. Воздействие на ионный канал осуществляется через активацию аденилатциклического пути (генетические варианты гена *CFTR* классов III–IV). Одним из препаратов данной группы является ивакафтор (Vertex Pharmaceuticals, Германия). Первая фаза испыта-

Терапия муковисцидоза

Тип терапии	Метод	Препарат/комплекс/ комбинации	Эффективность, показанная в исследованиях
Патогенетическая терапия			
Фармакотерапия: прием препаратов – CFTR-модуляторов	Использование супрессоров преждевременной остановки трансляции CFTR	Аталурен	Неэффективен для пациентов с нонсенс- мутациями
	Использование потенциаторов работы ионного канала CFTR	Ивакафтор	Эффективен для пациентов с генетиче- ским вариантом G551D и пациентов с генотипом G461E/N1303K. Незначительный эффект для пациентов с генотипом F508del/F508del
	Использование корректоров фолдинга и процессинга CFTR	Лумакафтор	Частично восстанавливает функцию мутантного белка CFTR
	Использование комбинации «Потенциатор+корректор»	Ивакафтор/Лумакафтор Ивакафтор/Тезакафтор	Эффективен для пациентов с генотипом F508del/F508del
	Использование комбинации «Кор- ректор+корректор+потенциатор»	Элексакафтор/Тезакафтор/ Ивакафтор	Эффективен для пациентов как с одним, так и с двумя аллелями F508del
	Использование стабилизаторов CFTR на плазматической мембране	Кавосонат	Низкая эффективность по сравнению с потенциаторами
	Использование усилителей синтеза молекул CFTR	Несоликафтор	Эффективен при воспалительных процессах в дыхательных путях пациентов с несколькими генетическими вариантами гена <i>CFTR</i>
Генная терапия: целенаправленная доставка нормальной копии кДНК гена <i>CFTR</i> в дыхательные пути	Вирусный метод	Рекомбинантный адено- вирусный вектор (rAd)	Временная экспрессия <i>CFTR</i> , значительный иммунный ответ
		Хелперзависимый аденовирусный вектор (Hd-Ad)	Теряет эффективность <i>in vivo</i> , не вызывает иммунного ответа
		Аденоассоциированный вектор (AAV)	Неэффективен в трансдукции клеток человека
		Аденоассоциированный капсид AAV204	Эффективно восстанавливает работу хлорных каналов
		Spiro-2101: аденоассоциированный капсид, несущий функцио- нальную копию гена <i>CFTR</i>	Присвоен статус «орфанного лекарствен- ного препарата», предназначенного для терапии МВ
		Ретровирусные векторы	Низкая трансдуцирующая эффективность
	Лентивирусные векторы	Высокая трансдуцирующая эффективность	
Невирусный метод	рGM169/GL67A: комплекс кДНК/ катионный липид	Низкая эффективность в восстановлении функции легких	
РНК-терапия: восстановление сплайсинга и продукции зрелой РНК и функционального белка CFTR	Использование в качестве терапевтических агентов мРНК	Комплекс мРНК <i>CFTR</i> /липидные наночастицы (LNP)	Восстановление работы хлорных каналов и значительное увеличение количества белка CFTR на поверхности клеточной мембраны
	Использование в качестве терапевтических агентов коротких молекул РНК	Антисмысловые олигонуклеотиды (ACO)	Низкая эффективность для коррекции мРНК CFTR
		Eluforsen, QR-010: одноцепочечная антисмысловая РНК	Эффективен в улучшении работы хлорных каналов у пациентов с генотипом F508del/ F508del
Использование техники транс- сплайсинга, опосредованной сплайсосомами	SMaRT	Временное восстановление функции CFTR	

Окончание таблицы

Тип терапии	Метод	Препарат/комплекс/ комбинации	Эффективность, показанная в исследованиях
Этиотропная терапия			
Геномное редактирование: направленная коррекция гена <i>CFTR</i>	Использование искусственных ферментов рестрикции	Нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN)	Восстановление функции <i>CFTR</i> на терапевтически значимых уровнях в базальных клетках дыхательного эпителия
		Эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALEN)	Эффективность редактирования в ИПСК от пациентов с МВ составила 10 %
	Использование программируемых нуклеаз CRISPR/Cas9	Cas9/направляющие РНК (sgRNA) и одноцепочечные олигонуклеотиды (ssODN)	Эффективность коррекции варианта F508del в клетках HEK293T составила от 0.08 до 0.7 % аллелей
	Использование пептидно-нуклеиновых кислот (PNA)	PNA/донорская ДНК/ биоразлагаемые полимерные наночастицы	Уровень коррекции <i>in vivo</i> генетического варианта F508del в эпителиальных клетках мышей от ~0.1 до ~2 %
Клеточная терапия			
Клеточная терапия: Восстановление поражений легких	Аутогенная трансплантация <i>CFTR</i> -экспрессирующих клеток в пораженные участки дыхательных путей	ИПСК, дифференцированные в <i>CFTR</i> -экспрессирующие клетки дыхательного эпителия	Нет данных

ний ивакафтора проводилась на здоровых добровольцах, где была показана безопасность препарата (Van Goor et al., 2009). Затем в 2011 г. по результатам испытаний на 112 больных МВ (США) были приведены данные о том, что у лиц с генетическими вариантами G551D, G178R, G551S, G1244E, G1349D установлено достоверное увеличение транспорта ионов хлора (Flume et al., 2012). В 2012 г. ивакафтор был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) для применения пациентами, имеющими хотя бы одну из 38 точковых мутаций, включая 5 мутаций сплайсинга (Van Goor et al., 2006, 2009; Смирнихина, Лавров, 2018). Для пациентов с генетическим вариантом G551D применение ивакафтора рекомендовано во всем мире, в том числе в России (Sui et al., 2022). В 2017 г. описан случай успешного лечения больного МВ с генотипом G461E/N1303K; через шесть месяцев применения ивакафтора клиническое течение болезни у пациента существенно изменилось (Амелина и др., 2017). В 2018 г. опубликованы данные по оценке эффективности ивакафтора в группе пациентов детского возраста (2–3 года), у которых отмечались более сохраненные функции легких и низкий уровень осложнений, наблюдаемых при МВ (Bessonova et al., 2018).

Корректоры

Корректоры – это фармакологические вещества, которые связываются с мутантным белком *CFTR*, способствуя его «созреванию» путем адаптации белкового гомеостаза и уменьшения деградации мутантного белка в системе внутриклеточного качественного контроля (генетические варианты гена *CFTR* класса II) (Смирнихина, Лавров, 2018). Среди группы препаратов-корректоров известно применение 4-фенилбутирата/генистина, куркумина, тезакафтора, лумакафтора. Наибольшее количество исследований по-

священо оценке и анализу эффективности лумакафтора в стабилизации мутантного белка *CFTR* и его перемещению из эндоплазматического ретикулума (ЭПР) на поверхность клеточной мембраны. При этом лумакафтор способен частично восстанавливать функцию мутантного белка *CFTR*, стабилизируя его N-концевой домен (Ren et al., 2013; Lee et al., 2021).

В дальнейшем для пациентов, гомозиготных по F508del, было показано, что применение только лумакафтора или ивакафтора лишь незначительно снижает уровень хлоридов в потовой пробе. Это свидетельствует о том, что монотерапия с использованием одного из модуляторов неэффективна в отношении улучшения функций легких (Flume et al., 2012; Hanssens et al., 2021). В связи с этим в дальнейшем была проведена оценка эффективности различных комбинаций модуляторов для восстановления работы белка *CFTR* у пациентов с генотипом F508del/F508del. Так, в ряде расширенных исследований для пациентов старше 12 лет, гомозиготных по F508del, эффективной оказалась длительная комбинированная терапия с совместным применением лумакафтора и ивакафтора (Boyle et al., 2014; Wainwright et al., 2015). Для российских пациентов в терапии МВ имеется практика применения комбинации лумакафтора и ивакафтора совместно с базисной терапией, в результате которой отмечается улучшение таких показателей, как снижение уровня хлоридов в потовой жидкости, прибавка по показателю объема форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ1), улучшение общего состояния и прибавка в весе (Амелина и др., 2019).

Поскольку сочетание потенциатора и корректора положительно влияет на клинический эффект у пациентов с генетическим вариантом F508del, в 2015 г. FDA одобрила использование в терапии МВ комбинированного препарата лумакафтор/ивакафтор. Данный препарат разрешен к применению у детей старше 6 лет и взрослых с генотипом

F508del/F508del (Смирнихина, Лавров, 2018; Dechecchi et al., 2018; Симонова и др., 2020). Несмотря на показанную в клинических исследованиях эффективность, препарат имеет ряд побочных эффектов; также было отмечено, что положительное влияние препарата наблюдается лишь в случае одного генетического варианта F508del, находящегося в гомозиготном состоянии (Lee et al., 2021).

Положительный терапевтический эффект в отношении улучшения функций легких при лечении гомозиготных пациентов F508del-CFTR показала также комбинация ивакафтора с другим препаратом – тезакафтором. Комбинированный препарат тезакафтор+ивакафтор/ивакафтор применяют для лечения МВ у детей от 12 лет и взрослых с гомозиготной мутацией F508del (Taylor-Cousar et al., 2017).

По данным компании Vertex, наибольшая эффективность в лечении пациентов с генотипом F508del/F508del отмечена для комбинации трех модуляторов нового поколения: элексакафтор/тезакафтор/ивакафтор (elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor, ETI) (Смирнихина, Лавров, 2018). Данный комбинированный препарат повышает активность белка CFTR и снижает показатели смертности и заболеваемости у пациентов с МВ, применив как у больных МВ с гомозиготным генотипом F508del/F508del (в 90 % случаев), так и в группе больных, гетерозиготных по генетическому варианту F508del и варианту с резидуальной функцией (Keating et al., 2018). В клинических исследованиях было показано, что применение комбинации ETI улучшает функцию мутантного белка CFTR до уровней 40–50 % от нормальной активности белка CFTR в эпителиальных клетках дыхательных путей и кишечника. Также была показана высокая эффективность этой комбинации в отношении улучшения функций легких, снижения содержания хлоридов в поте, уменьшения частоты легочных обострений (Piehler et al., 2023).

Стабилизаторы и усилители

Для лечения пациентов с МВ необходимы такие соединения, как стабилизаторы и усилители белка CFTR. Стабилизаторы, фиксируя белок CFTR на плазматической мембране, тем самым препятствуют его отсоединению и деградации в лизосомах. Клиническое исследование эффективности одного из стабилизирующих белок соединения – кавосонстата, разработанного компанией Nivalis Therapeutics, проводилось на 138 пациентах, гомозиготных по F508del. Пациенты принимали кавосонстат совместно с ивакафтором. Однако на II фазе данное исследование было завершено в связи с отсутствием преимуществ стабилизатора по сравнению с потенциаторами (Красновидова и др., 2023).

Усилители используют для увеличения количества синтезированных молекул белка CFTR в клетках, доступного для последующей модуляции белково-активными малыми молекулами. Данная группа включает препарат несоликафтор, разработанный компанией Proteostasis Therapeutics. Несоликафтор представляет собой усилитель синтеза CFTR, который в комбинации с другими существующими методами лечения и терапии МВ показал положительное влияние на активность белка *in vitro*, почти в два раза увеличивая его активность в клетках бронхиального эпителия

пациентов с несколькими генетическими вариантами гена *CFTR*. Несоликафтор устраняет ингибирование, опосредованное цитокин-трансформирующим фактором роста бета 1 (TGF- β 1) скорректированной функции CFTR, при использовании с комбинацией ETI в первичных клетках бронхиального эпителия человека F508del CF, вероятно, за счет стабилизации мРНК. Несоликафтор косвенно увеличивает уровень секретируемых цитокинов за счет его воздействия на функцию апикальных ионных каналов. Была показана эффективность применения усилителей при воспалительных процессах в дыхательных путях пациентов с МВ (Bengtson et al., 2022).

Таким образом, рассмотренные фармакологические средства для патогенетической терапии МВ существенно увеличили продолжительность жизни пациентов с данным диагнозом. Однако препараты-модуляторы CFTR не устраняют причину заболевания, а лишь корректируют работу дефектного белка. При этом терапия модуляторами CFTR требует пожизненного приема лекарств, а их долгосрочные потенциальные побочные эффекты остаются неясными (Sui et al., 2022). Отмечается также, что примерно 10 % пациентов невосприимчивы к модуляторам из-за отсутствия или низкого уровня белка CFTR. По данным клинических исследований, около 10–20 % больных МВ обладают индивидуальной непереносимостью препаратов-модуляторов (Смирнихина, Лавров, 2018; Lee et al., 2021; Ломунова, Гершович, 2023). В связи с этим разрабатываются новые методы лечения МВ, направленные на устранение патологических изменений, лежащих в основе его развития. Прежде всего, это методы генной терапии (Maule et al., 2020).

Генная терапия муковисцидоза

Моногенный и рецессивный тип наследования при МВ обусловил появление способов лечения этого заболевания с применением методов генной терапии (см. таблицу) (Sui et al., 2022). Генная терапия при МВ заключается в целенаправленной доставке нормальной копии комплементарной ДНК (кДНК) гена *CFTR* в наиболее пораженные участки дыхательных путей больных с помощью вирусных частиц, несущих целевой трансген, и невирусных агентов, например липосом, наночастиц и др. (Гинтер, 2000; Смирнихина, Лавров, 2018; Ломунова, Гершович, 2023).

В 1993 г. было начато исследование по доставке нормальной копии кДНК *CFTR* в назальный эпителий пациентов с МВ с использованием рекомбинантного аденовирусного вектора (recombinant Adenoviral vector, rAd). Данная работа продемонстрировала перспективу рекомбинантных аденовирусных векторов для временной коррекции транспорта ионов Cl^- при МВ. Однако в дальнейшем было показано, что rAd-опосредованная экспрессия *CFTR* в постмитотических эпителиальных клетках дыхательных путей является временной и способствует сильным клеточным и гуморальным иммунным ответам (Van Goog et al., 2009). Чтобы исключить проблему иммунного ответа, в последующем был разработан хелперзависимый аденовирусный вектор (Helper-dependent Adenoviral vector, Hd-Ad). Hd-Ad доставляет ДНК (до 37 т. п. н.) в клетки дыхательных путей, исключая реакции Т-клеток хозяина на экспрессию чужеродного вирусного белка, т. е. не

вызывая воспаление (Lee et al., 2021). Восстановление функции CFTR до уровня, наблюдаемого в нормальных клетках дикого типа, было показано в исследовании на базальных клетках дыхательных путей мышей и свиней с МВ после коррекции CFTR с помощью Hd-Ad. Также Hd-Ad векторы были эффективны для коррекции гена CFTR в клетках легких мышей, нокаутных по данному гену. Однако из-за обновления клеток дыхательных путей применение Hd-Ad векторов для коррекции гена CFTR *in vivo* теряет свою терапевтическую эффективность (Koebler et al., 2003; Cao et al., 2020).

С 1998 по 2007 г. в клиниках под руководством Targeted Genetics Corporation оценивалась перспектива использования аденоассоциированных векторов (Adeno-Associated vector, AAV) в терапии заболеваний легких при МВ, среди которых гAAV2 был единственным доступным вектором данного серотипа. В доклинических исследованиях была показана способность гAAV2 продуктивно трансдуцировать клетки легких макаков-резусов и кроликов. Однако более поздние работы по изучению биологии трансдукции гAAV2 на модели клеточной культуры поляризованного эпителия дыхательных путей человека (Human airway epithelium, HAE) на границе раздела дыхательных путей и жидкости (Air-liquid interface, ALI) показали, что гAAV2 плохо трансдуцирует эпителиальные клетки дыхательных путей человека. Другим ограничением использования векторов гAAV в переносе гена CFTR является их относительно небольшая емкость упаковки (~4.9 т. п. н.) (Sui et al., 2022).

В последние годы несколько фармацевтических компаний занимаются разработкой генно-терапевтических агентов на основе AAV. Так, компания Abeona Therapeutics разработала капсид нового поколения AAV204, заключающий в себе функциональную копию mini-CFTR гена человека. Применение в терапии данного агента позволяет эффективно восстанавливать в клетках, как *in vitro*, так и *in vivo*, работу хлорных каналов. В 2020 г. компания Spirovant Sciences представила еще один аденоассоциированный капсид с улучшенным тропизмом к клеткам эпителия дыхательных путей, применяемый для доставки функциональной копии гена CFTR. Препарат получил название Spiro-2101, а в дальнейшем FDA ему был присвоен статус «орфанного лекарственного препарата», предназначенного для терапии МВ (Lee et al., 2021; Ломунова, Гершович, 2023).

В генотерапии МВ также было показано использование векторов на основе ретро- и лентивирусов. Применение ретровирусов, несущих ген CFTR, в исследованиях на кроликах демонстрировало стойкую экспрессию данного гена в дыхательных путях этих животных в течение почти трех недель, однако они имели низкую трансдуцирующую эффективность (Lee et al., 2021). Преимуществом лентивирусных векторов, полученных из вирусов иммунодефицита, является их способность трансдуцировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки, а экспрессия трансгена из интегрированного вирусного генома, вероятно, сохраняется на протяжении всего жизненного цикла клеток-реципиентов. При этом лентивирусные векторы, используемые для трансдукции в эпителиальные клетки дыхательных путей, необходимо псевдотипировать соот-

ветствующими белковыми оболочками. В исследованиях была показана более высокая эффективность трансдукции в клетки дыхательного эпителия с использованием лентивирусной стратегии по сравнению с невирусной (Alton et al., 2015; Sui et al., 2022). Несмотря на это, более безопасными и хорошо переносимыми все же являются невирусные методы доставки нормального гена CFTR в связи с отсутствием возникновения инсерционного мутагенеза и вторичного воздействия измененных уровней экспрессии трансгена (Lee et al., 2021).

Еще одно преимущество невирусных векторов – применение более крупных фрагментов донорской ДНК для репарации генов. Для эффективности невирусной доставки CFTR используется комплекс кДНК/катионный липид. Так, по данным исследования, опубликованном Британским консорциумом генной терапии МВ, в клетках легких пациентов с МВ регистрировалось увеличение функции CFTR до 3.7 % после применения распыляемого катионного липида rGM169/GL67A, доставляющего донорскую ДНК нормального гена CFTR. Однако такого улучшения было все еще недостаточно для восстановления функции легких при МВ (Alton et al., 2015; Spielberg, Clancy, 2016).

Таким образом, уже почти три десятилетия идет поиск подходящих методов генной терапии, применяемых для лечения МВ. Известно около 36 клинических испытаний генной терапии с участием значительного количества пациентов с МВ, однако из-за низкого клинического эффекта исследования не получили дальнейшего развития. Тем не менее эти попытки показали перспективность концепции генной терапии МВ и создали большой фундамент в данной области (Sui et al., 2022).

Редактирование гена CFTR

В дальнейшем благодаря появлению и совершенствованию экспериментальных клеточных и животных моделей особое значение приобрели новые подходы в направленной коррекции генов. К одним из таких эффективных методов относятся методы редактирования генома (см. таблицу).

Для коррекции генов применяют инструменты на основе целевого расщепления ДНК с использованием искусственных ферментов рестрикции: нуклеаз с «цинковыми пальцами» (Zinc-finger nucleases, ZFN) и эффекторных нуклеаз, подобных активатору транскрипции (Transcription activator-like effector nucleases, TALEN), программируемой нуклеазы (чаще всего это Cas9), специфичность действия которой достигается при помощи направляющей РНК (sgRNA). Далее репарация ДНК осуществляется благодаря функционирующим в клетке механизмам: негомологичному соединению концов (non-homologous end joining, NHEJ) или направленной гомологичной репарации (homology-directed repair, HDR), распространенной формой которой является гомологичная рекомбинация (homologous recombination, HR) (Смирнихина и др., 2020; Lee et al., 2021).

На основе ZFN была проведена оценка возможности редактирования локуса CFTR в базальных клетках дыхательных путей, полученных от пациентов с МВ, с использованием двух подходов. В первом подходе, основанном на замене последовательности для коррекции F508del,

продемонстрировано восстановление зрелого белка CFTR и его функции в культурах на границе ALI, полученных из массово отредактированных базальных клеток. Второй подход был направлен на интеграцию частичной кДНК в интрон эндогенного гена *CFTR* для коррекции всех генетических вариантов *CFTR*. В результате отмечена высокоэффективная сайт-специфическая целевая интеграция в базальные клетки, несущие различные генетические варианты гена *CFTR*, и показано восстановление функции CFTR на терапевтически значимых уровнях (Suzuki et al., 2020). Данные в экспериментах на основе TALEN показывают лучшую аффинность по сравнению с ZFN. В одном из исследований для доставки в клетки TALEN с донорской ДНК были выбраны Hd-Ad векторы, в результате чего достигнуто около 5 % целевой интеграции генов. В индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК) от пациентов с МВ эффективность TALEN-опосредованного редактирования F508del составляет не больше 10 %. При этом было отмечено, что манипуляции с геномом ИПСК не повлияли на их свойства и способность к дифференциации (Holkers et al., 2013; Xia et al., 2019).

Редактирование генома с использованием системы CRISPR/Cas9 (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9) позволяет «скорректировать» патогенетический вариант в гене с высокой эффективностью и закрепить «скорректированный» аллель в геноме. В связи с этим CRISPR/Cas9 является очень многообещающей технологией для создания ценных экспериментальных инструментов для тестирования методов лечения широкого спектра патогенетических вариантов, вызывающих МВ (Смирнихина, Лавров, 2018). Впервые система редактирования CRISPR/Cas9 для коррекции локуса гена *CFTR* была применена в культивируемых стволовых клетках кишечника пациентов, гомозиготных по F508del. Генетически скорректированные стволовые клетки образовывали органоиды, которые функционально реагировали на форсколин в виде изменения в объеме. В другом исследовании были получены ИПСК из клеток фибробластов кожи пациентов с МВ (F508del), в которых также в дальнейшем провели коррекцию гена *CFTR* с помощью системы CRISPR/Cas9. Скорректированные ИПСК были способны дифференцироваться в зрелые эпителиальные клетки дыхательных путей и демонстрировали восстановление транспорта хлоридов (Wang, 2023).

С использованием нуклеаз Cas9 было создано множество клеточных линий, представляющих собой альтернативные модели для разработки методов редактирования генетических вариантов в гене *CFTR*. Данные модели – это клеточные культуры, в которые были внесены плазмиды, несущие синтетические векторы с фрагментом гена *CFTR*, содержащим таргетную мутацию, в том числе и редко встречающуюся. На основе этого подхода были созданы клеточные линии: рака легких человека (Calu-3 CF), лейкемии человека (HL-60 F508del-CF), карциномы человека (16HBE14o-CF с F508del), а также изогенные клеточные модели с мутациями G542X, W1282X (Wang, 2023). В одном из исследований продемонстрирована возможность моделирования МВ в клеточной культуре HEK293T

путем внесения синтетической плазмиды pGEM-CFTR, несущей локус *CFTR* с генетическим вариантом F508del. Далее проводили оценку эффективности коррекции данного генетического варианта с использованием шести различных комбинаций Cas9/направляющих РНК (sgRNA) и одноцепочечных олигонуклеотидов (ssODN). В зависимости от комбинации компонентов CRISPR/Cas9 эффективность коррекции варианта F508del составила от 0.08 до 0.7 % аллелей (Смирнихина и др., 2020).

В дополнение к рассмотренным редакторным системам была показана возможность коррекции гена *CFTR* с помощью пептидно-нуклеиновых кислот (peptide nucleic acid, PNA), не основанная на CRISPR. В исследованиях на эпителиальных клетках дыхательных путей с F508del были использованы триплекс-образующие пептидно-нуклеиновые кислоты и донорская ДНК, упакованные в биоразлагаемые полимерные наночастицы. В результатах показано, что интраназальная доставка наночастиц мышам с МВ вызывает изменения в анализе разности потенциалов назального эпителия как следствие скорректированной функции CFTR. В другом исследовании с использованием системной доставки PNA была показана коррекция *in vivo* генетического варианта F508del во многих эпителиальных клетках, включая носовой эпителий, трахею, легкие, подвздошную кишку, толстую и прямую кишку у мышей с МВ. Уровень коррекции варьировал от ~0.1 до ~2 % (Wang, 2023).

Рассмотренные подходы в направленной коррекции гена *CFTR* нацелены на причины, лежащие в основе заболевания, т. е. имеют возможность обеспечить постоянное излечение пациентов с МВ. Несмотря на это существующее преимущество, в настоящее время данные подходы не используются в клинической практике в связи с биоэтическими ограничениями.

Методы РНК-терапии муковисцидоза

В терапии МВ рассматривается применение методов, основанных на использовании в качестве терапевтических агентов РНК: информационной РНК (мРНК) и более мелких молекул РНК – олигонуклеотидов (см. таблицу). В настоящее время проводятся клинические испытания, исследующие потенциал мРНК в терапии МВ. Одним из таких исследований является RESTORE-CF (NCT03375047), в котором изучаются специализированные липидные наночастицы (lipid nanoparticles, LNP) в качестве переносчиков мРНК. Показателями результата служат изменения функции легких, т. е. изменения ОФВ1. Также было отмечено восстановление работы хлорных каналов и значительное увеличение количества белка CFTR на поверхности клеточной мембраны дыхательного эпителия пациентов с МВ после введения в клетки химически модифицированной мРНК *CFTR* с помощью релевантных липосомных наночастиц (Ломунова, Гершович, 2023).

С целью восстановления сплайсинга и продукции зрелой РНК и функционального белка CFTR применяли короткие молекулы РНК – антисмысловые олигонуклеотиды (ACO) (Egan, 2021). Было проведено более 40 клинических испытаний, изучающих терапевтический потенциал ACO в лечении МВ. В клеточных моделях с генетическим вариантом F508del с помощью ACO осуществля-

лась вставка недостающих оснований в положение 508 *CFTR* на уровне транскриптов РНК, однако коррекция мРНК таким способом оказалась нестабильна (Maule et al., 2020). Компания ProQR Therapeutics провела исследования по интраназальному введению одноцепочечной антисмысловой РНК (eluforsen, QR-010) мышам. Данный препарат был разработан для восстановления функции *CFTR* в дыхательном эпителии через специфическое связывание с областью F508del в мРНК. Было показано, что QR-010 успешно диффундирует в клетки и вызывает положительные изменения в транспорте хлоридов. Так, после трех интраназальных введений QR-010 в течение четырех недель у пациентов с генотипом F508del/F508del зафиксировано клинически значимое улучшение функционирования хлорного канала вследствие восстановления функции *CFTR* (Ломунова, Гершович, 2023).

Для восстановления формирующейся мРНК путем замены части измененного транскрипта правильной экзогенной мРНК была использована также техника трансплайсинга, опосредованная сплайсосомами (spliceosome-mediated RNA trans-splicing, SMaRT). Данная техника применялась на клеточных моделях с генетическим вариантом F508del для восстановления правильных транскриптов, при этом восстановление функции *CFTR* было временным (Maule et al., 2020).

Методы РНК-терапии считаются возможными для лечения пациентов с МВ, однако такое лечение требует пожизненного введения терапевтических агентов, как и терапия модуляторами *CFTR*.

Клеточная терапия муковисцидоза

В перспективе рассматривается использование методов клеточной терапии в лечении поражения легких при МВ (см. таблицу). Существенные затруднения при этом вызывает поиск способов доставки донорских клеток в легкие человека.

Возможность доставки клеток в легкие была показана в экспериментах на мышах. В легкие мышей эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) заселяли путем внутривенного введения, клетки костного мозга (КМ) – путем интратрахеального введения. В результате в обоих случаях эффективность была низкая (Lee et al., 2021). Проведено несколько исследований по введению мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) в пораженные легкие мышей, в которых показано, что введение интактных ММСК в организм активирует противовоспалительный иммунитет у животных при разных формах воспаления легких (Смирнихина, Лавров, 2018). В Стэнфордском университете было проведено исследование, в котором в первичных базальных клетках дыхательных путей мутантный ген *CFTR* был отредактирован системой CRISPR/Cas9, доставленной в эти клетки с помощью AAV векторов. Затем скорректированные базальные клетки были помещены в полости носовых пазух крысы, где в дальнейшем оценивалась возможность данных клеток пролиферировать в клетки с нормальным *CFTR* (Egan, 2021).

К настоящему времени уже разработаны протоколы дифференцировки ИПСК в *CFTR*-экспрессирующие клетки дыхательного эпителия, что позволяет считать ИПСК

перспективным материалом для аутогенной трансплантации при поражениях легких. На данный момент клинические испытания с использованием ИПСК в рамках клеточной терапии для пациентов с МВ не проводятся (Ломунова, Гершович, 2023).

Заключение

Конечная цель исследований по поиску и разработке методов лечения МВ – предоставить всем пациентам терапию в достаточно раннем возрасте, чтобы задержать или даже предотвратить многие проявления заболевания, а также персонализировать саму терапию в целом в зависимости от потребностей пациентов.

Персонализированный подход в терапии больных МВ получил свое развитие в 2012 г., с появлением ряда таргетных препаратов. Некоторые препараты уже прошли клинические испытания и используются в терапии, к таким препаратам относятся модуляторы *CFTR* первого поколения: ивакафтор, лумакафтор/ивакафтор, тезакафтор+ивакафтор/ивакафтор, элексакафтор/тезакафтор/ивакафтор и ивакафтор. Использование модуляторов позволило восстановить функции мутантного белка *CFTR*, улучшить работу хлорных каналов на поверхности клеток. При всем этом модуляторная терапия не является излечивающей и охватывает не все генетические варианты в гене *CFTR*. Для 10 % пациентов с МВ, имеющих миссенс-мутации, в клетках которых практически не производится белок *CFTR*, терапия модуляторами *CFTR* не подходит, в связи с чем большое значение приобретают исследования в области генной терапии МВ, включая методы геномного редактирования.

Преимущество генной терапии заключается в том, что она подходит для всех пациентов с МВ, независимо от их генотипа. В области генной терапии МВ были инициированы крупные исследовательские программы, в ходе которых разработаны потенциальные агенты для данного вида терапии, и было выполнено множество клинических испытаний по доставке нормального гена *CFTR* в клетки дыхательного эпителия. Однако долгий путь к использованию генной терапии как метода лечения МВ не привел к значительной постоянной клинической эффективности, даже несмотря на то, что, возможно, имелся некоторый уровень коррекции. С ориентиром на перспективу рассмотрены работы по геномному редактированию гена *CFTR* при МВ с использованием таких инструментов, как CRISPR/Cas9, ZFN, TALEN и пептидно-нуклеиновые кислоты. Исследования по геномному редактированию при МВ находятся в доклинической фазе.

Таким образом, благодаря огромному количеству исследований патогенеза МВ и разработок с использованием инновационных генно-направленных персонализированных методов лечения, пациенты с данным заболеванием получили возможность значительного увеличения продолжительности жизни наряду с улучшением ее качества.

Список литературы / References

Амелина Е.Л., Красовский С.А., Усачева М.В., Крылова Н.А. Патогенетическое лечение муковисцидоза: первый клинический случай в России. *Пульмонология*. 2017;27(2):298-301. doi 10.18093/0869-0189-2017-27-2-298-301

- [Amelina E.L., Krasovskiy S.A., Usacheva M.V., Krylova N.A. Pathogenic treatment of cystic fibrosis: the first clinical case in Russia. *Pulmonologiya = Russian Pulmonology*. 2017;27(2):298-301. doi 10.18093/0869-0189-2017-27-2-298-301 (in Russian)]
- Амелина Е.Л., Красовский С.А., Шумкова Г.Л., Крылова Н.А. Таргетная терапия муковисцидоза при генотипе F508del/F508del. *Пульмонология*. 2019;29(2):235-238. doi 10.18093/0869-0189-2019-29-2-235-238
- [Amelina E.L., Krasovskiy S.A., Shumkova G.L., Krylova N.A. Targeted therapy for CF patients with F508del/F508del genotype. *Pulmonologiya = Russian Pulmonology*. 2019;29(2):235-238. doi 10.18093/0869-0189-2019-29-2-235-238 (in Russian)]
- Гембицкая Т.Е., Черменский А.Г., Бойцова Е.П. Муковисцидоз сегодня: достижения и проблемы, перспективы этиопатогенетической терапии. *Врач*. 2012;2:5-8
- [Gembitskaya T.E., Chermensky A.G., Boytsova E.P. Cystic fibrosis today: progress and problems, promises of etiopathogenetic therapy. *Vrach = The Doctor*. 2012;2:5-8 (in Russian)]
- Гинтер Е.К. Генотерапия наследственных болезней. *Вопросы медицинской химии*. 2000;46(3):264-278
- [Ginter E.K. Gene therapy of hereditary diseases. *Voprosy Meditsinskoi Khimii*. 2000;46(3):264-278 (in Russian)]
- Горина Ю.В., Симонова О.И., Лазарева А.В., Черневич В.П., Смирнов И.Е. Опыт длительного применения ингаляций раствора тобрамицина при хронической синегнойной инфекции у детей с муковисцидозом. *Российский педиатрический журнал*. 2015;18(3):50-53
- [Gorinova Yu.V., Simonova O.I., Lazareva A.V., Chernevich V.P., Smirnov I.E. Experience of the sustainable use of inhalations of tobramycin solution in chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in children with cystic fibrosis. *Rossiiskij Pediatricheskij Zhurnal = Russ Pediatr J*. 2015;18(3):50-53 (in Russian)]
- Каширская Н.Ю., Капранов Н.И. Опыт терапии экзокринной недостаточности поджелудочной железы при муковисцидозе в России. *Русский медицинский журнал*. 2011;19(7):476-484
- [Kashirskaya N.Yu., Kapranov N.I. Experience in the treatment of exocrine pancreatic insufficiency in cystic fibrosis in Russia. *Russ Med J*. 2011;19(7):476-484 (in Russian)]
- Каширская Н.Ю., Капранов Н.И. Современные фармакотерапевтические подходы к лечению муковисцидоза. *Фарматека*. 2014; 3(276):38-43
- [Kashirskaya N.Yu., Kapranov N.I. Modern pharmacotherapeutic approaches to the treatment of cystic fibrosis. *Farmateka*. 2014; 3(276):38-43 (in Russian)]
- Кондратьева Е.И., Каширская Н.Ю., Капранов Н.И. (ред.) Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия. М.: Компания БОРГЕС, 2018
- [Kondratieva E.I., Kashirskaya N.Yu., Kapranov N.I. (Eds.) Cystic Fibrosis: Definition, Diagnostic Criteria, Therapy. Moscow: BORGES Company Publ., 2018 (in Russian)]
- Краснова М.Г., Мельяновская Ю.Л., Красовский С.А., Булатенко Н.В., Ефремова А.С., Бухарова Т.Б., Гольдштейн Д.В. Описание клинической картины и оценка функциональной активности канала CFTR у пациента с комплексным аллелем [S466X; R1070Q]. *Пульмонология*. 2023;33(2):233-242. doi 10.18093/0869-0189-2023-33-2-233-242
- [Krasnova M.G., Melianovskaya Y.L., Krasovskiy S.A., Bulatenko N.V., Efreмова A.S., Bukharova T.B., Goldshtein D.V. Description of the clinical picture and assessment of functional activity of the CFTR channel in a patient with a complex allele [S466X; R1070Q]. *Pulmonologiya = Russ Pulmonology J*. 2023; 33(2):233-242. doi 10.18093/0869-0189-2023-33-2-233-242 (in Russian)]
- Красновидова А.Е., Симонова О.И., Черневич В.П., Пахомов А.В., Рейх А.П., Пушков А.А. Клинико-генетические параллели у сибсов с муковисцидозом. *Российский педиатрический журнал*. 2023;26(3):159-167. doi 10.46563/1560-9561-2023-26-3-159-167
- [Krasnovidova A.E., Simonova O.I., Chernevich V.P., Pakhomov A.V., Reykh A.P., Pushkov A.A. Genotype-phenotype correlation in siblings with cystic fibrosis. *Rossiiskij Pediatricheskij Zhurnal = Russ Pediatr J*. 2023;26(3):159-167. doi 10.46563/1560-9561-2023-26-3-159-167 (in Russian)]
- Ломунова М.А., Гершович П.М. Генная терапия муковисцидоза: достижения и перспективы. *Acta Naturae*. 2023;15(2):20-31. doi 10.32607/actanaturae.11708
- [Lomunova M.A., Gershovich P.M. Gene therapy for fibrosis: recent advances and future prospects. *Acta Naturae*. 2023;15(2):20-31. doi 10.32607/actanaturae.11708]
- Симонова О.И., Горина Ю.В., Черневич В.П. Муковисцидоз: прорыв в терапии XXI века. *Российский педиатрический журнал*. 2020;23(1):35-41. doi 10.18821/1560-9561-2020-23-1-35-41
- [Simonova O.I., Gorinova Yu.V., Chernevich V.P. Cystic fibrosis: a breakthrough in 21st-century therapy. *Rossiiskij Pediatricheskij Zhurnal = Russ Pediatr J*. 2020;23(1):35-41. doi 10.18821/1560-9561-2020-23-1-35-41 (in Russian)]
- Смирнихина С.А., Лавров А.В. Современное патогенетическое лечение и разработка новых методов генной и клеточной терапии муковисцидоза. *Гены и клетки*. 2018;13(3):23-31. doi 10.23868/201811029
- [Smirnikhina S.A., Lavrov A.V. Modern pathogenesis-based methods and development of new gene and cell-based methods for cystic fibrosis treatment. *Genes Cells*. 2018;13(3):23-31. doi 10.23868/201811029 (in Russian)]
- Смирнихина С.А., Кондратьева Е.В., Анучина А.А., Зайнитдинова М.И., Лавров А.В. Моделирование муковисцидоза в клеточной культуре HEK293T и разработка коррекции мутации F508del. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2020;15(2):158-162. doi 10.14300/mnnc.2020.15038
- [Smirnikhina S.A., Kondratyeva E.V., Anuchina A.A., Zaynitdinova M.I., Lavrov A.V. Modeling of cystic fibrosis in HEK293T cell culture and development of a method for the correction of F508del mutation. *Medicinskij Vestnik Severnogo Kavkaza = Medical News of North Caucasus*. 2020;15(2):158-162. doi 10.14300/mnnc.2020.15038 (in Russian)]
- Шерман В.Д., Капранов Н.И., Каширская Н.Ю. Дорназа альфа (Пульмозим) в комплексном лечении бронхолегочного процесса у больных муковисцидозом. *Фарматека*. 2011;11(224):42-45
- [Sherman V.D., Kapranov N.I., Kashirskaya N.Yu. Dornase alpha (Pulmozyme) for the complex treatment of bronchopulmonary process in cystic fibrosis patients. *Farmateka*. 2011;11(224):42-45 (in Russian)]
- Alton E.W.F.W., Armstrong D.K., Ashby D., Bayfield K.J., Bilton D., Bloomfield E.V., Boyd A.C., ... Waller M.D., Wasowicz M.Y., Wilson J.M., Wolstenholme-Hogg P., UK Cystic Fibrosis Gene Therapy Consortium. Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Respir Med*. 2015;3(9):684-691. doi 10.1016/S2213-2600(15)00245-3
- Bell S.C., Mall M.A., Gutierrez H., Macek M., Madge S., Davies J.C., Burgel P.R., ... Southern K.W., Sivam S., Stephenson A.L., Zampoli M., Ratjen F. The future of cystic fibrosis care: a global perspective. *Lancet Respir Med*. 2020;8(1):65-124. doi 10.1016/S2213-2600(19)30337-6
- Bengtson C., Silswal N., Baumlin N., Yoshida M., Dennis J., Yerrathota S., Kim M., Salathe M. The CFTR amplifier nesolicaftor rescues TGF-β1 inhibition of modulator-corrected F508del CFTR function. *Int J Mol Sci*. 2022;23(18):10956. doi 10.3390/ijms231810956
- Bessonova L., Volkova N., Higgins M., Bengtsson L., Tian S., Simard C., Konstan M.W., Sawicki G.S., Sewall A., Nyangoma S., Elbert A., Marshall B.C., Bilton D. Data from the US and UK cystic fibrosis registries support disease modification by CFTR modulation with ivacaftor. *Thorax*. 2018;73(8):731-740. doi 10.1136/thoraxjnl-2017-210394
- Boyle M.P., Bell S.C., Konstan M.W., McColley S.A., Rowe S.M., Rietschel E., Huang X., Waltz D., Patel N.R., Rodman D.; VX09-809-102 study group. A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a phe508del CFTR mutation: a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Respir Med*. 2014;2(7):527-538. doi 10.1016/S2213-2600(14)70132-8

- Cao H., Ouyang H., Laselva O., Bartlett C., Zhou Z.P., Duan C., Gunawardena T., Avolio J., Bear C.E., Gonska T., Hu J., Moraes T.J. A helper-dependent adenoviral vector rescues CFTR to wild-type functional levels in cystic fibrosis epithelial cells harbouring class I mutations. *Eur Respir J*. 2020;56(5):2000205. doi 10.1183/13993003.00205-2020
- Dechecchi M.C., Tamanini A., Cabrini G. Molecular basis of cystic fibrosis: from bench to bedside. *Ann Transl Med*. 2018;6(17):334. doi 10.21037/atm.2018.06.48
- Egan M.E. Emerging technologies for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator restoration in all people with CF. *Pediatr Pulmonol*. 2021;56(1):32-39. doi 10.1002/ppul.2496
- Elborn J.S. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2016;388(10059):2519-2531. doi 10.1016/S0140-6736(16)00576-6
- Fanen P., Wohlhuter-Haddad A., Hinzpeter A. Genetics of cystic fibrosis: CFTR mutation classifications toward genotype-based CF therapies. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;52:94-102. doi 10.1016/j.biocel.2014.02.023
- Flume P.A., Liou T.G., Borowitz D.S., Li H., Yen K., Ordoñez C.L., Geller D.E.; VX 08-770-104 Study Group. Ivacaftor in subjects with cystic fibrosis who are homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Chest*. 2012;142(3):718-724. doi 10.1378/chest.11-2672
- Hanssens L.S., Duchateau J., Casimir G.J. CFTR protein: not just a chloride channel? *Cells*. 2021;10(11):2844. doi 10.3390/cells10112844
- Holkers M., Maggio I., Liu J., Janssen J.M., Miselli F., Mussolino C., Recchia A., Cathomen T., Gonçalves M.A. Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(5):e63. doi 10.1093/nar/gks1446
- Keating D., Marigowda G., Burr L., Daines C., Mall M.A., McKone E.F., Ramsey B.W., Rowe S.M., Sass L.A., Tullis E., McKee C.M., Moskowitz S.M., Robertson S., Savage J., Simard C., Van Goor F., Waltz D., Xuan F., Young T., Taylor-Cousar J.L.; VX16-445-001 Study Group. VX-445 – Tezacaftor-ivacaftor in patients with cystic fibrosis and one or two Phe508del alleles. *N Engl J Med*. 2018;379(17):1612-1620. doi 10.1056/NEJMoa1807120
- Kerem E., Konstan M.W., De Boeck K., Accurso F.J., Sermet-Gaudelus I., Wilschanski M., Elborn J.S., Melotti P., Bronsveld I., Fajac I., Malfroot A., Rosenbluth D.B., Walker P.A., McColley S.A., Knoop C., Quattrucci S., Rietschel E., Zeitlin P.L., Barth J., Elf-ring G.L., Welch E.M., Branstrom A., Spiegel R.J., Peltz S.W., Ajayi T., Rowe S.M.; Cystic Fibrosis Ataluren Study Group. Ataluren for the treatment of nonsense-mutation cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Respir Med*. 2014;2(7):539-547. doi 10.1016/S2213-2600(14)70100-6
- Koehler D.R., Sajjan U., Chow Y.H., Martin B., Kent G., Tanswell A.K., McKerlie C., Forstner J.F., Hu J. Protection of *Cftr* knockout mice from acute lung infection by a helper-dependent adenoviral vector expressing *Cftr* in airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(26):15364-15369. doi 10.1073/pnas.2436478100
- Lee J.A., Cho A., Huang E.N., Xu Y., Quach H., Hu J., Wong A.P. Gene therapy for cystic fibrosis: new tools for precision medicine. *J Transl Med*. 2021;19(1):452. doi 10.1186/s12967-021-03099-4
- Maule G., Arosio D., Cereseto A. Gene therapy for cystic fibrosis: progress and challenges of genome editing. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11):3903. doi 10.3390/ijms21113903
- Moran O. On the structural organization of the intracellular domains of CFTR. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;52:7-14. doi 10.1016/j.biocel.2014.01.024
- Olveira C., Padilla A., Dorado A., Contreras V., Garcia-Fuentes E., Rubio-Martin E., Porras N., Doña E., Carmona A., Olveira G. Inflammation and oxidation biomarkers in patients with cystic fibrosis: the influence of azithromycin. *Eurasian J Med*. 2017;49(2):118-123. doi 10.5152/eurasianjmed.2017.17010
- OMIM.org [Internet]. Online Mendelian Inheritance in Man®. [cited 2023 Aug 28]. Available from: <https://www.omim.org/>
- Piehlert L., Thalemann R., Lehmann C., Thee S., Röhm J., Syun-yaeva Z., Stahl M., Mall M.A., Graeber S.Y. Effects of elxacaftor/tezacaftor/ivacaftor therapy on mental health of patients with cystic fibrosis. *Front Pharmacol*. 2023;14:1179208. doi 10.3389/fphar.2023.1179208
- Rafeeq M.M., Murad H.A.S. Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. *J Transl Med*. 2017;15(1):84-92. doi 10.1186/s12967-017-1193-9
- Ren H.Y., Grove D.E., De La Rosa O., Houck S.A., Sopha P., Van Goor F., Hoffman B.J., Cyr D.M. VX-809 corrects folding defects in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein through action on membrane-spanning domain 1. *Mol Biol Cell*. 2013;24(19):3016-3024. doi 10.1091/mbc.E13-05-0240
- Rommens J.M., Iannuzzi M.C., Kerem B., Drumm M.L., Melmer G., Dean M., Rozmahel R., Cole J.L., Kennedy D., Hidaka N., Zsiga M., Buchwald M., Tsui L.-C., Riordan J.R., Collins F.S. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*. 2006;245(4922):1059-1065. doi 10.1126/science.2772657
- Spielberg D.R., Clancy J.P. Cystic fibrosis and its management through established and emerging therapies. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2016;17:155-175. doi 10.1146/annurev-genom-090314-050024
- Sui H., Xu X., Su Y., Gong Z., Yao M., Liu X., Zhang T., Jiang Z., Bai T., Wang J., Zhang J., Xu C., Luo M. Gene therapy for cystic fibrosis: challenges and prospects. *Front Pharmacol*. 2022;13:1015926. doi 10.3389/fphar.2022.1015926
- Suzuki S., Crane A.M., Anirudhan V., Barillà C., Matthias N., Randell S.H., Rab A., Sorscher E.J., Kerschner J.L., Yin S., Harris A., Mendel M., Kim K., Zhang L., Conway A., Davis B.R. Highly efficient gene editing of cystic fibrosis patient-derived airway basal cells results in functional CFTR correction. *Mol Ther*. 2020;28(7):1684-1695. doi 10.1016/j.jymthe.2020.04.021
- Taylor-Cousar J.L., Munck A., McKone E.F., van der Ent C.K., Moeller A., Simard C., Wang L.T., Ingenito E.P., McKee C., Lu Y., Lekstrom-Himes J., Elborn J.S. Tezacaftor-ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del. *N Engl J Med*. 2017;377(21):2013-2023. doi 10.1056/NEJMoa1709846
- Van Goor F., Straley K.S., Cao D., González J., Hadida S., Hazlewood A., Joubran J., Knapp T., Makings L.R., Miller M., Neuberger T., Olson E., Panchenko V., Rader J., Singh A., Stack J.H., Tung R., Grootenhuis P.D., Negulescu P. Rescue of ΔF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290(6):L1117-L1130. doi 10.1152/ajplung.00169.2005
- Van Goor F., Hadida S., Grootenhuis P.D., Burton B., Cao D., Neuberger T., Turnbull A., Singh A., Joubran J., Hazlewood A., Zhou J., McCartney J., Arumugam V., Decker C., Yang J., Young C., Olson E.R., Wine J.J., Frizzell R.A., Ashlock M., Negulescu P. Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(44):18825-18830. doi 10.1073/pnas.0904709106
- Wainwright C.E., Elborn J.S., Ramsey B.W., Marigowda G., Huang X., Cipolli M., Colombo C., Davies J.C., De Boeck K., Flume P.A., Konstan M.W., McColley S.A., McCoy K., McKone E.F., Munck A., Ratjen F., Rowe S.M., Waltz D., Boyle M.P.; TRAFFIC Study Group; TRANSPORT Study Group. Lumacaftor-ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del *CFTR*. *N Engl J Med*. 2015;373(18):1783-1784. doi 10.1056/NEJMc1510466
- Wang G. Genome editing for cystic fibrosis. *Cells*. 2023;12(12):1555. doi 10.3390/cells12121555
- Xia E., Zhang Y., Cao H., Li J., Duan R., Hu J. TALEN-mediated gene targeting for cystic fibrosis-gene therapy. *Genes (Basel)*. 2019;10(1):39. doi 10.3390/genes10010039
- Zainal Abidin N., Haq I.J., Gardner A.L., Brodli M. Ataluren in cystic fibrosis: development, clinical studies and where are we now? *Expert Opin Pharmacother*. 2017;18(13):1363-1371. doi 10.1080/14656566.2017.1359255

doi 10.18699/vjgb-25-32

Роль ретроэлементов в развитии болезни Паркинсона

Р.Н. Мустафин 

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

 ruji79@mail.ru

Аннотация. Болезнь Паркинсона – второе по распространенности нейродегенеративное заболевание, характеризующееся накоплением альфа-синуклеина и телец Леви в черной субстанции головного мозга. Генетические исследования свидетельствуют об ассоциации с болезнью различных SNP, многие из которых расположены в межгенных и интронных областях, где локализованы также ретротранспозоны и произошедшие от них гены некодирующих РНК. В связи с этим сделано предположение о влиянии SNP в генах ретроэлементов на развитие болезни Паркинсона. Фактором предрасположенности является активация ретротранспозонов с возрастом, поскольку заболевание ассоциировано со старением. Предложена гипотеза о том, что альфа-синуклеин накапливается в головном мозге вследствие его взаимодействия с транскриптами активированных ретроэлементов. В результате дефектного противовирусного ответа и большого количества РНК-мишеней для данного белка его агрегаты образуют тельца Леви в нейронах с последующим воспалением черной субстанции и активацией нейродегенеративных процессов. В качестве доказательства приведены данные о роли альфа-синуклеина в противовирусном ответе со связыванием с РНК вирусов, которые характеризуются способностью активировать ретроэлементы, произошедшие в эволюции от встроенных в геном человека экзогенных вирусов. Обнаружены также активированные LINE1-ретроэлементы в головном мозге, эндогенные ретровирусы и LINE1 в сыворотке крови пациентов с болезнью Паркинсона. Дополнительный механизм, способствующий прогрессированию болезни, представляет собой дисфункция митохондрий вследствие инсерций в их геномы Alu-элементов с помощью ферментов LINE1. Описаны механизмы влияния активированных ретротранспозонов на произошедшие от них в эволюции микроРНК. Анализ научной литературы позволил выявить 35 таких микроРНК (miR-1246, -1249, -1271, -1273, -1303, -151, -211, -28, -31, -320b, -320d, -330, -335, -342, -374a, -374b, -421, -4293, -4317, -450b, -466, -487b, -493, -495, -5095, -520d, -576, -585, -6088, -619, -625, -626, -769, -885, -95), ассоциированных с болезнью Паркинсона, которые могут стать перспективными мишенями для ее лечения и диагностики.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона; вирусы; микроРНК; ретроэлементы

Для цитирования: Мустафин Р.Н. Роль ретроэлементов в развитии болезни Паркинсона. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(2):290-300. doi 10.18699/vjgb-25-32

The role of retroelements in Parkinson's disease development

R.N. Mustafin 

Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

 ruji79@mail.ru

Abstract. Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease characterized by accumulation of alpha-synuclein and Lewy bodies in the brain's substantia nigra. Genetic studies indicate an association of various SNPs, many of which are located in intergenic and intronic regions, where retrotransposons and non-coding RNA genes derived from them reside, with this disease. Therefore, we hypothesize the influence of SNPs in retroelement genes on Parkinson's disease development. A susceptibility factor is retrotransposons activation with age, since the disease is associated with aging. We hypothesized that alpha-synuclein accumulates in the brain due to its interaction with transcripts of activated retroelements. As a result of a defective antiviral response and a large number of RNA targets for this protein, its aggregates form Lewy bodies in neurons with inflammation and neurodegeneration development in the substantia nigra. As evidence, data are presented on the role of alpha-synuclein in the antiviral response with binding to RNA viruses, which are characterized by the ability to activate retroelements that have evolved from exogenous viruses integrated into the human genome. Activation of LINE1s in the brain, endogenous retroviruses, and LINE1s in the blood serum of Parkinson's disease patients was detected. An additional mechanism contributing to the progression of the disease is mitochondrial dysfunction due to insertions of Alu elements into their genomes using LINE1 enzymes. Mechanisms of activated retrotransposons' influence on microRNAs that evolved from them are described. Analysis of the scientific literature allowed us to identify 35 such microRNAs (miR-1246, -1249, -1271, -1273, -1303, -151, -211, -28, -31, -320b, -320d, -330, -335, -342, -374a, -374b, -421, -4293, -4317, -450b, -466, -487b, -493, -495, -5095, -520d, -576, -585, -6088, -619, -625, -626, -769, -885, -95) associated with Parkinson's disease, which may become promising targets for its treatment and diagnosis.

Key words: Parkinson's disease; viruses; microRNA; retroelements

For citation: Mustafin R.N. The role of retroelements in Parkinson's disease development. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(2):290-300. doi 10.18699/vjgb-25-32

Введение

Болезнь Паркинсона – второе после болезни Альцгеймера по частоте встречаемости нейродегенеративное заболевание, поражающее 2 % населения мира старше 65 лет (Morais et al., 2016). Болезнь Паркинсона характеризуется дегенерацией дофаминергических нейронов черной субстанции головного мозга вследствие накопления в них альфа-синуклеина (АС) и телец Леви (Leblanc, Vorberg, 2022). При этом происходит прионо-подобное распространение АС (Park et al., 2021). В результате клинически медленно прогрессируют такие симптомы, как ригидность, дрожь, нарушение походки, замедленность движений. В последующем нарушаются речь, походка и выполнение повседневной деятельности, развивается деменция (Hossain et al., 2022). Общая наследуемость риска БП составляет от 0.27 (Blauwendraat et al., 2019) до 0.36 (Nalls et al., 2019). В большинстве случаев БП – многофакторное заболевание, ассоциированное с полиморфными вариантами различных генов (Blauwendraat et al., 2019). Однако у 10 % пациентов с БП обнаруживают моногенные формы болезни, самой частой причиной которых являются мутации в гене *LRK2*, кодирующем богатую лейциновыми повторами киназу (Oliveira et al., 2021).

Проведенный в 2019 г. GWAS на образцах ДНК 28 568 пациентов с БП позволил найти более 40 локусов, достоверно ассоциированных с БП, в том числе SNP, расположенных в генах *GBA*, *INPP5F/SCARB2*, *LRK2*, *MCC1*, *SNCA*, *VPS13C* (Blauwendraat et al., 2019). В другом GWAS того же года у 37 688 больных БП было обнаружено 78 ассоциированных с БП полиморфных локусов (Nalls et al., 2019). Большинство таких SNP расположено в межгенных, промоторных и интронных областях (Ohnmacht et al., 2020), где находится основная часть генов ретроэлементов и некодирующих РНК в геноме человека (Nurk et al., 2022). Поэтому можно предположить, что влияние многих ассоциированных с БП полиморфизмов обусловлено изменением функционирования РЭ и нкРНК, которые играют роль в регуляции экспрессии генов нейронов головного мозга (Mustafin, Khusnutdinova, 2020). Об этом свидетельствуют как косвенные, так и прямые доказательства роли РЭ в патогенезе БП. В частности, характерная выраженная ассоциация БП со старением (лишь 4 % пациентов с БП в мире младше 50 лет (Hossain et al., 2022)) может быть обусловлена активацией РЭ при старении (Gorbunova et al., 2021) вследствие изменения метилирования ДНК и деструктуризации гетерохроматина (Ravel-Godreuil et al., 2021).

Ретроэлементы относятся к транспозонам или мобильным генетическим элементам, которые представляют собой специфические участки генома, перемещающиеся в новые локусы путем «копирования и вставки». ДНК-транспозоны используют механизм «вырезания и вставки» (Gorbunova et al., 2021). Всего в геноме человека транспозоны занимают около 1.4 млрд п. н. (46.7 % всех последовательностей ДНК). Наибольшую долю составляют не содержащие длинных концевых повторов (LTR) автономные LINE (0.63 млрд п. н.) и неавтономные SINE (0.39 млрд п. н.), содержащие LTR РЭ (эндогенные ретровирусы человека, HERV), составляющие 0.27 млрд п. н. (Nurk et al., 2022). Около 0.13 % генома человека занима-

Список сокращений

- GWAS (Genome Wide Association Study) – полногеномный анализ ассоциаций
 HERV (Human Endogenous RetroVirus) – эндогенный ретровирус человека
 HLA (Human Leukocyte Antigen) – человеческие лейкоцитарные антигены
 LINE (Long Interspersed Nuclear Element) – длинный диспергированный ядерный элемент
 LTR (Long Terminal Repeat) – длинный концевой повтор
 NHEJ (Non-Homologous End Joining) – негомологичное соединение концов
 ORF (Open Reading Frame) – открытая рамка считывания
 RdDM (RNA-dependent DNA Methylation) – РНК-направленное метилирование ДНК
 RC-LINE1 (Retrotransposition Competent LINE1) – способные к ретротранспозиции LINE1
 SINE (Short Interspersed Nuclear Element) – короткий диспергированный ядерный элемент
 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм
 SVA (SINE-VNTR-Alu) – короткий диспергированный элемент – вариабельный по количеству tandemный повтор – Alu-элемент
 SV-SVA (Structurally Variable SVA) – структурно-вариабельный короткий диспергированный элемент – вариабельный по количеству tandemный повтор – Alu-элемент
 TLR3 (Toll-like Receptor 3) – толл-подобный рецептор 3
 WEEV (Western Equine Encephalitis Virus) – вирус западного энцефаломиелита лошадей
 WNV (West Nile Virus) – вирус Западного Нила
 АС – альфа-синуклеин
 БП – болезнь Паркинсона
 ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
 МГЭ – мобильные генетические элементы
 миРНК – малые интерферирующие РНК
 нкРНК – некодирующие РНК
 РЭ – ретроэлементы

ют неавтономные SVA (SINE-VNTR-Alu) РЭ в количестве около 3000 элементов (Fröhlich et al., 2024). ДНК-транспозоны занимают 0.108 млрд п. н. (Nurk et al., 2022). Ретроэлементы являются важными источниками эволюционного возникновения нкРНК, таких как микроРНК (Mustafin, Khusnutdinova, 2023), чем можно объяснить результаты анализа генома человека с использованием комплементарных транспозонам специфических олигонуклеотидов, показавшие, что последовательности РЭ (не только сами РЭ, но и произошедшие от них регуляторные элементы, интроны, гены нкРНК и tandemные повторы) занимают не менее 2/3 всего генома человека (de Koning et al., 2011).

Тесная взаимосвязь функционирования РЭ с возникшими от них нкРНК в регуляции экспрессии генов свидетельствует о роли транспозонов в качестве драйверов

эпигенетической регуляции. Поэтому сбой эволюционно запрограммированного видоспецифичного контроля вследствие индивидуальных полиморфизмов последовательностей РЭ, обнаруживаемых с помощью GWAS (Nalls et al., 2019; Ohnmacht et al., 2020; Bantle et al., 2021), под влиянием старения (Gorbunova et al., 2021) и средовых факторов, таких как перенесенные вирусные инфекции (Jang et al., 2009; Batman et al., 2015; Marreiros et al., 2020; Park et al., 2021; Leblanc, Vorberg, 2022), может стать причиной эпигенетической дисрегуляции в головном мозге, характеризующейся наиболее выраженной активностью МГЭ (Mustafin, Khusnutdinova, 2020). В результате развивается нейродегенеративный процесс, при котором накопление АС и телец Леви может отражать сбой в защитных механизмах клеток против гиперактивированных РЭ, что обусловлено ролью АС в противовирусных процессах.

Роль альфа-синуклеина в противовирусной защите

Ретроэлементы в эволюции произошли от экзогенных вирусов (Мустафин, 2018), чем объясняется одна из современных концепций старения, обусловленного гиперактивацией РЭ (Gorbunova et al., 2021), которые стимулируют противовирусный ответ интерферона с развитием системного асептического воспаления, прогрессирующей дегенерацией органов и тканей (De Sessa et al., 2019). Поэтому о роли РЭ в развитии БП могут свидетельствовать как влияние вирусов на БП, так и защитная функция АС против вирусов. Действительно, согласно метаанализам и систематическим обзорам научной литературы, БП вызывают вирусы гриппа, Коксаки, ВИЧ, японского энцефалита В, Западного Нила (WNV), Сент-Луиса (Jang et al., 2009), вирусы гриппа А, герпесвирусы и флавивирусы. Определен повышенный риск развития БП после инфекций гепатитов В и С (Wang et al., 2020; Leblanc, Vorberg, 2022). Обнаружено, что вирус гриппа А H1N1 способствует нарушению протеостаза и агрегации альфа-синуклеина (Marreiros et al., 2020). Вирус Коксаки В3 индуцирует образование АС-ассоциированных телец включений в нейронах, действующих как триггеры БП (Park et al., 2021). Нейроинвазивный WNV активирует экспрессию АС в нейронах (Beatman et al., 2015).

Была представлена модель, согласно которой индуцированный WNV-вирусом АС локализовался на мембранах эндоплазматического ретикулаума, модулируя индуцированную вирусом передачу стрессовых сигналов и ингибируя размножение вируса (Beatman et al., 2015). В экспериментах с инфицированием мышей вирусом WEEV была выявлена агрегация белков во многих областях головного мозга, в том числе в черной субстанции с потерей дофаминергических нейронов, стойкой активацией микроглии и астроцитов (Bantle et al., 2021). ВИЧ способствует накоплению АС в нейронах, чем объясняется развитие когнитивных и двигательных расстройств у ВИЧ-инфицированных пациентов, среди которых часто окрашивания SNCA/альфа-синуклеином выше, чем у здоровых людей того же возраста (Santerre et al., 2021).

Альфа-синуклеин обладает многими биофизическими характеристиками противовирусных пептидов, связываясь с везикулами, несущими вирусы. Он способствует

устойчивости нейронов к вирусным инфекциям, сигнализируя иммунную систему и привлекая нейтрофилы, макрофаги и активируя дендритные клетки. Отмечено, что хронические инфекции желудочно-кишечного тракта могут привести к накоплению АС с образованием нейротоксических агрегатов, поскольку оттуда АС проникает в ЦНС, обеспечивая иммунитет до заражения (Barbut et al., 2019).

Исследован механизм иммунных ответов, вызванных альфа-синуклеином на РНК-вирусные инфекции. В результате определено, что АС необходим для нейрональной экспрессии генов, стимулируемых интерфероном. Нейроны человека с нокаутом АС не могли индуцировать широкий спектр стимулируемых интерфероном генов. В ядрах обработанных интерфероном нейронов человека накапливается АС, от экспрессии которого зависело интерферон-опосредованное фосфорилирование STAT2, который локализуется совместно с АС после такой стимуляции. В тканях головного мозга пациентов с вирусным (WNV и VEEV) энцефалитом экспрессируются повышенные уровни фосфо-серин129 альфа-синуклеина (Monogue et al., 2022). Проведенный в 2024 г. систематический анализ научной литературы показал, что SARS-CoV-2 вызывает агрегацию АС, способствуя развитию БП путем стабильного связывания альфа-синуклеина с белком S1 и активации АС как части иммунного ответа на инфекцию (Iravanpour et al., 2024).

Прямая роль транспозонов в развитии болезни Паркинсона

Альфа-синуклеин играет критическую физиологическую роль в иммунных реакциях и воспалении. Подобно амилоиду-бета при болезни Альцгеймера, фибриллизация АС представляет собой врожденный иммунитет головного мозга, направленный против вирусов (Vojtechova et al., 2022). Поскольку РЭ имеют эволюционное родство с вирусами (Мустафин, 2018), можно предположить, что мРНК патологически активированных РЭ также содействуют фибриллизации АС. Об этом свидетельствуют результаты исследования брюшной полости, в которой АС участвует в нормальной работе иммунной системы, являясь медиатором иммунных ответов и воспаления (Alam et al., 2022). Подобно экзогенным вирусам, продукты деградации и процессинга транскриптов РЭ представляют собой стимуляторы интерферонового ответа, что способствует развитию воспаления (Gazquez-Gutierrez et al., 2021). Индукторами могут служить не только LINE1, но также неавтономные Alu, которые используют ферменты активированных LINE1 для собственных транспозиций (Elbarbary, Maquat, 2017). Вследствие этого развивается характерное для старения асептическое воспаление (De Sessa et al., 2019), обнаруженное в головном мозге мышей, моделированных по БП (Ghosh et al., 2016).

В головном мозге при БП определяются активация сети иммунных цитокинов и повышение уровня толл-подобного рецептора 3 в ответ на двупочечные РНК. Показано, что антисмысловой олигонуклеотид С3 комплемента, переключающий сплайсинг и содействующий сплайсингу непродуктивной мРНК С3, предотвращает изменения АС (Thomas et al., 2023). Накопление пато-

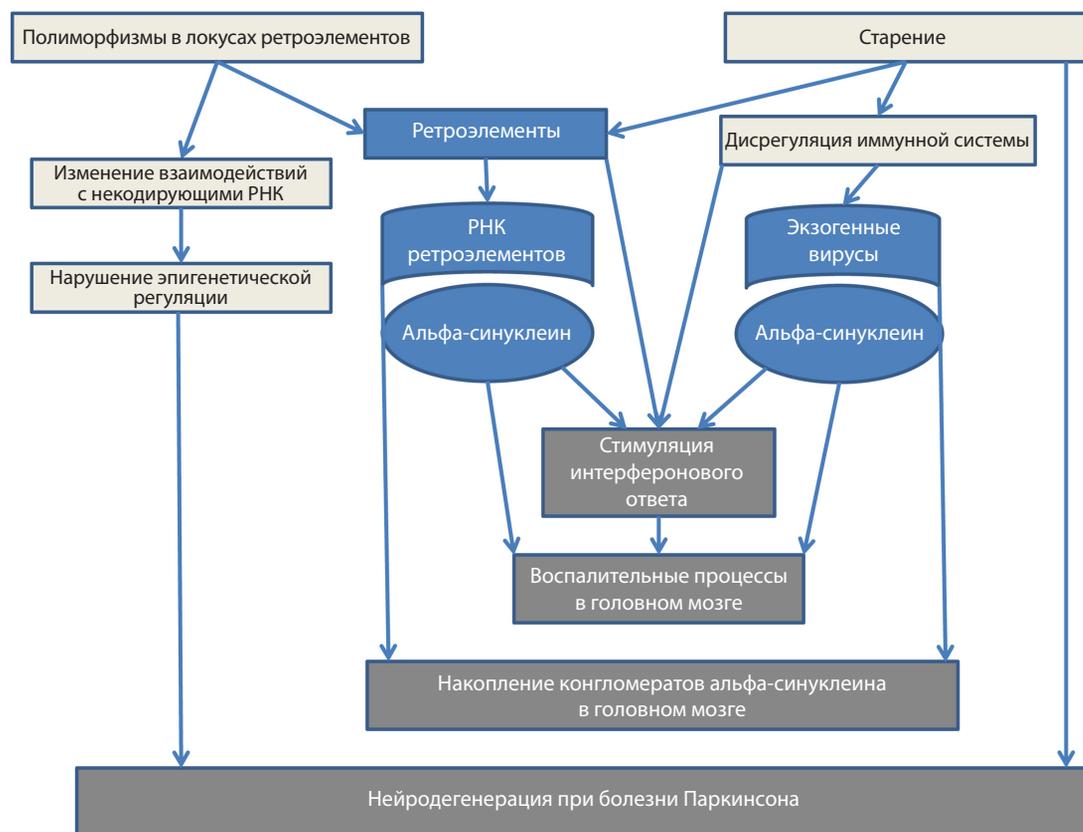


Рис. 1. Схема вовлеченности ретроэлементов в патогенез болезни Паркинсона.

логических агрегатов АС (тельца Леви) при БП может быть связано с неэффективностью воздействия АС на патологически активированные РЭ. В нормальном головном мозге также происходит активация РЭ, но взаимосвязь белков с ними может играть роль в специфических функциях нейронов и глии. Однако при патологических взаимодействиях, обусловленных активацией неспецифических для определенных структур головного мозга РЭ (что обусловлено пространственно-временными особенностями активациями РЭ при дифференцировке нейронов (Mustafin, Khusnutdinova, 2020)), происходит образование белковых конгломератов, особенно под влиянием старения (Gorbunova et al., 2021), вирусов (Jang et al., 2009; Beatman et al., 2015; Marreiros et al., 2020; Park et al., 2021; Leblanc, Vorberg, 2022) и при наличии генетической предрасположенности, обусловленной полиморфизмами в локусах расположения МГЭ (Blauwendraat et al., 2019; Nalls et al., 2019; Ohnmacht et al., 2020) (рис. 1).

Несмотря на грандиозное количество РЭ в геноме человека, лишь незначительная часть из них сохранила способность к транспозициям. Это обусловлено накоплением в ходе эволюции множества инактивирующих мутаций, а сохранение последовательностей – использованием «хозяевами» ретроэлементов в качестве источников регуляторных элементов и генов нкРНК (Mustafin, Khusnutdinova, 2017). Например, LINE1 распределены в геноме человека в виде более 1 млн копий, из которых менее 100 обладают подтвержденной способностью к ретротранспозициям. Такие РЭ называют «RC-LINE1». Помимо этих

RC-LINE1, содержащихся в эталонном геноме, существует небольшое количество неэталонных инсерций LINE1, также способных к перемещениям (Pfaff et al., 2020).

Однако сохранение активности даже сотен РЭ является причиной выраженного инсерционного полиморфизма между индивидуумами, что означает наличие или отсутствие РЭ в определенных областях генома человека. Статистический анализ показал, что новые вставки Alu возникают у каждого 40-го новорожденного, LINE1 – у каждого 63-го, SVA – также у каждого 63-го (Feusier et al., 2019). Проведенное полногеномное секвенирование показало ассоциацию 16 высокоактивных RC-LINE1 с БП по сравнению со здоровым контролем (Pfaff et al., 2020). Был также идентифицирован 81 эталонный SVA, полиморфный по наличию или отсутствию у больных БП, среди которых семь ассоциировали с прогрессированием болезни и специфическими для БП изменениями экспрессии генов (Pfaff et al., 2021).

Присутствие или отсутствие SVA_67, специфического для человека, коррелирует с прогрессированием БП. SVA_67 проявляют регуляторный эффект по всему геному человека, будучи полиморфными по своему домену тандемных повторов с переменным числом (Fröhlich et al., 2024). Анализ полиморфных 2886 Alu, 360 L1, 128 SVA, не входящих в эталонный геном человека, по наличию или отсутствию их при БП по сравнению со здоровым контролем позволил обнаружить РЭ, оказывающие значительное влияние на лонгитюдные изменения в клинически значимых исходах БП (Koks et al., 2022).

Инсерционный полиморфизм LINE1 влияет на прогрессирование БП, так как большинство новых вставок LINE1 способно регулировать экспрессию генов *in trans*. Определена ассоциация с лонгитюдными изменениями прогрессирования БП 70 LINE1 в отношении индикаторов дегенерации и тяжести болезни (Fröhlich et al., 2023). С помощью биоинформационных исследований и данных полногеномного секвенирования 1000 геномов из разных популяций идентифицировано 46 полиморфных вставок HERV-K (Human Endogenous RetroVirus-K). Дальнейший анализ обогащения экспериментальной онтологии факторов показал, что полиморфные инсерции HERV-K (rs12185268, rs17577094, rs17649553, rs183211, rs199515, rs199533, rs415430, rs8070723, rs2395163, rs9275326) ассоциированы с признаками БП (Wallace et al., 2018).

Неаллельная рекомбинация между гомологичными повторяющимися элементами Alu и LINE1 широко распространена в геноме человека с тканеспецифическими особенностями, которые могут действовать в качестве горячих точек рекомбинации. Обнаружена взаимосвязь между рекомбинацией РЭ и геномной нестабильностью при БП (Pascarella et al., 2022). РЭ являются также причинами большинства крупных делеций вследствие негомологичных соединений концов (NHEJ) при моногенных формах БП, обусловленных мутациями в гене *PARK2* (Morais et al., 2016). Определены ассоциированные с БП и дифференциальной экспрессией генов при этом заболевании структурно-вариабельные SVA (SV-SVA), которые связаны с SNP и дифференциальной экспрессией гена *BCKDK*, ассоциированного с риском развития БП. Ген *BCKDK* кодирует киназу дегидрогеназы кетоацетил-С-разветвленной цепи.

Минорный аллель риска rs14235, расположенный в экзоне *BCKDK*, связан с 1.36-кратным увеличением среднего количества телец Леви при БП (Van Bree et al., 2022). В экспериментах на *En^{+/-}* мышцах, моделированных по БП, была выявлена потеря гетерохроматина и повышенная экспрессия LINE1 в дофаминовых нейронах. Дегенерация данных клеток блокировалась за счет прямой репрессии транскрипции с помощью нуклеозидного аналога ингибитора обратной транскриптазы ставудина, направленных на LINE1 малых интерферирующих РНК и экспрессии вирусного *Piwi1*, а также специфического белка *Engrailed*, который напрямую подавляет LINE1 в дофаминергических нейронах. Активация LINE1 способствовала двуцепочечным разрывам ДНК (Blaudin de Thé et al., 2018). В другом исследовании была индуцирована сверхэкспрессия многофакторного белка *Gadd45b*, вовлеченного в деметилирование ДНК, в среднем мозге. При этом нейродегенерации предшествовало повреждение ДНК под влиянием активированных LINE1 с характерными для БП изменениями. Было предположено, что связанные со старением изменения в головном мозге способствуют дегенерации дофаминергических нейронов с потенциальными последствиями для БП (Ravel-Godreuil et al., 2021). РЭ являются также источниками поврежденный ДНК при старении, приводящих к нейродегенерации при БП (Peze-Heidsieck et al., 2022).

На развитие БП влияют также соматические транспозиции в головном мозге, оказывающие воздействие на

биосинтез дофамина, серотонина, 3-метокситирамина, гомованилата, фенэтиламина, таурина (Abrusán, 2012). Получены доказательства того, что при БП интеграции Alu в митохондриальные геномы разрушают популяции этих органелл в нейронах, способствуя прогрессированию нейрональной дисфункции (Larsen et al., 2017). Ингибирование комплекса I митохондриальной цепи при моделировании БП вызывает значительное увеличение экспрессии белка ORF1 элементов LINE1 в дофаминергических LHMES клетках человека. Активация этих РЭ сопровождалась потерей метилирования цитозина ДНК. Данные механизмы блокировались митохондриальным антиоксидантом фенотиразином. Такая активация LINE1 – следствие митохондриального дистресса, характерного для БП (Baeken et al., 2020).

Исследование влияния SVA в составе генов главного комплекса гистосовместимости HLA у больных БП показало, что экспрессируемые аллели генов *SVA* и *HLA* в циркулирующих лейкоцитах по-разному координируются в регуляции иммунных ответов, а также в прогрессировании БП (Kulski et al., 2024). Таким образом, на развитие БП могут влиять структурные полиморфизмы в генах РЭ, особенности распределения РЭ в геноме, отражающиеся на их рекомбинациях и соматических транспозициях (рис. 2).

Роль произошедших от ретроэлементов микроРНК в развитии болезни Паркинсона

Анализ научной литературы об изменениях экспрессии микроРНК, произошедших от РЭ (согласно опубликованному систематическому обзору (Mustafin, Khusnutdinova, 2023)) при БП, позволил обнаружить 35 таких микроРНК (см. таблицу).

Патологическая активация ретроэлементов при БП может влиять на экспрессию произошедших от них микроРНК несколькими путями (рис. 3). Во-первых, активированные РЭ действуют как «губки» для микроРНК путем комплементарного связывания с нуклеотидными последовательностями в связи с их эволюционным родством. Так блокируется влияние РНК-интерференции на мРНК генов-мишеней этих микроРНК (Cornes, Poirier, 2023). Подобный принцип регуляции определен не только у животных, но и у растений. Например, транскрипт LTR-содержащего ретроэлемента *MIKKI* (переводится с корейского языка как «приманка»), экспрессируемый в корнях риса, является имитатором для miR-171, которая дестабилизирует мРНК транскрипционных факторов корня, подобных SCARECROW. Процессированные транскрипты *MIKKI* действуют как ловушки для miR-171, запуская их деградацию и обеспечивая накопление специфичных для корня мРНК транскрипционных факторов (Cho, Paszkowski, 2017).

Во-вторых, транскрипты LTR-содержащих РЭ (Lu et al., 2014) и LINE1 функционируют в качестве молекул длинных нкРНК, взаимодействуя со специфическими участками хроматина и регулируя экспрессию генов, контролируемых молекулами микроРНК (Honson, Macfarlan, 2018).

В-третьих, некоторые микроРНК образуются непосредственно из генов РЭ, которые являются основой для шпилечных структур пре-микроРНК. Такие микроРНК

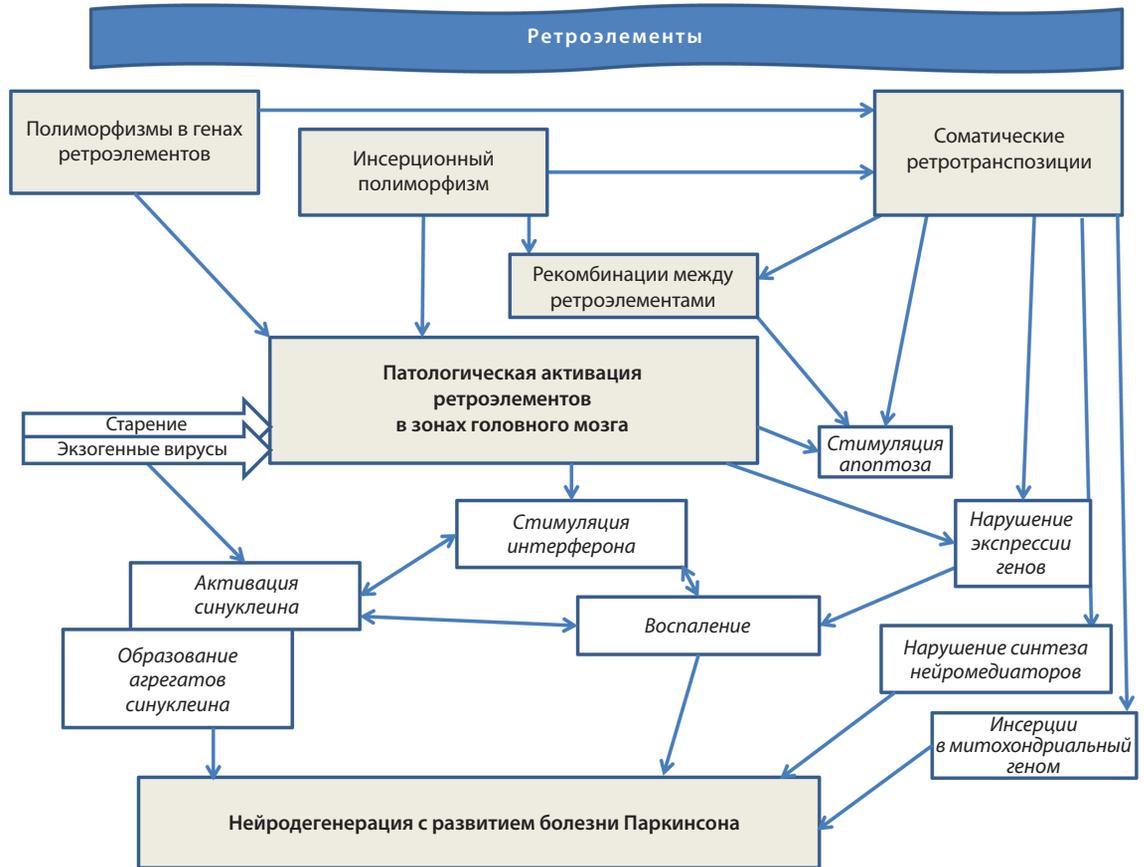


Рис. 2. Механизмы влияния ретроэлементов на развитие болезни Паркинсона.

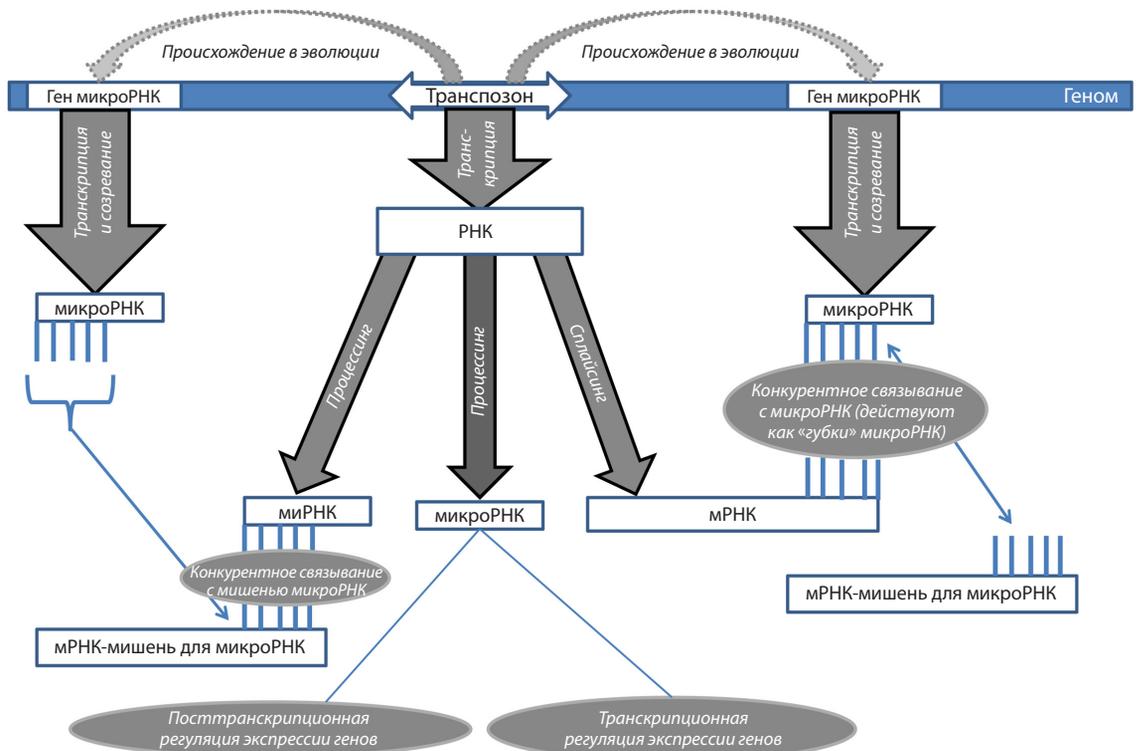


Рис. 3. Схема путей влияния РЭ на произошедшие от них микроРНК.

Произшедшие от ретроэлементов микроРНК, ассоциированные с болезнью Паркинсона

Источник микроРНК	микроРНК/ изменение уровня при болезни/ литературный источник	Функция микроРНК/литературный источник
ERVL-MaRL	miR-1246/ повышен/(Hossain et al., 2022)	Ингибирует экспрессию генов <i>CKS2</i> (регуляторная субъединица циклин-зависимой киназы 2), <i>TAPBP</i> (TAP-связывающий белок)/(Hossain et al., 2022)
LINE2	miR-1249/ повышен/(Soreq et al., 2013)	Регулирует гены <i>VEGFA</i> и <i>HMGGA2</i> /(Chen et al., 2019)
LINE2	miR-1271/ снижен/(Ma, Zhao, 2023)	Подавляет экспрессию генов <i>PAX4</i> , <i>Grb2</i> , <i>NADPH</i> , угнетает пути Wnt/бета-катенина/(Ma, Zhao, 2023)
SINE/Alu	miR-1273/ снижен/(Kamenova et al., 2021)	Регулирует экспрессию генов <i>PDP2</i> /(Kamenova et al., 2021)
SINE/Alu	miR-1303/ снижен/(Boros et al., 2021)	Взаимодействует с днРНК NEAT1/(Boros et al., 2021)
LINE2	miR-151/ снижен/(Martins et al., 2011)	Регулирует экспрессию генов <i>CRK</i> , <i>FAM5C</i> , <i>RBM5</i> , <i>TWIST1</i> /(Martins et al., 2011)
LINE2	miR-211/ повышен/(Motawi et al., 2022)	Регулирует экспрессию гена <i>CHOP</i> /(Motawi et al., 2022)
LINE2	miR-28/ повышен/(He S. et al., 2021)	Подавляет экспрессию гена <i>FOXO</i> /(He S. et al., 2021)
LINE2	miR-31/ повышен/(Li L. et al., 2021)	Регулирует апоптоз за счет потенцирования PI3K/AKT сигналинга/(Li L. et al., 2021)
LINE2	miR-320b/ снижен/(Soreq et al., 2013)	Ингибирует ген <i>FOXM1</i> (кодирует транскрипционный активатор, регулирующий пролиферацию клеток)/(Jingyang et al., 2021)
LINE1	miR-320d/ снижен/(Chatterjee, Roy, 2017)	Подавляет экспрессию гена <i>TUSC3</i> (супрессор опухолей)/(Yufeng et al., 2021)
SINE/MIR	miR-330/ повышен/(Ravandis et al., 2020)	Нацелена на мРНК белков, участвующих в зависимой от активности синаптической пластичности в гиппокампе/(Ravandis et al., 2020)
SINE/MIR	miR-335/ снижен/(Oliveira et al., 2021)	Подавляет экспрессию гена <i>LRRK2</i> /(Oliveira et al., 2021)
SINE/tRNA-RTE	miR-342/ повышен/(Wu et al., 2019)	Подавляет экспрессию генов <i>PAK1</i> , <i>GLT1</i> , <i>GLAST</i> , <i>TH</i> , сигнальные пути Wnt и антиапоптозные гены/(Wu et al., 2019)
LINE2	miR-374a/ повышен/(He S. et al., 2021)	Ингибирует трансляцию мРНК гена <i>Wnt5a</i> /(Sun et al., 2018)
LINE2	miR-374b/ повышен/(He S. et al., 2021)	Ингибирует трансляцию мРНК гена <i>Wnt5a</i> /(Sun et al., 2018)
LINE2	miR-421/ повышен/(Dong et al., 2021)	Ингибирует трансляцию мРНК гена <i>MEF2D</i> (кодирует миоцитспецифический энхансерный фактор 2)/(Dong et al., 2021)
SINE/tRNA	miR-4293/ снижен/(Soreq et al., 2013)	Ингибирует экспрессию гена <i>WFDC21P</i> /(Zhang Q. et al., 2021)
SINE/MIR	miR-4317/ повышен/(Soreq et al., 2013)	Подавляет экспрессию генов <i>FGF9</i> и <i>CCND2</i> /(He X. et al., 2018)
LINE1	miR-450b/ повышен/(Khoo et al., 2012)	Ингибирует экспрессию гена <i>KIF26B</i> (кодирует внутриклеточный белок, транспортирующий органеллы по микротрубочкам)/(Li H. et al., 2019)
LINE1	miR-466/ повышен/(Kamenova et al., 2021)	Ингибирует экспрессию генов <i>PPARGC1A</i> и <i>GSK3B</i> /(Kamenova et al., 2021)
SINE/MIR	miR-487b/ снижен/(Kern et al., 2021)	Подавляет воспаление и апоптоз нейронов за счет таргетного воздействия на мРНК гена <i>Ifitm3</i> /(Tong et al., 2022)
LINE2	miR-493/ снижен/(Kern et al., 2021)	Напрямую воздействует на мРНК гена <i>Wnt5A</i> , ингибирует p-PI3K/p-AKT и c-JUN с усилением p21/(Bian et al., 2021)
ERV-L	miR-495/ повышен/(Ravandis et al., 2020)	Ингибирует экспрессию гена <i>CDK1</i> , кодирующего серин/треониновую протеинкиназу фактора перехода G2/M в клеточном цикле/(Tang et al., 2021)
SINE/Alu	miR-5095/ повышен/(Kamenova et al., 2021)	Подавляет экспрессию генов <i>LRP10</i> , <i>PRKN</i> , <i>RBBP5</i> , <i>SLC14A1</i> /(Kamenova et al., 2021)
SINE/Alu	miR-520d/ повышен/(Jin et al., 2018)	Ингибирует экспрессию церулоплазмينا/(Jin et al., 2018)

Окончание таблицы

Источник микроРНК	микроРНК/ изменение уровня при болезни/ литературный источник	Функция микроРНК/литературный источник
LINE1	miR-576/ повышен/(Liu et al., 2023)	Ингибирует ген <i>SGK1</i> , кодирующий серин/треониновую протеинкиназу, ответственную за стрессовые реакции и возбудимость нейронов/(Greenawalt et al., 2019)
ERV-L/MaLR	miR-585/ повышен/(Zhang Y. et al., 2020)	Регулирует PIK3R3 (фосфатидилинозитол-3-киназу), влияя на апоптоз/(Zhang Y. et al., 2020)
SINE/Alu	miR-6088/ повышен/(Marsh et al., 2016)	Регулирует ДНК-полимеразу η (POLH)/(Sonobe et al., 2024)
LINE1	miR-619/ повышен/(Cai et al., 2021)	Ингибирует экспрессию генов <i>LRP10</i> , <i>PRKN</i> , <i>RBBP5</i> , <i>SLC14A1</i> /(Kamenova et al., 2021)
LINE1	miR-625/ снижен/(Zhong et al., 2023)	Ингибирует экспрессию гена <i>HMGA1</i> /(Zhong et al., 2023)
LINE1	miR-626/ снижен/(Qin et al., 2021)	Подавляет экспрессию гена <i>LRRK2</i> /(Qin et al., 2021)
LINE/CR1	miR-769/ снижен/(Soreq et al., 2013)	Регулирует ген <i>HEY1</i> (кодирует белок семейства базовых репрессоров транскрипции типа спираль-петля-спираль)/(Han et al., 2018)
SINE/MIR	miR-885/ повышен/(Behbahanipour et al., 2019)	Ингибирует экспрессию гена <i>GF-1</i> , влияя на сигнальные пути PI3K/Atk/GSK-3 β , CTNNB1 (ключевой регуляторный белок сигналинга Wnt)/(Behbahanipour et al., 2019)
LINE2	miR-95/ повышен/(Nair, Ge, 2016)	Регулирует экспрессию генов глутаматных ионотропных рецепторов <i>GR1D1</i> и <i>GR1A2</i> , метаболитных рецепторов <i>GRM4</i> /(Nair, Ge, 2016)

приводят к пространственно-временным динамическим сетям экспрессии, для анализа которых было создано веб-приложение Brain miRTE Explorer (Playfoot et al., 2022). Поэтому патологическая активация РЭ приводит к образованию различных микроРНК из их транскриптов, влияющих на регуляторные сети других микроРНК в организме.

В-четвертых, РЭ оказывают регуляторное воздействие на микроРНК за счет образования малых интерферирующих РНК (миРНК) из транскриптов РЭ. При этом миРНК являются конкурентными молекулами для связывания с мРНК-мишенями для микроРНК, нивелируя их воздействие на экспрессию генов. Этот эффект связан с защитными системами клеток хозяев против активированных РЭ в их геномах, запуская деградацию транскриптов РЭ рибонуклеазами до миРНК. Последние оказывают посттранскрипционное ингибирование мРНК генов за счет частичной комплементарности (McCue et al., 2013).

В-пятых, один из путей взаимодействий микроРНК с РЭ в регуляции активности генов – также подавление их экспрессии при связывании микроРНК со специфическими структурами ДНК, образованными благодаря встроенным в эти области РЭ.

В геноме человека Z-форма ДНК образуется эндогенными ретровирусами, которые обеспечивают функциональные гены альтернативными промоторами (Lee et al., 2022). Кроме того, у человека описан феномен РНК-направленного метилирования ДНК (RdDM), за счет которого образованные из транскриптов РЭ микроРНК (Playfoot et al., 2022) и миРНК (McCue et al., 2013) могут воздействовать на экспрессию РЭ путем комплементарного взаимодействия последовательностей в структуре генома (Chalertpet et al., 2019).

Заключение

Представленные в обзоре данные позволяют предположить, что развитие БП обусловлено активацией РЭ в результате индивидуальных особенностей их распределения и расположения в них полиморфизмов, ассоциированных с БП. Об этом свидетельствуют описанные в статье факты.

1. Получены результаты научных исследований об ассоциации специфических наборов RC-LINE1 с БП.
2. Обнаружено влияние инсерционного полиморфизма LINE1 на развитие БП.
3. Определено значение 360 LINE1, 128 SVA и 2886 Alu в прогрессировании БП.
4. БП ассоциирована со старением, которое характеризуется активацией РЭ и связанными с этим процессом воспалением и нейродегенерацией.
5. Выявлено 35 произошедших от РЭ микроРНК, экспрессия которых достоверно изменена при БП.
6. Обнаружена роль распределения Alu в геноме в качестве источников мутаций при БП.
7. Определено влияние инсерций Alu в геномы митохондрий на прогрессирование БП.
8. Описана роль синуклеина в противовирусной защите, с влиянием вирусов на образование агрегатов данного белка.

Сходным образом транскрипты патологически активированных РЭ, эволюционно родственные экзогенным и вирусам и взаимодействующие с ними, могут стимулировать экспрессию и фибриллизацию синуклеина. Вероятной причиной поражения именно черной субстанции являются пространственно-временные особенности активации специфических РЭ в нейронах головного мозга, что отражается и на результатах их патологической активации в определенных наиболее уязвимых для этого зонах.

Список литературы / References

- Mustafin R.N. Гипотеза происхождения вирусов от транспозонов. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2018; 36(4):182-190. doi 10.17116/molgen201836041182
[Mustafin R.N. The hypothesis of the origin of viruses from transposons. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2018;33(4):223-232. doi 10.3103/S0891416818040067]
- Abrusán G. Somatic transposition in the brain has the potential to influence the biosynthesis of metabolites involved in Parkinson's disease and schizophrenia. *Biol Direct.* 2012;7:41. doi 10.1186/1745-6150-7-41
- Alam M.M., Yang D., Li X.-Q., Liu J., Back T.C., Trivett A., Karim B., Barbut D., Zasloff M., Oppenheim J.J. Alpha synuclein, the culprit in Parkinson disease, is required for normal immune function. *Cell Rep.* 2022;38(2):110090. doi 10.1016/j.celrep.2021.110090
- Baeken M.W., Moosmann B., Hajieva P. Retrotransposon activation by distressed mitochondria in neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;525(3):570-575. doi 10.1016/j.bbrc.2020.02.106
- Bantle C.M., Rocha S.M., French C.T., Phillips A.T., Tran K., Olson K.E., Bass T.A., Aboellail T., Smeyne R.J., Tjalkens R.B. Astrocyte inflammatory signaling mediates α -synuclein aggregation and dopaminergic neuronal loss following viral encephalitis. *Exp Neurol.* 2021;346:113845. doi 10.1016/j.expneurol.2021.113845
- Barbut D., Stolzenberg E., Zasloff M. Gastrointestinal immunity and alpha-synuclein. *J Parkinsons Dis.* 2019;9(s2):S313-S322. doi 10.3233/JPD-191702
- Beatman E.L., Massey A., Shives K.D., Burrack K.S., Chamanian M., Morrison T.E., Beckham J.D. Alpha-synuclein expression restricts RNA viral infections in the brain. *J Virol.* 2015;90(6):2767-82. doi 10.1128/JVI.02949-15
- Behbahani-pour M., Peymani M., Salari M., Hashemi M.S., Nasr-Esfahani M.H., Ghaedi K. Expression profiling of blood microRNAs 885, 361, and 17 in the patients with the Parkinson's disease: integrating interaction data to uncover the possible triggering age-related mechanisms. *Sci Rep.* 2019;9(1):13759. doi 10.1038/s41598-019-50256-3
- Bian W., Li Y., Zhu H., Gao S., Niu R., Wang C., Zhang H., Qin X., Li S. miR-493 by regulating of c-Jun targets Wnt5a/PD-L1-inducing esophageal cancer cell development. *Thorax Cancer.* 2021;12(10):1579-1588. doi 10.1111/1759-7714.13950
- Blaudin de Thé F.X., Rekaik H., Peze-Heidsieck E., Massiani-Beaudoin O., Joshi R.L., Fuchs J., Prochiantz A. Engrailed homeoprotein blocks degeneration in adult dopaminergic neurons through LINE-1 repression. *EMBO J.* 2018;37(15):e97374. doi 10.15252/emboj.201797374
- Blauwendraat C., Heilbron K., Vallerga C.L., Bandres-Ciga S., von Coelln R., Pihlstrom L., Simón-Sánchez J., Schulte C., Sharma M., Krohn L., Siitonen A., Iwaki H., Leonard H., Noyce A.J., Tan M., Gibbs J.R., Nalls M.A., Singleton A.B.; International Parkinson's Disease Genomics Consortium (IPDGC). Parkinson's disease age at onset genome-wide association study: defining heritability, genetic loci, and α -synuclein mechanisms. *Mov Disord.* 2019;34(6):866-875. doi 10.1002/mds.27659
- Boros F.A., Vecsei L., Klivenyi P. NEAT1 on the field of Parkinson's disease: offence, defense, or a player on the bench? *J Parkinson's Dis.* 2021;11(1):123-138. doi 10.3233/JPD-202374
- Cai M., Chai S., Xiong T., Wei J., Mao W., Zhu Y., Li X., Wei W., Dai X., Yang B., Liu W., Shu B., Wang M., Lu T., Cai Y., Zheng Z., Mei Z., Zhou Y., Yang J., Zhao J., Shen L., Ho J.W.K., Chen J., Xiong N. Aberrant expression of circulating microRNA leads to the dysregulation of alpha-synuclein and other pathogenic genes in Parkinson's disease. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:695007. doi 10.3389/fcell.2021.695007
- Chalertpet K., Pin-On P., Aporntewan C., Patchesung M., Ingrungruan-glert P., Israsena N., Mutirangura A. Argonaute 4 as an effector protein in RNA-directed DNA methylation in human cells. *Front Genet.* 2019;10:645. doi 10.3389/fgene.2019.00645
- Chatterjee P., Roy D. Comparative analysis of RNA-Seq data from brain and blood samples of Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;484(3):557-564. doi 10.1016/j.bbrc.2017.01.121
- Chen X., Zeng K., Xu M., Liu X., Hu X., Xu T., He B., Pan Y., Sun H., Wang S. P53-induced miR-1249 inhibits tumor growth, metastasis, and angiogenesis by targeting VEGFA and HMG2. *Cell Death Dis.* 2019;10(2):131. doi 10.1038/s41419-018-1188-3
- Cho J., Paszkowski J. Regulation of rice root development by a retrotransposon acting as a microRNA sponge. *eLife.* 2017;6:e30038. doi 10.7554/eLife.30038
- Cornec A., Poirier E.Z. Interplay between RNA interference and transposable elements in mammals. *Front Immunol.* 2023;14:1212086. doi 10.3389/fimmu.2023.1212086
- De Cecco M., Ito T., Petrashen A.P., Elias A.E., Skvir N.J., Sedivy J.M. L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature.* 2019;566(7742):73-78. doi 10.1038/s41586-018-0784-9
- de Koning A.P., Gu W., Castoe T.A., Batzer M.A., Pollock D.D. Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. *PLoS Genet.* 2011;7:e1002384. doi 10.1371/journal.pgen.1002384
- Dong Y., Xiong J., Ji L., Xue X. MiR-421 aggravates neurotoxicity and promotes cell death in Parkinson's disease models by directly targeting MEF2D. *Neurochem Res.* 2021;46(2):299-308. doi 10.1007/s11064-020-03166-0
- Elbarbary R.A., Maquat L.E. Distinct mechanisms obviate the potentially toxic effects of inverted-repeat Alu elements on cellular RNA metabolism. *Nat Struct Mol Biol.* 2017;24(6):496-498. doi 10.1038/nsmb.3416
- Feusier J., Watkins W.S., Thomas J., Farrell A., Witherspoon D.J., Baird L., Ha H., Xing J., Jorde L.B. Pedigree-based estimation of human mobile element retrotransposition rates. *Genome Res.* 2019; 29(10):1567-1577. doi 10.1101/gr.247965.118
- Fröhlich A., Pfaff A.L., Bubb V.J., Quinn J.P., Koks S. Reference LINE-1 insertion polymorphisms correlate with Parkinson's disease progression and differential transcript expression in the PPMI cohort. *Sci Rep.* 2023;13(1):13857. doi 10.1038/s41598-023-41052-1
- Fröhlich A., Pfaff A.L., Middlehurst B., Hughes L.S., Bubb V.J., Quinn J.P., Koks S. Deciphering the role of a SINE-VNTR-Alu retrotransposon polymorphism as a biomarker of Parkinson's disease progression. *Sci Rep.* 2024;14(1):10932. doi 10.1038/s41598-024-61753-5
- Gazquez-Gutierrez A., Witteveldt J., Heras S.R., Macias S. Sensing of transposable elements by the antiviral innate immune system. *RNA.* 2021;27(7):735-752. doi 10.1261/ma.078721.121
- Ghosh A., Tyson T., George S., Hildebrandt E.N., Steiner J.A., Madaj Z., Schulz E., Machiela E., McDonald W.G., Escobar Galvis M.L., Kordower J.H., Van Raamsdonk J.M., Colca J.R., Brundin P. Mitochondrial pyruvate carrier regulates autophagy, inflammation, and neurodegeneration in experimental models of Parkinson's disease. *Sci Transl Med.* 2016;8(368):368ra174. doi 10.1126/scitranslmed.aag2210
- Gorbunova V., Seluanov A., Mita P., McKerrow W., Fenyö D., Boeke J.D., Linker S.B., Gage F.H., Kreiling J.A., Petrashen A.P., Woodham T.A., Taylor J.R., Helfand S.L., Sedivy J.M. The role of retrotransposable elements in ageing and age-associated diseases. *Nature.* 2021;596(7870):43-53. doi 10.1038/s41586-021-03542-y
- Greenawalt E.J., Edmonds M.D., Jain N., Adams C.M., Mitra R., Eischen C.M. Targeting of SGK1 by miR-576-3p inhibits lung adenocarcinoma migration and invasion. *Mol Cancer Res.* 2019; 17(1):289-298. doi 10.1158/1541-7786.MCR-18-0364
- Han C., Song Y., Lian C. MiR-769 inhibits colorectal cancer cell proliferation and invasion by targeting HEY1. *Med Sci Monit.* 2018; 24:9232-9239. doi 10.12659/MSM.911663
- He S., Huang L., Shao C., Nie T., Xia L., Cui B., Lu F., Zhu L., Chen B., Yang Q. Several miRNAs derived from serum extracellular vesicles are potential biomarkers for early diagnosis and progression of Par-

- kinson's disease. *Transl Neurodegener.* 2021;10(1):25. doi 10.1186/s40035-021-00249-y
- He X., Chen S.Y., Yang Z., Zhang J., Wang W., Liu M.Y., Niu Y., Wei X.M., Li H.M., Hu W.N., Sun G.G. miR-4317 suppresses non-small cell lung cancer (NSCLC) by targeting fibroblast growth factor 9 (FGF9) and cyclin D2 (CCND2). *J Exp Clin Cancer Res.* 2018; 37(1):230. doi 10.1186/s13046-018-0882-4
- Honson D.D., Macfarlan T.S. A lncRNA-like role for LINE1s in development. *Dev Cell.* 2018;46:132-134. doi 10.1016/j.devcel.2018.06.022
- Hossain M.B., Islam M.K., Adhikary A., Rahaman A., Islam M.Z. Bioinformatics approach to identify significant biomarkers, drug targets shared between Parkinson's disease and bipolar disorder: a pilot study. *Bioinform Biol Insights.* 2022;16:11779322221079232. doi 10.1177/11779322221079232
- Iraivanpour F., Farrokhi M.R., Jafarinaia M., Olliaee R.T. The effect of SARS-CoV-2 on the development of Parkinson's disease: the role of α -synuclein. *Hum Cell.* 2024;37(1):1-8. doi 10.1007/s13577-023-00988-2
- Jang H., Boltz D.A., Webster R.G., Smeyne R.J. Viral parkinsonism. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792(7):714-721. doi 10.1016/j.bbadis.2008.08.001
- Jin L., Wan W., Wang L., Wang C., Xiao J., Zhang F., Zhao J., Wang J., Zhan C., Zhong C. Elevated microRNA-520d-5p in the serum of patients with Parkinson's disease, possibly through regulation of ceruloplasmin expression. *Neurosci Lett.* 2018;687:88-93. doi 10.1016/j.neulet.2018.09.034
- Jingyang Z., Jinhui C., Lu X., Weizhong Y., Yunjiu L., Haihong W., Wuyuan Z. Mir-320b inhibits pancreatic cancer cell proliferation by targeting FOXM1. *Curr Pharm Biotechnol.* 2021;22(8):1106-1113. doi 10.2174/1389201021999200917144704
- Kamenova S., Aralbayeva A., Kondybayeva A., Akimniyazova A., Pyrkova A., Ivashchenko A. Evolutionary changes in the interactions of miRNA with mRNA of candidate genes for Parkinson's disease. *Front Genet.* 2021;12:647288. doi 10.3389/fgene.2021.647288
- Kern F., Fehlmann T., Violich I., Alsop E., Hutchins E., Kahraman M., Grammes N.L., Guimarães P., Backes C., Poston K.L., Casey B., Balling R., Geffers L., Krüger R., Galasko D., Mollenhauer B., Meese E., Wyss-Coray T., Craig D.W., Van Keuren-Jensen K., Keller A. Deep sequencing of snRNAs reveals hallmarks and regulatory modules of the transcriptome during Parkinson's disease progression. *Nat Aging.* 2021;1(3):309-322. doi 10.1038/s43587-021-00042-6
- Khoo S.K., Petillo D., Kang U.J., Resau J.H., Berryhill B., Linder J., Forsgren L., Neuman L.A., Tan A.C. Plasma-based circulating MicroRNA biomarkers for Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis.* 2012;2(4):321-331. doi 10.3233/JPD-012144
- Koks S., Pfaff A.L., Singleton L.M., Bubbs V.J., Quinn J.P. Non-reference genome transposable elements (TEs) have a significant impact on the progression of the Parkinson's disease. *Exp Biol Med (Maywood).* 2022;247(18):1680-1690. doi 10.1177/15353702221117147
- Kulski J.K., Suzuki S., Shiina T., Pfaff A.L., Kōks S. Regulatory SVA retrotransposons and classical HLA genotyped-transcripts associated with Parkinson's disease. *Front Immunol.* 2024;15:1349030. doi 10.3389/fimmu.2024.1349030
- Larsen P.A., Lutz M.W., Hunnicutt K.E., Mihovilovic M., Saunders A.M., Yoder A.D., Roses A.D. The *Alu* neurodegeneration hypothesis: a primate-specific mechanism for neuronal transcription noise, mitochondrial dysfunction, and manifestation of neurodegenerative disease. *Alzheimers Dement.* 2017;13(7):828-838. doi 10.1016/j.jalz.2017.01.017
- Leblanc P., Vorberg I.M. Viruses in neurodegenerative diseases: more than just suspects in crimes. *PLoS Pathog.* 2022;18(8):e1010670. doi 10.1371/journal.ppat.1010670
- Lee D.H., Bae W.H., Ha H., Park E.G., Lee Y.J., Kim W.R., Kim H.S. Z-DNA-containing long terminal repeats of human endogenous retrovirus families provide alternative promoters for human functional genes. *Mol Cells.* 2022;45(8):522-530. doi 10.14348/molcells.2022.0060
- Li H., Shen S., Chen X., Ren Z., Li Z., Yu Z. miR-450b-5p loss mediated KIF26B activation promoted hepatocellular carcinoma progression by activating PI3K/AKT pathway. *Cancer Cell Int.* 2019;19:205. doi 10.1186/s12935-019-0923-x
- Li L., Ren J., Pan C., Li Y., Xu J., Dong H., Chen Y., Liu W. Serum miR-214 serves as a biomarker for prodromal Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci.* 2021;13:700959. doi 10.3389/fgene.2021.700959
- Liu T., Yang Z., Liu S., Wei J. Parkinson's disease as a risk factor for prostate adenocarcinoma: a molecular point of view. *Gerontology.* 2023;69(8):986-1001. doi 10.1159/000530088
- Lu X., Sachs F., Ramsay L., Jacques P.E., Goke J., Bourque G., Ng H.H. The retrovirus HERVH is a long noncoding RNA required for human embryonic stem cell identity. *Nat Struct Mol Biol.* 2014;21(4):423-425. doi 10.1038/nsmb.2799
- Ma Y.M., Zhao L. Mechanism and therapeutic prospect of miRNAs in neurodegenerative diseases. *Behav Neurol.* 2023;2023:8537296. doi 10.1155/2023/8537296
- Marreiros R., Muller-Schiffmann A., Trossbach S.V., Prikulis I., Hansch S., Weidtkamp-Peters S., Moreira A.R., Sahu S., Soloviev I., Selvarajah S., Lingappa V.R., Korth C. Disruption of cellular proteostasis by H1N1 influenza A virus causes alpha-synuclein aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020;117(12):6741-6751. doi 10.1073/pnas.1906466117
- Marsh A.G., Cottrell M.T., Goldman M.F. Epigenetic DNA methylation profiling with MSRE: a quantitative NGS approach using a Parkinson's Disease test case. *Front Genet.* 2016;7:191. doi 10.3389/fgene.2016.00191
- Martins M., Rosa A., Guedes L.C., Fonseca B.V., Oliveira S.A. Convergence miRNA expression profiling, α -synuclein interaction and GWAS in Parkinson's disease. *PLoS One.* 2011;6(10):e25443. doi 10.1371/journal.pone.0025443
- McCue A.D., Nuthikattu S., Slotkin R.K. Genome-wide identification of genes regulated in trans by transposable element small interfering RNAs. *RNA Biol.* 2013;10:1379-1395. doi 10.4161/rna.25555
- Monogue B., Chen Y., Sparks H., Behbehani R., Chai A., Rajic A.J., Massey A., Kleinschmidt-Demasters B.K., Vermeren M., Kunath T., Beckham J.D. Alpha-synuclein supports type 1 interferon signalling in neurons and brain tissue. *Brain.* 2022;145(10):3622-3636. doi 10.1093/brain/awac192
- Morais S., Bastos-Ferreira R., Sequeiros J., Alonso I. Genomic mechanisms underlying *PARK2* large deletions identified in a cohort of patients with PD. *Neurol Genet.* 2016;2:e73. doi 10.1212/NXG.0000000000000073
- Motawi T.K., Al-Kady R.H., Abdelraouf S.M., Senousy M.A. Empagliflozin alleviates endoplasmic reticulum stress and augments autophagy in rotenone-induced Parkinson's disease in rats: Targeting the GRP78/PERK/eIF2 α /CHOP pathway and miR-211-5p. *Chem Biol Interact.* 2022;362:110002. doi 10.1016/j.cbi.2022.110002
- Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. Non-coding parts of genomes as the basis of epigenetic heredity. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov J Genet Breed.* 2017;2017;21(6):742-749. doi 10.18699/VJ17.30-o (in Russian)
- Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. Involvement of transposable elements in neurogenesis. *Vavilov J Genet Breed.* 2020;24(2):209-218. doi 10.18699/VJ20.613
- Mustafin R.N., Khusnutdinova E. Perspective for studying the relationship of miRNAs with transposable elements. *Curr Issues Mol Biol.* 2023;45(4):3122-3145. doi 10.3390/cimb45040204
- Nair V.D., Ge Y. Alterations of miRNAs reveal a dysregulated molecular regulatory network in Parkinson's disease striatum. *Neurosci Lett.* 2016;629:99-104. doi 10.1016/j.neulet.2016.06.061
- Nalls M.A., Blauwendraat C., Vallerga C.L., Heilbron K., Bandres-Ciga S., Chang D., Tan M., Iwaki H.; 23andMe Research Team; System Genomics of Parkinson's Disease Consortium; International Parkinson's Disease Genomics Consortium. Identification of novel

- risk loci, causal insights, and heritable risk for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet Neurol.* 2019;18(12):1091-1102. doi 10.1016/S1474-4422(19)30320-5
- Nurk S., Koren S., Rhie A., Rautiainen M., Bzikadze A.V., Mikheenko A., Vollger M.R., Altemose N., Uralsky L., Gershman A., Miga K.H., Philippy A.M. The complete sequence of a human genome. *Science.* 2022;376(6588):44-53. doi 10.1126/science.abj6987
- Ohnmacht J., May P., Sinkkonen L., Krüger R. Missing heritability in Parkinson's disease: the emerging role of non-coding genetic variation. *J Neural Transm (Vienna).* 2020;127(5):729-748. doi 10.1007/s00702-020-02184-0
- Oliveira S.R., Dionísio P.A., Gaspar M.M., Correia Guedes L., Coelho M., Rosa M.M., Ferreira J.J., Amaral J.D., Rodrigues C.M.P. miR-335 targets LRRK2 and mitigates inflammation in Parkinson's disease. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:661461. doi 10.3389/fcell.2021.661461
- Park S.J., Jin U., Park S.M. Interaction between coxsackievirus B3 infection and alpha-synuclein in models of Parkinson's disease. *PLoS Pathog.* 2021;17(10):e1010018. doi 10.1371/journal.ppat.1010018
- Pascarella G., Hon C.C., Hashimoto K., Buscho A., Luginbuhl J., Parr C., Yip W.H., Abe K., Kratz A., Bonetti A., Agostini F., Severin J., Murayama S., Suzuki Y., Gustinich S., Frith M., Carninci P. Recombination of repeat elements generates somatic complexity in human genomes. *Cell.* 2022;185(16):3025-3040.e6. doi 10.1016/j.cell.2022.06.032
- Peze-Heidsieck E., Bonnifet T., Znaidi R., Ravel-Godreuil C., Massiani-Beaudoin O., Joshi R.L., Fuchs J. Retrotransposons as a source of DNA damage in neurodegeneration. *Front Aging Neurosci.* 2022;13:786897. doi 10.3389/fnagi.2021.786897
- Pfaff A.L., Bubb V.J., Quinn J.P., Koks S. An increased burden of highly active retrotransposition competent 11s is associated with Parkinson's disease risk and progression in the PPMI cohort. *Int J Mol Sci.* 2020;21(18):6562. doi 10.3390/ijms21186562
- Pfaff A.L., Bubb V.J., Quinn J.P., Koks S. Reference SVA insertion polymorphisms are associated with Parkinson's disease progression and differential gene expression. *NPJ Parkinsons Dis.* 2021;7(1):44. doi 10.1038/s41531-021-00189-4
- Playfoot C.J., Sheppard S., Planet E., Trono D. Transposable elements contribute to the spatiotemporal microRNA landscape in human brain development. *RNA.* 2022;28:1157-1171. doi 10.1261/rna.079100.122
- Qin L.X., Tan J.Q., Zhang H.N., Tang J.G., Jiang B., Shen X.M., Guo J.F., Tan L.M., Tang B., Wang C.Y. Preliminary study of hsa-miR-626 change in the cerebrospinal fluid in Parkinson's disease. *Neurol India.* 2021;69(1):115-118. doi 10.4103/0028-3886.310102
- Ravanidis S., Bougea A., Papagiannakis N., Koros C., Simitsi A.M., Pachi I., Breza M., Stefanis L., Doxakis E. Validation of differentially expressed brain-enriched microRNAs in the plasma of PD patients. *Ann Clin Transl Neurol.* 2020;7(9):1594-1607. doi 10.1002/acn3.51146
- Ravel-Godreuil C., Massiani-Beaudoin O., Maily P., Prochiantz A., Joshi R.L., Fuchs J. Perturbed DNA methylation by Gadd45b induces chromatin disorganization, DNA strand breaks and dopaminergic neuron death. *iScience.* 2021;24(7):102756. doi 10.1016/j.isci.2021.102756
- Santerre M., Arjona S.P., Allen C.N., Callen S., Buch S., Sawaya B.E. HIV-1 Vpr protein impairs lysosome clearance causing SNCA/alpha-synuclein accumulation in neurons. *Autophagy.* 2021;17(7):1768-1782. doi 10.1080/15548627.2021.1915641
- Sonobe R., Yang P., Suzuki M.M., Shinjo K., Iijima K., Nishiyama N., Miyata K., Kataoka K., Kajiyama H., Kondo Y. Long noncoding RNA *TUG1* promotes cisplatin resistance in ovarian cancer via upregulation of DNA polymerase eta. *Cancer Sci.* 2024;115(6):1910-1923. doi 10.1111/cas.16150
- Soreq L., Salomonis N., Bronstein M., Greenberg D.S., Israel Z., Bergman H., Soreq H. Small RNA sequencing-microarray analyses in Parkinson leukocytes reveal deep brain stimulation-induced splicing changes that classify brain region transcriptomes. *Front Mol Neurosci.* 2013;6:10. doi 10.3389/fnfmol.2013.00010
- Sun Z., Chen J., Zhang J., Ji R., Xu W., Zhang X., Qian H. The role and mechanism of miR-374 regulating the malignant transformation of mesenchymal stem cells. *Am J Transl Res.* 2018;10(10):3224-3232
- Tang J., Pan H., Wang W., Qi C., Gu C., Shang A., Zhu J. MiR-495-3p and miR-143-3p co-target CDK1 to inhibit the development of cervical cancer. *Clin Transl Oncol.* 2021;23(11):2323-2334. doi 10.1007/s12094-021-02687-6
- Thomas R., Connolly K.J., Brekk O.R., Hinrich A.J., Hastings M.L., Isacson O., Hallett P.J. Viral-like TLR3 induction of cytokine networks and alpha-synuclein are reduced by complement C3 blockade in mouse brain. *Sci Rep.* 2023;13(1):15164. doi 10.1038/s41598-023-41240-z
- Tong D., Zhao Y., Tang Y., Ma J., Wang M., Li B., Wang Z., Li C. MiR-487b suppressed inflammation and neuronal apoptosis in spinal cord injury by targeted *Ifitm3*. *Metab Brain Dis.* 2022;37(7):2405-2415. doi 10.1007/s11011-022-01015-3
- Van Bree E.J., Guimarães R.L.F.P., Lundberg M., Blujdea E.R., Rosenkrantz J.L., White F.T.G., Poppinga J., Ferrer-Raventós P., Schneider A.E., Clayton I., Haussler D., Reinders M.J.T., Holstege H., Ewing A.D., Moses C., Jacobs F.M.J. A hidden layer of structural variation in transposable elements reveals potential genetic modifiers in human disease-risk loci. *Genome Res.* 2022;32(4):656-670. doi 10.1101/gr.275515.121
- Vojtechova I., Machacek T., Kristofikova Z., Stuchlik A., Petrasek T. Infectious origin of Alzheimer's disease: amyloid beta as a component of brain antimicrobial immunity. *PLoS Pathog.* 2022;18(11):e1010929. doi 10.1371/journal.ppat.1010929
- Wallace A.D., Wendt G.A., Barcellos L.F., de Smith A.J., Walsh K.M., Metayer C., Costello J.F., Wiemels J.L., Francis S.S. To ERV is human: a phenotype-wide scan linking polymorphic human endogenous Retrovirus-K insertions to complex phenotypes. *Front Genet.* 2018;9:298. doi 10.3389/fgene.2018.00298
- Wang H., Liu X., Tan C., Zhou W., Jiang J., Peng W., Zhou X., Mo L., Chen L. Bacterial, viral, and fungal infection-related risk of Parkinson's disease: meta-analysis of cohort and case-control studies. *Brain Behav.* 2020;10(3):e01549. doi 10.1002/brb3.1549
- Wu D.M., Wang S., Wen X., Han X.R., Wang Y.J., Shen M., Fan S.H., Zhuang J., Zhang Z.F., Shan Q., Li M.Q., Hu B., Sun C.H., Lu J., Chen G.Q., Zheng Y.L. Suppression of microRNA-342-3p increases glutamate transporters and prevents dopaminergic neuron loss through activating the Wnt signaling pathway via p21-activated kinase 1 in mice with Parkinson's disease. *J Cell Physiol.* 2019;234(6):9033-9044. doi 10.1002/jcp.27577
- Yufeng Z., Ming Q., Dandan W. MiR-320d inhibits progression of EGFR-positive colorectal cancer by targeting TUSC3. *Front Genet.* 2021;12:738559. doi 10.3389/fgene.2021.738559
- Zhang Q., Yan Y.F., Lv Q., Li Y.J., Wang R.R., Sun G.B., Pan L., Hu J.X., Xie N., Zhang C., Tian B.C., Jiao F., Xu S., Wang P.Y., Xie S.Y. miR-4293 upregulates lncRNA WFDC21P by suppressing mRNA-decapping enzyme 2 to promote lung carcinoma proliferation. *Cell Death Dis.* 2021;12(8):735. doi 10.1038/s41419-021-04021-y
- Zhang Y., Xia Q., Lin J. LncRNA H19 attenuates apoptosis in MPTP-induced Parkinson's disease through regulating miR-585-3p/PIK3R3. *Neurochem Res.* 2020;45:1700-1710. doi 10.1007/s11064-020-03035-w
- Zhong C., Zhang Q., Bao H., Li Y., Nie C. Hsa_circ_0054220 upregulates HMGA1 by the competitive RNA pattern to promote neural impairment in MPTP model of Parkinson's disease. *Appl Biochem Biotechnol.* 2023;47:40-42. doi 10.1007/s12010-023-04740-2

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 28.05.2024. После доработки 19.08.2024. Принята к публикации 24.10.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-33

Генетические варианты генов *DLK1*, *KISS1R*, *MKRN3* у девочек с преждевременным половым созреванием

Е.А. Саженова , О.Ю. Васильева , Е.А. Фонова , М.Б. Канканам Патирананге , А.Ю. Самбялова ,
Е.Е. Храмова , Л.В. Рычкова , С.А. Васильев , И.Н. Лебедев 

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

³ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Россия

 elena.sazhenova@medgenetics.ru

Аннотация. Преждевременное половое созревание (ППС, E30.1, E22.8, E30.9 по МКБ 10, MIM 176400, 615346) у детей – заболевание, при котором вторичные половые признаки появляются раньше возрастной нормы. Сроки полового созревания регулируются сложным взаимодействием генетических и эпигенетических факторов, а также факторов окружающей среды и питания. Цель настоящего исследования – поиск генетических причин формирования у девочек клинической картины ППС. Поиск клинически значимых генетических вариантов (патогенных, вероятно патогенных вариантов или вариантов с неопределенным клиническим значением (variant of uncertain significance, VUS)) проведен в генах *KISS1*, *KISS1R* (*GPR54*), *DLK1* и *MKRN3* у девочек с клинической картиной ППС и нормальным кариотипом методом массового параллельного секвенирования. Все найденные генетические варианты были подтверждены методом секвенирования ДНК по Сэнгеру. Патогенность идентифицированных генетических вариантов и функциональная значимость кодируемого ими белка проанализированы с использованием онлайн-алгоритмов прогнозирования патогенности Variant Effect Predictor, Franklin и Varsome, а также PolyPhen2 (согласно рекомендациям по интерпретации результатов анализа NGS). Клинически значимые генетические варианты были обнаружены в гетерозиготном состоянии в генах *KISS1R*, *DLK1* и *MKRN3* у 5 из 52 пробандов (9.6 %) с ППС, из них 3 из 33 (9.1 %) – в группе с центральным ППС и 2 из 19 (10.5 %) – в группе с гонадотропин-независимой формой ППС. Два ребенка с гонадотропин-независимой формой ППС имели VUS в гене *KISS1R* (с.191T>C, p.Ile64Thr и с.233A>G, p.Asn78Ser), один из которых был унаследован от отца, второй – от матери. У остальных пациентов с центральным ППС были вероятно патогенные генетические варианты *DLK1*:с.373delC(p.Gln125fs) *de novo* и *DLK1*:с.480delT(p.Gly161Alafs*49) отцовского происхождения. Еще один пробанд имел вариант VUS в гене *MKRN3* (с.1487A>G, p.His496Arg), унаследованный от отца. Все выявленные генетические варианты описаны впервые при ППС. Таким образом, в настоящем исследовании найдены новые генетические варианты в генах *KISS1R*, *DLK1* и *MKRN3* у девочек с преждевременным половым созреванием.

Ключевые слова: преждевременное половое созревание; гипоталамо-гипофизарно-гонадная ось; гены *DLK1*, *KISS1*, *KISS1R*, *MKRN3*

Для цитирования: Саженова Е.А., Васильева О.Ю., Фонова Е.А., Канканам Патирананге М.Б., Самбялова А.Ю., Храмова Е.Е., Рычкова Л.В., Васильев С.А., Лебедев И.Н. Генетические варианты генов *DLK1*, *KISS1R*, *MKRN3* у девочек с преждевременным половым созреванием. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(2):301-309. doi 10.18699/vjgb-25-33

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ в рамках научного проекта № 23-25-00359.

Genetic variants of the *DLK1*, *KISS1R*, *MKRN3* genes in girls with precocious puberty

Е.А. Sazhenova , О.Yu. Vasilyeva , Е.А. Fonova , М.Б. Kankanam Pathirananage , А.Yu. Sambyalova ,
Е.Е. Khramova , L.V. Rychkova , S.A. Vasilyev , I.N. Lebedev 

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

² Tomsk State University, Tomsk, Russia

³ Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia

 elena.sazhenova@medgenetics.ru

Abstract. Precocious puberty (PP, E30.1, E22.8, E30.9 according to ICD 10, MIM 176400, 615346) in children is a disorder in which secondary sexual characteristics appear earlier than the age norm. The timing of puberty is regulated by a complex interaction of genetic and epigenetic factors, as well as environmental and nutritional factors. This study aimed to search for pathogenic, likely pathogenic variants or variants of uncertain significance (VUS) in the *KISS1*, *GPR54*, *DLK1*, and *MKRN3* genes in patients with the clinical picture of PP and normal karyotype by massive parallel sequencing.

All identified genetic variants were confirmed by Sanger sequencing. The pathogenicity of identified genetic variants and the functional significance of the protein synthesized by them were analyzed according to recommendations for interpretation of NGS analysis results using online algorithms for pathogenicity prediction (Variant Effect Predictor, Franklin, Varsome, and PolyPhen2). Clinically significant genetic variants were detected in the heterozygous state in the *KISS1R*, *DLK1*, and *MKRN3* genes in 5 of 52 probands (9.6 %) with PP, including 3 of 33 (9.1 %) in the group with central PP and 2 of 19 (10.5 %) in the group with gonadotropin-independent PP. Two children with gonadotropin-independent PP had VUS in the *KISS1R* gene (c.191T>C, p.Ile64Thr and c.233A>G, p.Asn78Ser), one of which was inherited from the father and the second, from the mother. The remaining patients with central PP had likely pathogenic genetic variants: *DLK1*:c.373delC(p.Gln125fs) *de novo* and *DLK1*:c.480delT(p.Gly161Alafs*49) of paternal origin. The third proband had a VUS variant in the *MKRN3* gene (c.1487A>G, p.His496Arg), inherited from the father. All identified genetic variants were described for the first time in PP. Thus, in the present study, genetic variants in the *KISS1R*, *DLK1*, and *MKRN3* genes in girls with PP were characterized.

Key words: precocious puberty; hypothalamic-pituitary-gonadal axis; *DLK1*, *KISS1*, *KISS1R*, *MKRN3* genes

For citation: Sazhenova E.A., Vasilyeva O.Yu., Fonova E.A., Kankanam Pathiranage M.B., Sambyalova A.Yu., Khramova E.E., Rychkova L.V., Vasilyev S.A., Lebedev I.N. Genetic variants of the *DLK1*, *KISS1R*, *MKRN3* genes in girls with precocious puberty. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(2):301-309. doi 10.18699/vjgb-25-33

Введение

Преждевременное половое созревание (ППС, E30.1, E22.8, E30.9 по МКБ 10, МИМ 176400, 615346) – заболевание, при котором вторичные половые признаки появляются до 8 лет у девочек и до 9 лет у мальчиков и, как правило, присутствует опережение костного возраста более чем на 2 года (Maione et al., 2021). Частота ППС в 10–20 раз выше у девочек, и в разных географических регионах варьирует от 0.217 до 26.28 на 10 000 девочек и от 0.02 до 0.9 на 10 000 мальчиков. Распространенность семейных случаев ППС составляет 27.5 % (Brito et al., 2023).

Преждевременное половое созревание может быть гонадотропин-зависимым (истинным, центральным), полным и неполным – обусловленным преждевременной реактивацией гипоталамо-гипофизарно-гонадной (ГПГ) оси, и гонадотропин-независимым (периферическим) – развивающимся вследствие избыточной секреции половых гормонов половыми железами или надпочечниками, кистами яичников или хорионическим гонадотропином человека. Вторая форма ППС встречается значительно реже – 20 % от всех ППС (Shim et al., 2022). У большинства девочек ППС не поддается идентификации, поэтому называется идиопатическим. При отсутствии лечения раннее половое созревание может привести к ряду серьезных осложнений, включая низкий рост, вызванный преждевременным закрытием зон роста трубчатых костей, и формирование диспластической конституции (короткие конечности, удлиненное туловище, широкий таз), психологический дискомфорт девочек и их родителей. У девушек наблюдаются нарушения менструального цикла, проявляющиеся в аномальных маточных кровотечениях, развитии синдрома поликистозных яичников и преждевременном истощении яичников и соответственно ранней менопаузой. Более раннее менархе у девушек ассоциировано также с повышенным риском развития рака молочной железы, рака эндометрия, ожирением, сахарным диабетом 2-го типа и сердечно-сосудистыми заболеваниями. ППС также может быть связано с органическими поражениями головного мозга – гамартомой гипоталамуса, супраселлярными арахноидальными кистами и гидроцефалией (Лагно и др., 2018; Петеркова и др., 2021).

Клинические признаки ППС включают опережение в физическом развитии, прогрессирующее развитие молоч-

ных желез у девочек и увеличение объема яичек у мальчиков и отражают высокий уровень гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ) и стимулированное гонадотропином действие половых стероидов (гонадархе). Ускоренный рост (> 6 см/год) и опережение костного возраста в сравнении с биологическим (выше 1 года или 2 баллов SDS (стандартного отклонения) хронологического возраста) представляют собой общие черты прогрессирующего ППС. Гормональные данные, подтверждающие диагноз ППС, включают пубертатный базальный уровень лютеинизирующего гормона (ЛГ) или ГнРГ (Brito et al., 2023).

В определении сроков полового созревания решающую роль играют генетические, эпигенетические и экологические факторы. В последние годы генетические варианты в генах *DLK1* (14q32), *MKRN3* (15q11.2), *KISS1* (1q32.1) и его рецепторе *KISS1R* (*GPR54*, 19p13.3) были идентифицированы как наследственные причины ППС (Shim et al., 2022). При спорадических формах ППС генетические варианты в этих генах выявляют всего в 10 % случаев (Canton et al., 2021, 2024). Эти гены в первую очередь влияют на преждевременную реактивацию ГПГ оси и принимают непосредственное участие в формировании центрального ППС. Тем не менее исходя из функции генов возможно, что клиническая картина периферического ППС впоследствии может привести к центральному ППС. Так, наличие у девочек после двух лет телархе при гонадотропин-независимой форме ППС повышает риск трансформации телархе в полную форму центрального ППС (Петеркова и др., 2021).

Ген *KISS1* (МИМ 603286) и его рецептор *KISS1R* (МИМ 604161) отвечают за секрецию ГнРГ, участвуя в регуляции эндокринной функции и наступлении половой зрелости. Ген *KISS1* кодирует белок кисспептин, стимулирующий секрецию ГнРГ, а *KISS1R* является регулятором этого процесса и ключевым фактором в инициации полового созревания, действуя как мощный стимулятор секреции ГнРГ-зависимого лютеинизирующего гормона. Он экспрессируется в различных эндокринных и гонадных тканях (Teles et al., 2008).

Импринтированный и экспрессирующийся только на отцовском гомологе ген *DLK1* (МИМ 176290) кодирует EGF-подобный фактор роста. Это мембраносвязывающий белок, который участвует в сигнальном пути Notch и спо-

сообствует передаче сигналов для клеточной пролиферации во время нейрогенеза. Продукт этого гена также принимает участие в остеогенезе, адипогенезе, кроветворении и пролиферации гепатоцитов (Gomes et al., 2019; Macedo, Kaiser, 2019). Показано, что у мышей *Dlk1* экспрессируется пренатально в нейроэндокринных тканях, включая гипофиз, и постнатально – в гипоталамусе, включая срединно-базальный гипоталамус – центр контроля секреции ГнРГ (Shim et al., 2022). Продукт этого гена также важен для гомеостаза жировой ткани. Полногеномные ассоциативные исследования показали, что однонуклеотидные полиморфизмы гена *DLK1*, унаследованные от отца, связаны с более ранним началом менархе (Perry et al., 2014).

Импринтированный и также экспрессирующийся с отцовской хромосомы ген *MKRN3* (MIM 603856) кодирует макорин-белок RING-finger 3, который относится к семейству макоринов и участвует в управлении началом полового созревания, блокируя высвобождение ГнРГ из гипоталамуса, тем самым задерживая наступление половой зрелости (Abreu et al., 2020). *MKRN3* ответствен за убиквитинизацию белков, при которой фрагмент убиквитина присоединяется к внутриклеточному белку для перемещения его в протеасому. Убиквитинирование также может быть индикатором передачи сигнала регуляции клеточного цикла, дифференцировки и морфогенеза (Abreu et al., 2020). Показано, что патогенные и условно патогенные варианты в гене *MKRN3* – наиболее распространенная известная генетическая этиология центрального ППС, которая составляет 19–33 % в семейных и 2–3.9 % – в спорадических случаях (Valadares et al., 2019; Roberts, Kaiser, 2020).

Цель настоящего исследования – поиск клинически значимых генетических вариантов в генах *KISS1*, *KISS1R* (*GPR54*), *DLK1* и *MKRN3* у девочек с клинической картиной преждевременного полового созревания.

Материалы и методы

В ходе настоящего исследования была сформирована выборка на базе Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека (Иркутск), в которую вошли 52 семьи (всего 202 человека). Каждая семья состояла из пробанда женского пола с клинической картиной ППС, его родителей и, в некоторых случаях, сестер и бабушек. Исследование было проведено в соответствии с положениями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации и одобрено биоэтическим комитетом Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека, (протокол № 1.1 от 12.01.2023). От родителей пациентов было получено информированное согласие на участие в исследовании и проведение ДНК-диагностики. Клиническая картина у пробандов включала ППС с изо-сексуальной гонадотропин-зависимой (МКБ-10: E22.8, $n = 33$, возраст 7.4 ± 1.6 года) и гонадотропин-независимой (МКБ-10: E30.9, $n = 19$, возраст 6.9 ± 0.8 года) формами. Девочки с органическим поражением центральной нервной системы в исследовании не участвовали.

Описание подгрупп пациентов:

- девочки с ППС и изо-сексуальной гонадотропин-зависимой формой – до 8 лет, имеющие ускоренное физическое развитие (SDS роста +1 и более), с опережением

полового развития по Таннеру 2–4-й стадии; с уровнем гонадотропных гормонов гипофиза, соответствующим пубертатным значениям, и положительной пробой с бусерелином; с доказанным по УЗИ увеличением молочных желез и матки; с биологическим возрастом, не соответствующим паспортному;

- девочки с гонадотропин-независимой формой ППС – до 8 лет, имеющие ускоренное/нормальное физическое развитие (SDS роста +1 и более), с опережением полового развития по Таннеру 2-й стадии; с уровнем гонадотропных гормонов гипофиза, соответствующим допубертатным значениям, и отрицательной пробой с бусерелином; с доказанным по УЗИ увеличением молочных желез и матки.

У всех пробандов был выполнен стандартный цитогенетический анализ, который во всех случаях показал нормальный кариотип. Кариотипирование проводили на базе люминесцентного микроскопа исследовательского класса AxioImager (Carl Zeiss, Германия).

Геномную ДНК выделяли из венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции. Концентрацию исходных образцов оценивали на спектрофотометре Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Генотипирование всех экзонов в генах *KISS1*, *GPR54* (*KISS1R*), *DLK1* и *MKRN3* осуществляли посредством таргетного массового параллельного секвенирования (NGS) этих генов с помощью секвенатора MiSeq и набора MicroKit (2x150) (Illumina, США). Для этого применяли амплификацию длинных фрагментов ДНК (Long-range ПЦР). Для получения последовательности нуклеотидов использовался геномный браузер UCSC In-Silico PCR, содержащий информацию о последовательностях геномов (Human Genome Browser – hg38 assembly, UCSC). В дальнейшем полученная последовательность нуклеотидов была задействована для подбора праймеров с помощью биоинформатической программы Primer-BLAST, которую предоставляет Национальный центр биотехнологической информации США (National Center for Biotechnological Information, NCBI) (табл. 1).

Амплификацию целевых фрагментов проводили с применением набора БиоМастер HS-Taq ПЦР (2x) («Биолабмикс», Россия) по протоколу производителя со следующими условиями ПЦР: 95 °C 5 мин; 36 циклов: 95 °C 40 с, 60 °C 50 с, 68 °C 1 мин. Концентрацию целевых фрагментов определяли с помощью флуориметра Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific). Продукты реакции очищали от примесей с применением раствора сефадекса G50 (Sigma, США). Оценка качества прочтений выполнена с использованием FastQC v0.11.8, после чего был проведен тримминг оставшихся последовательностей адаптеров и низких по качеству прочтений с помощью программы Trim-Galore.

Все обнаруженные генетические варианты были подтверждены секвенированием по Сэнгеру. Последовательности праймеров представлены в табл. 2. Патогенность выявленных генетических вариантов была проанализирована с использованием онлайн-алгоритмов прогнозирования патогенности: Variant Effect Predictor (<http://www.ensembl.org/Tools/VEP>), Provean (http://provean.jcvi.org/genomesubmit_2.php?species=human), Franklin (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/variant/snp/chr15-23621174->

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидных праймеров, использованных для получения библиотек для таргетного массового параллельного секвенирования генов *KISS1*, *KISS1R*, *DLK1* и *MKRN3*

Праймер	Последовательность праймера, 5'–3'	Длина продукта, п. н.	Положение в геноме UCSC In-Silico PCR, hg38
<i>DLK1</i>			
DF1	TATGGCTAAGATGGGAAATCTGTGC	6196	chr14:100725325-100731520
DR1	CCGTCAGGAATCAAGAAACCTGTTA		
DF2	GCTCAATAGTTCTAATTTCCCTGGC	4040	chr14:100731378-100735417
DR2	CCGCTAAATCTCAAATCAATCGGAA		
DF3	GCTATCTCTTGTGTCAAATCTGGTG	4689	chr14:100734980-100739668
DR3	CCTTCAGTGTGGTCATGTTATTTCC		
<i>MKRN3</i>			
MF1	GGCAGACAGATACGAAAATACAACG	3642	chr15:23565341-23568982
MR1	ATTTGCAGTTGATGCAGATCATACG		
MF2	GCTGCTCATCTGTTTGTTTACAGTT	5062	chr15:23567720-23572781
MR2	AACTGTGATCCCTCATCGTTTGTGA		
MF3	TTCTAAACTGACTGTGACTAGGTGC	4998	chr15:23626497-23631494
MR3	ATACCGAAATCTCATCCCCTCTGG		
MF4	AATGTCTCACCTTCCCTCTACAAAC	5629	chr15:23620915-23626543
MR4	GTGGGAGATGATAGCAGAATAAGCA		
MF5	TAGTCTATATCAGCCATTGCCCC	6048	chr15:23614951-23620998
MR5	TGGCAGAACTCTACAGAAAATCGAA		
<i>KISS1</i>			
KF5	GCAAGGCTCATTAAGTTCACTG	6203	chr1:204191506-204197708
KR5	CAGCCCTAATGGGTGTGATAAT		
KF7	CTGGAAGATGGTTAGAGGAACC	4106	chr1:204188621-204192726
KR7	GCAAAATGAGCTTCCCGTATT		
<i>KISS1R</i>			
KRF2	CAAGTTCGTCAACTACATCCAG	3436	chr19:918644-922079
KRR2	AAAAGTAAAGTGCCTAAGACCG		
KRF3	CAAATGGAAGCACCTTTTCTTCTC	5316	chr19:915605-920921
KRR3	ATCAATAGCAAACCTCACAAACGA		

Таблица 2. Последовательности олигонуклеотидных праймеров, использованных для секвенирования по Сэнгеру генов *KISS1R*, *DLK1* и *MKRN3*

Праймер	Последовательность праймера, 5'–3'	Длина продукта, п. н.	Положение в геноме UCSC In-Silico PCR, hg 38
<i>DLK1</i>			
c373del_F	TAAACCCTCTACTCCAGACCC	294	chr14:100731920-100732213
c373del_R	CATTAGATCACACACAGGAAGGA		
c480delF	GTGTTTTAAGCACCTGCCCTTA	329	chr14:100734030-100734358
c480delR	CAGGTCTGTGTCGTAAGCCG		
<i>MKRN3</i>			
c1487A>GF	GGAGAGGGCAACATGCTCTATAA	254	chr15:23567136-23567389
c1487A>GR	CAGTAAGAGTGTCAACACAGGGA		
<i>KISS1R</i>			
c233A>GF	GTGCCGCTCTTCTTCGC	265	chr19:917635-917899
c233A>GR	CCACAGGGAAAAGATTGAGG		
c191T>CF	GGGCTATAAACGCTCGGC	448	chr19:917300-917747
c191T>CR	CCGATGTAGAAGTTGGTCACG		

GC-G-hg38), VarSome (<https://varsome.com/variant/hg19>) и PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) согласно рекомендациям по интерпретации результатов анализа NGS (Рыжкова и др., 2019; Eijkelenboom et al., 2019). Для определения частоты найденных генетических вариантов в популяционных выборках с целью исключения полиморфных вариантов у пациентов задействовали следующие базы данных: Exome Aggregation Consortium (<http://exac.broadinstitute.org/>), Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), 1000 Genomes Project (<http://browser.1000genomes.org/index.html>), рекомендованные для интерпретации данных, полученных с помощью массового параллельного секвенирования (Рыжкова и др., 2019; Eijkelenboom et al., 2019).

Исследование проведено с применением оборудования Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук.

Результаты

В общей сложности клинически значимые генетические варианты (вероятно патогенные и VUS) были идентифицированы в генах *KISS1R*, *DLK1* и *MKRN3* у 5 из 52 пробандов (9.6 %) с ППС, из них 3 из 33 (9.1 %) – в группе с центральным ППС и 2 из 19 (10.5 %) – в группе с гонадотропин-независимой формой ППС. Основные клинические характеристики фенотипа пациентов с обнаруженными генетическими вариантами представлены в табл. 3. Обращает на себя внимание то, что в трех случаях пациентки имели ожирение, которое могло способствовать развитию ППС (Song et al., 2023).

Выявленные клинически значимые варианты приводили в трех случаях к миссенс-заменам аминокислот. Два варианта представлены делециями одного нуклеотида, вызывающими сдвиг рамки считывания. В табл. 4 и на рисунке показан спектр обнаруженных у пациентов генетических вариантов, которые были зарегистрированы во всех случаях в гетерозиготном состоянии, а также представлены их родословные.

Всего было обнаружено пять генетических вариантов, расположенных в кодирующей области изученных генов. Два вероятно патогенных генетических варианта идентифицированы в гене *DLK1* (с.373delC, p.Gln125fs

и с.480delT p.Gly161Alafs*49 (см. табл. 4, рисунок, а, б). Первый из них находился в 4-м, а второй – в 5-м экзонах. Данные варианты в обоих случаях вызывали сдвиг рамки считывания и формирование стоп-кодона и, как следствие, укорочение синтезируемого белка.

Ген *DLK1* имеет пять экзонов. Структура белка *DLK1* состоит из трансмембранного домена с шестью повторами, подобными эпидермальному фактору роста (EGF), и чувствительной к протеазе последовательности – мишени фактора некроза опухоли α -превращающего фермента (TACE), трансмембранного и короткого цитоплазматического доменов (Sánchez-Solana et al., 2011).

В настоящем исследовании как первый, так и второй варианты расположены в области, содержащей EGF-повторы, которые являются ключевыми для ингибирования активности трансмембранных белков Notch, действующих как активаторы транскрипции в комплексе с транскрипционными факторами семейства CSL (Baladrón et al., 2005; Gomes et al., 2019). Первый вариант расположен в третьем, а второй – в четвертом повторе. Оба генетических варианта впервые описаны при ППС. Ранее при данной патологии был описан вариант с.479delC(p.Pro160fs*50) (Gomes et al., 2019; Yuan et al., 2022), который локализуется рядом с вариантом *DLK1*:с.480delT(p.Gly161Alafs*49), описанным нами.

В гене *MKRN3* обнаружен один миссенс-вариант с.1487A>G, p.His496Arg (rs749506944), он расположен в четвертом экзоне и является вариантом с неопределенным клиническим значением. Частота этого варианта в базе данных GnomAD крайне низка (0.000016), причем он встречается только в европейской популяции. Белок *MKRN3* имеет четыре домена «цинковые пальцы»: три РНК-связывающих мотива СЗН1 и один белок-связывающий домен СЗН4, отвечающий за активность убиквитинлигазы. Специфичный для *MKRN3* Cys-His домен, входящий в состав белка, имеет неизвестную функцию. Обнаруженный в настоящем исследовании генетический вариант расположен в области РНК-связывающих мотивов СЗН1. Прогностические программы и низкая частота встречаемости данного варианта в популяции свидетельствуют о том, что этот миссенс-вариант может быть ассоциирован с развитием преждевременного полового созревания.

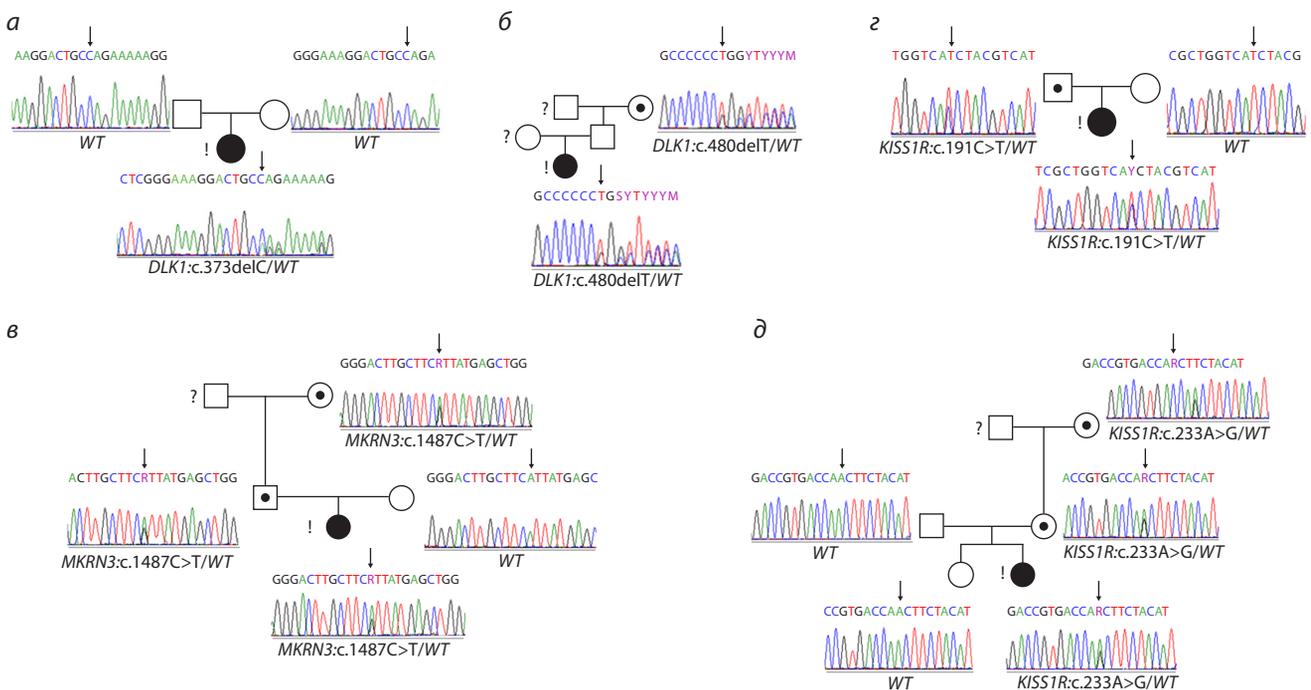
Таблица 3. Основные клинические характеристики фенотипа пациентов с выявленными генетическими вариантами

Номер пациента	ППС, клиническая форма	Возраст начала ППС, лет	Клинические особенности	Наличие ожирения	Возраст, лет	
					биологический	костный
19	Гонадотропин-зависимое, неполная форма	6	Телархе и пубархе в 6 лет	–	6.5	9
45	Гонадотропин-зависимое, полная форма	7	Телархе, пубархе и менархе с 7 лет	–	7	11–11.5
47	Гонадотропин-зависимое, полная форма	6	Пубархе с 6 лет, телархе с 8 лет, менархе с 9 лет	2-я стадия	9	11–11.5
10	Гонадотропин-независимое, неполная форма	5	Телархе, адренархе	1-я стадия	5	7
14	Гонадотропин-независимое, неполная форма	6	Пубархе с 5 лет, телархе с 7 лет	1-я стадия	7	8.5–9

Таблица 4. Положение и характеристики выявленных генетических вариантов у пациентов с ППС

Номер пациента	Ген	Нуклеотидные варианты	Аминокислотные варианты	Наличие полиморфных вариантов (rs, № dbSNP)	Частота в популяции (GnomAD)	Идентификатор генетического варианта (Varsome, Franklin)	Оценка патогенности по ACMG (Varsome, Franklin)	Наследование
19	<i>DLK1</i>	c.373delC	p.Gln125fs*8	–	–	Вариант сдвига рамки считывания	LP	<i>De novo</i>
45	<i>DLK1</i>	c.480delT	p.Gly161Alafs*49	–	–		LP	От отца
47	<i>MKRN3</i>	c.1487A>G	p.His496Arg	rs749506944	0.000016	Миссенс-вариант	VUS	От отца
14	<i>KISS1R</i>	c.191T>C	p.Ile64Thr	–	0.0004		VUS	От отца
10	<i>KISS1R</i>	c.233A>G	p.Asn78Ser	rs540538484	0.000013		VUS	От матери

Примечание. LP – вероятно патогенный вариант; VUS – вариант неопределенного клинического значения.



Родословные пациентов с мутациями в генах *KISS1R*, *DLK1* и *MKRN3*, доступные для анализа семейной сегрегации.

Родословные пациентов: а – № 19; б – № 45; в – № 47; г – № 14; д – № 10. Квадратами обозначены члены семьи мужского пола; кружками – женского пола; черными символами – члены семьи с клиническими нарушениями; белыми символами – клинически незатронутые носители; черной точкой – клинически незатронутые носители с выявленным генетическим вариантом; вопросительным знаком – неизвестный фенотип; восклицательным знаком – пробанд в каждой семье; WT – статус генотипа дикого типа.

Генетические варианты в генах *DLK1* и *MKRN3* в двух случаях были унаследованы от отцов и бабушек по отцовской линии, и в одной семье (№ 19) отмечено наследование *de novo* (см. табл. 4, рисунок, а–в). Эти гены – импринтированные, экспрессируются только на отцовской хромосоме. Отцы наследуют данный вариант от матерей, поэтому у отцов этот генетический вариант неактивен и отсутствуют проявления клинической картины заболевания. Действительно, отцы в семьях № 45 и 47 не имели ППС. В то же время у бабушек по линии отца должны были проявляться клинические признаки ППС, так как у них этот гомолог активен. Однако, по данным опроса, бабушки по отцовской линии также не имели подобных нарушений, что свидетельствует о неполной пенетрантности найденных генетических вариантов.

Остальные два генетических варианта были обнаружены в гене *KISS1R* – c.191T>C, p.Ile64Thr и c.233A>G, p.Asn78Ser – миссенс-варианты, расположенные в первом экзоне (см. рисунок, г, д). В первом случае пробанд наследовал вариант от отца, у которого не было зарегистрировано клинических проявлений ППС. Во второй семье, кроме пробанда, этот генетический вариант имели мать и бабушка по материнской линии, у которых также не отмечено случаев ППС. У родной сестры пробанда данного заболевания не обнаружено. В отношении ППС все это свидетельствует о неполной пенетрантности признака.

Ген *KISS1R* имеет пять экзонов. Белок GPR54 этого гена расположен в клеточной мембране, имеет внеклеточный N-концевой домен, за которым следует семь трансмембранных спиралей с тремя внутриклеточными и тремя

внклеточными петлями, и заканчивается С-концевым цитоплазматическим доменом. Найденные в данном гене варианты расположены в первой трансмембранной спирали.

В двух семьях были найдены уникальные генетические варианты, не повторяющиеся у неродственных пациентов (см. табл. 4). В остальных семьях обнаруженные генетические варианты были отмечены в популяционных выборках с частотой от 0.000013 до 0.0004 (по данным GnomAD). Как видно, эти варианты крайне редки в популяциях, что может говорить о патогенном характере данных генетических вариантов.

Таким образом, в настоящем исследовании показано, что в группе девочек с ППС в генах *KISS1R*, *DLK1* и *MKRN3* в 9.6 % случаев (9.1 % в группе с центральным ППС и 10.5 % – в группе с гонадотропин-независимой формой ППС) встречаются вероятно патогенные варианты и варианты с неопределенным клиническим значением, которые могут быть потенциальной причиной формирования ППС. Все обнаруженные в этой работе генетические варианты впервые описаны при данном заболевании. Выявление новых генетических вариантов позволит лучше понять вклад генетических причин в развитие преждевременного полового созревания.

Обсуждение

Репродуктивный процесс у женщин представляет собой хорошо организованную и тщательно контролируемую систему, управляемую ГПГ осью. Основной элемент этой оси – пульсирующая секреция ГнРГ, регулирующая выработку гонадотропинов (ФСГ и ЛГ) передней доли гипофиза во время полового созревания и поддерживающая нормальные циклы у взрослых. Также синтез ГнРГ и гонадотропинов находится под контролем с отрицательной обратной связью со стороны эстрогенов, которые выделяют развивающиеся яичниковые фолликулы.

В большинстве случаев ППС связаны с вариантами в генах *DLK1*, *MKRN3*, *KISS1* и *KISS1R*. Действительно, в проведенном исследовании мы обнаружили у 5 из 52 пробандов (9.6 %) наличие условно патогенных вариантов и вариантов с неопределенным клиническим значением в генах *DLK1*, *MKRN3* и *KISS1R* в выборке девочек с клинической картиной ППС, что соответствует литературным данным по частоте выявляемости генетических вариантов при ППС (Canton et al., 2021, 2024). В гене *KISS1* не были найдены варианты, которые могли бы формировать клиническую картину ППС. Это, возможно, связано с небольшой выборкой пациентов в этом исследовании, а также с низкой частотой генетических нарушений в этом гене при ППС. Описано всего несколько генетических вариантов в гене *KISS1* при данной патологии (Silveira et al., 2010; Rhie et al., 2014). Все обнаруженные генетические варианты находились в гетерозиготном состоянии, что согласуется с литературными данными об аутосомно-доминантном характере наследования генетических вариантов этих генов при преждевременном половом созревании.

В рамках настоящего исследования идентифицированы генетические варианты в гене *KISS1R* у девочек с гонадотропин-независимым ППС, сопровождающимся телархе во всех случаях. Телархе – это развитие молочных же-

лез, является реакцией на синтез эстрогенов. Определено, что гены *KISS1* и *KISS1R* экспрессируются в различных тканях, в том числе и в гонадах, и способны влиять на уровень этих гормонов либо через временную активацию ГПГ оси, либо непосредственно через стимуляцию гонад (Ярмолинская и др., 2016; Hu K. et al., 2018).

Низкая частота (примерно 10 %) выявляемости генетических вариантов в генах *DLK1*, *MKRN3*, *KISS1* и *KISS1R*, в первую очередь при спорадических случаях ППС, позволяет утверждать, что какие-либо другие механизмы или гены также могут участвовать в формировании ППС. Действительно, эпимутации (изменение статуса метилирования CpG-динуклеотидов) в центрах импринтинга *DLK1/MEG3:IG-DMR* и *MKRN3:TSS-DMR*, в которых происходит контроль экспрессии импринтированных генов *DLK1* и *MKRN3*, также могут быть причиной формирования клинической картины ППС. В подтверждение этому А.Р.М. Canton с коллегами (2021) у 36 (18 %) из 197 неродственных пациентов с ППС обнаружили различные генетические и эпигенетические нарушения, из них: в 24 случаях (67 %) были найдены генетические нарушения в генах *KISS1R*, *KISS1*, *MKRN3* и *DLK1*; в 7 случаях (19 %) выявлены CNV (3 пациента имели *de novo* делецию 7q11.23 (синдром Вильямса–Бойрена), 3 – унаследованную делецию Xp22.33 и 1 – дупликацию 1p31.3 *de novo*); эпигенетические аномалии импринтированных центров генов *DLK1* и *MKRN3* составили три случая (9 %). Идентификация редких генетических вариантов генов с помощью полного экзомного секвенирования выявила у двух пробандов (5 %) редкие *de novo* варианты потери функции генов в доминантном состоянии – патогенную делецию со сдвигом рамки считывания в гене *TNRC6B* (p.Gly665Leufs*35) и вероятно патогенный вариант сдвига рамки считывания в гене *AREL1* (p.Ser229Phefs*3).

Ген *TNRC6B* (тринуклеотидный повтор, содержащий адаптер 6B, регион 22q13.1, OMIM 610740) кодирует белок, включенный в регуляцию экспрессии генов. Данный ген запускает РНК-связывающую активность в РНК-опосредованном сайленсинге генов как микро-РНК (miRNAs), так и коротких интерферирующих РНК (siRNA). Ген *AREL1* (устойчивая к апоптозу Е3 убиквитин протеинлигаза 1, регион 14q24.3, OMIM 615380) кодирует белок, который активирует убиквитин-протеинтрансферазы, участвует в негативной регуляции процесса апоптоза, убиквитинировании белков, находится в цитозоле.

Метаанализ ассоциативных исследований позволил также расширить спектр генов, которые потенциально могут быть причиной развития ППС. Это такие гены, как *LIN28B* и *PROKR2*, хотя их роль в данном процессе не столь однозначна (Perry et al., 2009).

Ген *LIN28B* (6q16.3, OMIM 611044) кодирует высококонсервативный РНК-связывающий белок, который блокирует микроРНК семейства LET7 и способствует поддержанию плюрипотентного состояния эмбриональных стволовых клеток путем предотвращения дифференцировки, участвует в процессах метаболизма и онкогенеза. Он также может быть вовлечен в пубертатное развитие. В нескольких исследованиях показано, что *LIN28B* принимает участие в формировании клинической картины

ППС, в частности более раннем развитии телархе, менархе и пубархе (Ong et al., 2009; Perry et al., 2009; Hu Z. et al., 2016). Однако в другом исследовании была проанализирована взаимосвязь между вариантами *LIN28B* у 178 бразильских детей с ППС, но причинно-следственная зависимость не обнаружена (Silveira-Neto et al., 2012). Более того, генетические варианты в *LIN28B*, такие как rs314276, как сообщалось, ассоциированы с ожирением, которое коррелирует с ППС (Ong et al., 2011). Таким образом, роль гена *LIN28B* в формировании клинической картины ППС до конца не определена.

Ген *PROKR2* (рецептор прокинетицина 2, 20p12.3, OMIM 607123) представляет собой рецептор, связанный с G-белком, который участвует в развитии нейронов ГнРГ, но ни развивающиеся, ни зрелые нейроны ГнРГ не экспрессируют рецепторы прокинетицина. M. Fukami с коллегами (2017) сообщили, что вариант *PROKR2* связан с центральным ППС. В данном случае у девочки телархе наблюдалось в возрасте 3 лет и 5 месяцев с уровнем гонадотропина и эстрадиола (E2) в крови, соответствующим периоду полового созревания. Молекулярный анализ выявил гетерозиготную делецию с.724_727delTGCT в данном гене, приводящую к преждевременной терминации. Этот вариант также был найден у матери пациентки, у которой не было ППС. Показано, что в гетерозиготном состоянии этот вариант образует с диким типом гетеродимер, который действует как вариант усиления функции, приводящий к ППС. Более того, S. Sposini с коллегами (2015) продемонстрировали, что при отсутствии в гене *PROKR2* 6-го и 7-го трансмембранных доменов происходит усиление лиганд-зависимой сигнальной трансдукции. Таким образом, только определенные варианты в гене *PROKR2* в гетерозиготном состоянии могут приводить к развитию преждевременного полового созревания.

Заключение

Начало полового созревания контролируется взаимодействием между генетическими, эпигенетическими и наследственными факторами. Преждевременное половое созревание – результат преждевременной активации этих взаимодействий. В настоящем исследовании показано, что в группе девочек с ППС в генах *KISS1R*, *DLK1* и *MKRN3* в 9.6 % случаев (9.1 % в группе с центральным ППС и 10.5 % в группе с гонадотропин-независимой формой ППС) встречаются вероятно патогенные варианты и варианты с неопределенным клиническим значением, которые могут быть потенциальной причиной формирования ППС. Все выявленные в настоящем исследовании генетические варианты впервые описаны при ППС. Анализ семейной сегрегации показал, что все пробанды имели генетически значимые варианты в гетерозиготном состоянии, что подтверждает аутосомно-доминантный характер наследования. Во всех случаях, где был доступен семейный материал, только пробанды имели клинические признаки ППС, что свидетельствует о неполной пенетрантности этого заболевания.

Идентификация генетических вариантов необходима не только для молекулярно-генетического подтверждения диагноза, но и для выбора правильной тактики ведения па-

циента и медико-генетического консультирования семьи. Всестороннее и поэтапное исследование генетических, эпигенетических и наследственных факторов может улучшить наше понимание точного механизма преждевременного полового созревания.

Список литературы / References

- Лагно О.В., Плотнокова Е.В., Шабалов Н.П. К вопросу о преждевременном адренархе у девочек (обзор литературы). *Педиатр*. 2018;9(5):66-74. doi 10.17816/PED9566-74
[Lagno O.V., Plotnikova E.V., Shabalov N.P. To the question about premature adrenarche at girls (the literature review). *Pediatr = Pediatrician*. 2018;9(5):66-74. doi 10.17816/PED9566-74 (in Russian)]
- Петеркова В.А., Алимова И.Л., Башнина Е.Б., Безлепкина О.Б., Болотова Н.В., Зубкова Н.А., Калинин Н.Ю., Карева М.А., Кияев А.В., Колодкина А.А., Кострова И.Б., Маказан Н.В., Малиевский О.А., Орлова Е.М., Петряйкина Е.Е., Самсонова Л.Н., Таранушенко Т.Е. Клинические рекомендации «Преждевременное половое развитие». *Проблемы эндокринологии*. 2021;67(5): 84-103. doi 10.14341/probl12821
[Peterkova V.A., Alimova I.L., Bashnina E.B., Bezlepina O.B., Bolotova N.V., Zubkova N.A., Kalinchenko N.Yu., Kareva M.A., Kiyayev A.V., Kolodkina A.A., Kostrova I.B., Makazan N.V., Malievskiy O.A., Orlova E.M., Petryaykina E.E., Samsonova L.N., Taranushenko T.E. Clinical guidelines «Precocious puberty». *Problemy Endocrinologii = Problems of Endocrinology*. 2021;67(5): 84-103. doi 10.14341/probl12821 (in Russian)]
- Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., Коновалов Ф.А., Масленников А.Б., Степанов В.А., Афанасьев А.А., Захлязьминская Е.В., Ребриков Д.В., Савостьянов К.В., Глотов А.С., Костарева А.А., Павлов А.Е., Голубенко М.В., Поляков А.В., Куцев С.И. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2). *Медицинская генетика*. 2019;18(2):3-23. doi 10.25557/2073-7998.2019.02.3-23
[Ryzhkova O.P., Kardymon O.L., Prokhorchuk E.B., Konovalev F.A., Maslennikov A.B., Stepanov V.A., Afanasyev A.A., Zaklyazminskaya E.V., Rebrikov D.V., Savostyanov K.V., Glotov A.S., Kostareva A.A., Pavlov A.E., Golubenko M.V., Polyakov A.V., Kutsev S.I. Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants (update 2018, v2). *Meditsinskaya Genetika = Medical Genetics*. 2019;18(2):3-24. doi 10.25557/2073-7998.2019.02.3-24 (in Russian)]
- Ярмолинская М.И., Ганбарли Н.Ф., Айламазян Э.К. Значение кисспептина в регуляции функции репродуктивной системы. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2016;LXV(6):4-18. doi 10.17816/JOWD6564-18
[Yarmolinskaya M.I., Ganbarli N.F., Aylamazyan E.K. Role of kisspeptin in regulation of reproductive function. *Zhurnal Akusherstva i Zhenskikh Boleznej = J Obstetrics Women's Diseases*. 2016; LXV(6):4-18. doi 10.17816/JOWD6564-18 (in Russian)]
- Abreu A.P., Toro C.A., Song Y.B., Navarro V.M., Bosch M.A., Eren A., Liang J.N., Carroll R.S., Latronico A.C., Ronnekleiv O.K. *MKRN3* inhibits the reproductive axis through actions in kisspeptin-expressing neurons. *J Clin Invest*. 2020;130(8):4486-4500. doi 10.1172/JCI136564
- Baladrón V., Ruiz-Hidalgo M.J., Nueda M.L., Díaz-Guerra M.J.M., García-Ramírez J.J., Bonvini E., Gubina E., Laborda J. *Dlk* acts as a negative regulator of Notch1 activation through interactions with specific EGF-like repeats. *Exp Cell Res*. 2005;303(2):343-359. doi 10.1016/j.yexcr.2004.10.001
- Brito V.N., Canton A.P.M., Seraphim C.E., Abreu A.P., Macedo D.B., Mendonca B.B., Kaiser U.B., Argente J., Latronico A.C. The congenital and acquired mechanisms implicated in the etiology of

- central precocious puberty. *Endocr Rev.* 2023;44(2):193-221. doi 10.1210/edrv/bnac020
- Canton A.P.M., Krepischi A.C.V., Montenegro L.R., Costa S., Rosenberg C., Steunou V., Sobrier M.L., ... Jorge A.A.L., Mendonca B.B., Netchine I., Brito V.N., Latronico A.C. Insights from the genetic characterization of central precocious puberty associated with multiple anomalies. *Hum Reprod.* 2021;36(2):506-518. doi 10.1093/humrep/deaa306
- Canton A.P.M., Seraphim C.E., Montenegro L.R., Krepischi A.C.V., Mendonca B.B., Latronico A., Brito V.N. The genetic etiology is a relevant cause of central precocious puberty. *Eur J Endocrinol.* 2024;190(6):479-488. doi 10.1093/ejendo/lvae063
- Eijkelenboom A., Tops B.B.J., van den Berg A., van den Brule A.J.C., Dinjens W.N.M., Dubbink H.J., Ter Elst A., ... Vogel M.J., van Wezel T., Nederlof P.M., Schuurings E., Ligtenberg M.J.L. Recommendations for the clinical interpretation and reporting of copy number gains using gene panel NGS analysis in routine diagnostics. *Virchows Arch.* 2019;474(6):673-680. doi 10.1007/s00428-019-02555-3
- Fukami M., Suzuki E., Izumi Y., Torii T., Narumi S., Igarashi M., Miyado M., ... Hata K., Umezawa A., Matsubara Y., Yamauchi J., Ogata T. Paradoxical gain-of-function mutant of the G-protein-coupled receptor *PROKR2* promotes early puberty. *J Cell Mol Med.* 2017;21:2623-2626. doi 10.1111/jcmm.13146
- Gomes L.G., Cunha-Silva M., Crespo R.P., Ramos C.O., Montenegro L.R., Canton A., Lees M., ... Baracat E.C., Jorge A.A.L., Mendonca B.B., Brito V.N., Latronico A.C. *DLK1* is a novel link between reproduction and metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(6):2112-2120. doi 10.1210/jc.2018-02010
- Hu K., Zhao H., Chang H.M., Yu Y., Qiao J. Kisspeptin/kisspeptin receptor system in the ovary. *Front Endocrinol.* 2018;4(8):365. doi 10.3389/fendo.2017.00365
- Hu Z., Chen R., Cai C. Association of genetic polymorphisms around the *LIN28B* gene and idiopathic central precocious puberty risks among Chinese girls. *Pediatr Res.* 2016;80:521-525. doi 10.1038/pr.2016.107
- Macedo D.B., Kaiser U.B. *DLK1*, Notch signaling and the timing of puberty. *Semin Reprod Med.* 2019;37(4):174-181. doi 10.1055/s-0039-3400963
- Maione L., Bouvattier C., Kaiser U.B. Central precocious puberty: recent advances in understanding the etiology and in the clinical approach. *Clin Endocrinol.* 2021;95(4):542-555. doi 10.1111/cen.14475
- Ong K.K., Elks C.E., Li S., Zhao J.H., Luan J., Andersen L.B., Bingham S.A., ... Deloukas P., Barroso I., Mooser V., Loos R.J., Wareham N.J. Genetic variation in *LIN28B* is associated with the timing of puberty. *Nat Genet.* 2009;41:729-733. doi 10.1038/ng.382
- Ong K.K., Elks C.E., Wills A.K., Wong A., Wareham N.J., Loos R.J., Kuh D., Hardy R. Associations between the pubertal timing-related variant in *LIN28B* and *BMI* vary across the life course. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:E125-E129. doi 10.1210/jc.2010-0941
- Perry J.R., Stolk L., Franceschini N., Lunetta K.L., Zhai G., McArdle P.F., Smith A.V., Aspelund T., Bandinelli S., Boerwinkle E., Cherkas L., Eiriksdottir G., Estrada K. Meta-analysis of genome-wide association data identifies two loci influencing age at menarche. *Nat Genet.* 2009;41:648-650. doi 10.1038/ng.386
- Perry J.R., Day F., Elks C.E., Sulem P., Thompson D.J., Ferreira T., He C., ... Feenstra B., Franceschini N., Ganna A., Johnson A.D., Kjellqvist S. Parent-of-origin specific allelic associations among 106 genomic loci for age at menarche. *Nature.* 2014;514(7520):92-97. doi 10.1038/nature13545
- Rhie Y.J., Lee K.H., Ko J.M., Lee W.J., Kim J.H., Kim H.S. *KISS1* gene polymorphisms in Korean girls with central precocious puberty. *J Korean Med Sci.* 2014;29(8):1120-1125. doi 10.3346/jkms.2014.29.8.1120
- Roberts S.A., Kaiser U.B. Genetic etiologies of central precocious puberty and the role of imprinted genes. *Eur J Endocrinol.* 2020;183(4):R107-R117. doi 10.1530/EJE-20-0103
- Sánchez-Solana B., Nueda M.L., Ruvira M.D., Ruiz-Hidalgo M.J., Monsalve E.M., Rivero S., García-Ramírez J.J., Díaz-Guerra M.J.M., Baladrón V., Labordaet J. The EGF-like proteins *DLK1* and *DLK2* function as inhibitory non-canonical ligands of NOTCH1 receptor that modulate each other's activities. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813(6):1153-1164. doi 10.1016/j.bbamcr.2011.03.004
- Shim Y.S., Lee H.S., Hwang J.S. Genetic factors in precocious puberty. *Clin Exp Pediatr.* 2022;65(4):172-181. doi 10.3345/cep.2021.00521
- Silveira L.G., Noel S.D., Silveira-Neto A.P., Abreu A.P., Brito V.N., Santos M.G., Bianco S.D.C., ... Escobar M.E., Arnhold I.J.P., Mendonca B.B., Kaiser U.B., Latronico A.C. Mutations of the *KISS1* gene in disorders of puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(5):2276-2280. doi 10.1210/jc.2009-2421
- Silveira-Neto A.P., Leal L.F., Emerman A.B., Henderson K.D., Piskounova E., Henderson B.E. Absence of functional *LIN28B* mutations in a large cohort of patients with idiopathic central precocious puberty. *Horm Res Paediatr.* 2012;78:144-150. doi 10.1159/000342212
- Song Y., Kong Y., Xie X., Wang Y., Wang N. Association between precocious puberty and obesity risk in children: a systematic review and meta-analysis. *Front Pediatr.* 2023;11:1226933. doi 10.3389/fped.2023.1226933
- Sposini S., Caltabiano G., Hanyaloglu A.C., Miele R. Identification of transmembrane domains that regulate spatial arrangements and activity of prokineticin receptor 2 dimers. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;399:362-372. doi 10.1016/j.mce.2014.10.024
- Teles M.G., Bianco S.D., Brito V.N., Trarbach E.B., Kuohung W., Xu S., Seminara S.B., Mendonca B.B., Kaiser U.B., Latronico A.C. *AGPR54*-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med.* 2008;358(7):709-715. doi 10.1056/NEJMoa073443
- Valadares L.P., Meireles C.G., De Toledo I.P., de Oliveira R.S., de Castro L.C.G., Abreu A.P., Carroll R.S., Latronico A.C., Kaiser U.B., Guerra E.N.S., Lofrano-Porto A. *MKRN3* mutations in central precocious puberty: a systematic review and meta-analysis. *J Endocr Soc.* 2019;3:979-995. doi 10.1210/js.2019-00041
- Yuan G., Zhang X., Liu S., Chen T. Chinese familial central precocious puberty with hyperuricemia due to recurrent *DLK1* mutation: case report and review of the literature. *Mol Genet Genomic Med.* 2022;10(12):e2087. doi 10.1002/mgg3.2087

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 26.09.2024. После доработки 18.11.2024. Принята к публикации 26.11.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-34

Идентификация грибных болезней земляники садовой на основе анализа гиперспектральных изображений методами машинного обучения

А.Ф. Чешкова 

Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук, р. п. Краснообск, Новосибирская область, Россия

 cheshanna@yandex.ru

Аннотация. Белая, бурая и угловатая пятнистости являются наиболее распространенными грибными болезнями земляники садовой в Западной Сибири, значительно влияющими на ее урожайность и качество. Точная, быстрая и неинвазивная диагностика этих заболеваний имеет важное значение в промышленном производстве земляники. В настоящей статье исследуются возможности применения методов машинного обучения и гиперспектральной визуализации для обнаружения и дифференциации на листьях земляники симптомов, вызванных патогенными грибами *Ramularia tulasnei* Sacc., *Marssonina potentillae* Desm. и *Dendrophoma obscurans* Anders. Спектр отражения листьев регистрировали гиперспектральной камерой Photonfocus MV1-D2048x1088-HS05-96-G2-10 в лабораторных условиях методом линейного сканирования. Для дифференциации здоровых и пораженных областей листьев изучено пять методов машинного обучения: метод опорных векторов (SVM), метод К-ближайших соседей (KNN), линейный дискриминантный анализ (LDA), дискриминантный анализ частичных наименьших квадратов (PLS-DA) и случайный лес (RF). С целью уменьшения высокой размерности извлеченных спектральных данных и увеличения скорости их обработки было отобрано несколько подмножеств оптимальных длин волн, несущих наиболее важную спектральную информацию. Рассмотрены следующие методы сокращения размерности: метод анализа ROC-кривых, метод анализа производных, метод PLS-DA, метод ReliefF. Кроме того, 16 вегетационных индексов задействовано в качестве информативных признаков. Наибольшую точность классификации, 89.9 %, показал метод опорных векторов на полном спектре значений. При использовании вегетационных индексов и наборов оптимальных длин волн общая точность классификации всех методов снизилась незначительно по сравнению с классификацией на полном спектре значений. Результаты исследования подтверждают перспективность применения методов гиперспектральной визуализации в сочетании с методами машинного обучения для дифференциации грибных болезней земляники садовой.

Ключевые слова: гиперспектральные изображения; грибные болезни земляники; методы машинного обучения; сокращение размерности

Для цитирования: Чешкова А.Ф. Идентификация грибных болезней земляники садовой на основе анализа гиперспектральных изображений методами машинного обучения. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(2):310-319. doi 10.18699/vjgb-25-34

Identification of fungal diseases in strawberry by analysis of hyperspectral images using machine learning methods

A.F. Cheshkova 

Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia

 cheshanna@yandex.ru

Abstract. Leaf spot, leaf scorch and phomopsis leaf blight are the most common fungal diseases of strawberry in Western Siberia, which significantly reduce its yield and quality. Accurate, fast and non-invasive diagnosis of these diseases is important for strawberry production. This article explores the ability of hyperspectral imaging to detect and differentiate symptoms caused to strawberry leaves by pathogenic fungi *Ramularia tulasnei* Sacc., *Marssonina potentillae* Desm. and *Dendrophoma obscurans* Anders. The reflection spectrum of leaves was acquired with a Photonfocus MV1-D2048x1088-HS05-96-G2-10 hyperspectral camera under laboratory conditions using the line scanning method. Five machine learning methods were considered to differentiate between healthy and diseased leaf areas: Support Vector Machine (SVM), K-Nearest Neighbors (KNN), Linear Discriminant Analysis (LDA), Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA), and Random Forest (RF). In order to reduce the high dimensionality of the extracted spectral data and to increase the speed of their processing, several subsets of optimal wavelengths were selected. The following dimensionality reduction methods were explored: ROC curve analysis method, derivative analysis method, PLS-DA method, and ReliefF method. In addition, 16 vegetation indices were used as features. The support vector machine method demonstrated the highest classification accuracy of 89.9 % on the full range spectral data. When using vegeta-

tion indices and optimal wavelengths, the overall classification accuracy of all methods decreased slightly compared to the classification on the full range spectral data. The results of the study confirm the potential of using hyperspectral imaging methods in combination with machine learning for differentiating fungal diseases of strawberries.

Key words: hyperspectral imaging; fungal diseases of strawberries; machine learning methods; dimensionality reduction

For citation: Cheshkova A.F. Identification of fungal diseases in strawberry by analysis of hyperspectral images using machine learning methods. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii*=*Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(2):310-319. doi 10.18699/vjgb-25-34

Введение

Земляника садовая – одна из самых популярных ягодных культур среди потребителей во всем мире благодаря своим высоким вкусовым качествам и питательной ценности (Zheng et al., 2021). Кроме того, земляника отличается способностью к быстрому вегетативному размножению, высокой урожайностью и рентабельностью. К сдерживающим факторам увеличения производства ягод земляники садовой относится значительное поражение возделываемых сортов грибными болезнями, что приводит к снижению урожайности и экономическим потерям. Наиболее распространенные грибные болезни земляники садовой в Западной Сибири – рамуляриоз (белая пятнистость), бурая и угловатая пятнистости (Говорова, Говоров, 2015). Раннее выявление данных заболеваний имеет решающее значение для целенаправленного применения соответствующих мер защиты растений.

Традиционные методы диагностики, такие как визуальная экспертиза и микробиологический лабораторный анализ, высокочрезвычайно по времени и человеческим ресурсам, что ограничивает возможность их применения в крупных сельскохозяйственных предприятиях. В последние годы большой потенциал продемонстрировал метод анализа гиперспектральных изображений (Mishra et al., 2017; Mahlein et al., 2018; Чешкова, 2022) в качестве эффективного и неинвазивного инструмента мониторинга биотического и абиотического стресса растений. При воздействии патогенов происходят изменения биохимических и биофизических свойств растений, создается спектр отражения, отличный от спектра здоровых листьев. Современные оптические сенсоры регистрируют до нескольких сотен полос электромагнитного спектра в широком диапазоне длин волн и формируют спектральный профиль для каждого отдельного пикселя, тем самым комбинируя спектральную и пространственную информацию (Mishra et al., 2017). Метод гиперспектральной визуализации соединяет в себе преимущества методов машинного зрения и оптической спектроскопии, позволяя одновременно оценивать как физиологические, так и морфологические параметры. В настоящее время в научных публикациях приводятся примеры успешного применения метода гиперспектральной визуализации для распознавания различных заболеваний земляники, таких как мучнистая роса (Mahmud et al., 2020), антракноз (Lu et al., 2017; Jiang et al., 2021), вертициллезное увядание (Cockerton et al., 2019), серая гниль (Wu et al., 2023), пятнистости (Cheshkova, 2023).

Для анализа большого объема полученных многомерных данных наилучшим инструментом являются методы машинного обучения (Nagaraju et al., 2020; Venos et al., 2021). Множество исследований показывает, что использо-

вание вегетационных индексов в качестве информативных признаков для построения моделей машинного обучения позволяет добиться хороших результатов в обнаружении и распознавании болезней сельскохозяйственных культур (Mahlein et al., 2013; Lu et al., 2017).

Гиперспектральные данные характеризуются высокой коллинеарностью. Большое количество длин волн усложняет модели и снижает производительность. Один из важных этапов предварительной обработки данных – уменьшение размерности, целью которого является устранение спектральной избыточности при сохранении важной информации (Liu et al., 2014; Sun, Du, 2019). Уменьшение размерности может быть достигнуто за счет выбора определенных длин волн либо выделения информативных признаков.

Цель настоящей работы – исследование возможности применения метода гиперспектральной визуализации в сочетании с методами машинного обучения для дифференцирования здоровых и пораженных белой (*Ramularia tulasnei* Sacc.), бурой (*Marssonina potentillae* Desm.) и угловатой (*Dendrophoma obscurans* Anders.) пятнистостями листьев земляники садовой; сравнение и выбор наиболее точного метода классификации гиперспектральных изображений, позволяющего идентифицировать грибные болезни земляники садовой; исследование возможности использования методов сокращения размерности и вегетационных индексов для оптимизации моделей машинного обучения.

Материалы и методы

Растительный материал. Исследованы три вида грибных болезней земляники садовой, наиболее распространенных в Западной Сибири: белая, бурая и угловатая пятнистости.

Белая пятнистость (рамуляриоз). Возбудитель: *Mycosphaerella fragariae* (Tul.) Lindau; конидиальная стадия – *Ramularia tulasnei* Sacc. На пораженных листьях появляются мелкие пурпуровые или красновато-бурые округлые пятна, которые разрастаются в диаметре от 1 до 8 мм, в центре становятся белыми, с темно-бурым или пурпуровым ободком.

Бурая пятнистость земляники. Возбудитель: *Diplocarpon earliana* (Ell. et Ev.) Wolf; конидиальная стадия – *Marssonina potentillae* (Desm.) P. Magn., *M. fragariae* (Lib.) Ohl. Пораженные листья покрываются многочисленными, от очень мелких (0.1 мм), до крупных (0.5 см), темнопурпуровыми пятнами, часто расплывчатыми, иногда сливающимися.

Угловатая пятнистость (фомопсис, побурение). Возбудитель: *Dendrophoma obscurans* (Ell. et Ev.) H.W. Ander-

son (синонимы *Phomopsis obscurans* (Ell. et Ev.) Sutton). Болезнь характеризуется появлением на листьях (чаще старых) округлых или неопределенной формы светло-, темно- или красно-коричневых пятен, часто со светлым центром. Вокруг пятна обычно темно-коричневая или темно-красная кайма. Пятна расположены по краю листовой пластинки или вдоль средней жилки листа.

Исследования проводили на образцах земляники садовой, выращенных на биополигоне Сибирского физико-технического института аграрных проблем (СибФТИ) Сибирского федерального научного центра агробиотехнологий РАН (Новосибирская область, р.п. Краснообск) в 2021–2023 гг. В течение вегетационного периода было отобрано 120 растений, включающих 30 здоровых растений, а также по 30 растений, имеющих видимые симптомы поражения белой, бурой или угловатой пятнистостями. На каждом растении было выбрано по одному листу. Листья были отделены от растений для проведения дальнейших исследований в лаборатории. Идентификация болезни и степени поражения осуществлялась посредством визуальной экспертизы по видимым симптомам заболевания (Garrido et al., 2011; Говорова, Говоров, 2015).

Получение и калибровка изображения. Съемку проводили гиперспектральной камерой Photonfocus MV1-D2048x1088-HS05-96-G2-10, с сенсором IMEC CMV2K-LS150-VNIR (Photonfocus AG, Швейцария), диапазон длин волн 470–900 нм, спектральное разрешение 3 нм, пространственное разрешение 2048×1088 пикселей методом линейного сканирования с использованием подвижной платформы, управляемой контроллером. Программно-аппаратный комплекс для выполнения исследований разработан совместно Институтом автоматизации и электротехники СО РАН и СибФТИ СФНЦА РАН (Максимов и др., 2023). Листья земляники для проведения съемки помещали на площадку белого цвета. Источник освещения – две галогенные лампы. Шаг сканирования, диафрагма и высота закрепления камеры были определены экспериментально. Дополнительно в конце каждого сканирования создавали два калибровочных файла с «черным» и «белым» эталонными спектрами. «Черный» спектр получали, закрыв объектив камеры непрозрачной крышкой. «Белый» спектр регистрировали с использованием стандартной белой поверхности для получения максимально возможной интенсивности пикселей на каждой длине волны. Затем исходное гиперспектральное изображение калибровали по формуле:

$$R = \frac{I_S - I_D}{I_W - I_D},$$

где I_S – исходное изображение; I_D – черное эталонное изображение; I_W – белое эталонное изображение; R – результирующее изображение.

По результатам сканирования были сформированы трехмерные массивы данных (гиперкубы), содержащие два измерения пространственной информации и дополнительно одно измерение спектральной информации (2048×1088×131).

Извлечение и обработка данных. Полученные файлы изображений были разделены на две группы: 96 изображений листьев для формирования обучающей выборки

(по 24 в каждом из 4 классов) и 24 изображения листьев для формирования валидационной выборки (по 6 в каждом из 4 классов). Извлечение спектральных данных выполняли в программе ENVI 5.2 (NV5 Geospatial Solutions, Inc., США). На изображении листьев земляники вручную были выделены области интереса (ROI), соответствующие здоровой ткани листа и цветковым пятнам белой, бурой и угловатой пятнистостей (рис. 1). Из каждой выделенной области случайным образом выбирали по 250 пикселей. В результате были сформированы обучающая выборка из 24 000 значений спектра (по 6000 пикселей для класса) и валидационная выборка из 6000 значений (по 1500 пикселей).

Далее для сглаживания спектра и коррекции рассеивания к спектральным данным были применены фильтр Савицкого–Голя (Savitzky, Golay, 1964) и нормализация стандартным преобразованием (standard normal variate) (Vidal, Amigo, 2012).

Методика определения оптимальных длин волн. В нашем исследовании рассмотрены следующие методы сокращения размерности:

- метод анализа ROC-кривых (Luo et al., 2012); в качестве метрики, определяющей значимость признака, используется значение AUC (area under curve); из всего спектра данных оставляют те длины волн, для которых AUC превышает определенное пороговое значение;
- метод анализа производных (Savitzky, Golay, 1964); из всего спектра данных оставляют те длины волн, для которых абсолютное значение 2-й производной имеет локальный экстремум;
- метод PLS-DA (Mehmood et al., 2012); после построения модели для каждого класса выбирают длины волн, для которых абсолютная величина коэффициента регрессии превышает определенное пороговое значение;
- метод ReliefF (Kononenko, 1994; Urbanowicz et al., 2018); для ранжирования признаков используют итеративный алгоритм, который присваивает признакам разные веса в зависимости от категории и корреляции каждого объекта, признаки с весами ниже определенного порогового значения удаляются.

Выбор вегетационных индексов. Вегетационные индексы являются алгебраическими комбинациями, рассчитываемыми на основе значений спектра отражения для двух или более выбранных длин волн.

Для нашего исследования было отобрано 16 вегетационных индексов (табл. 1), характеризующих содержание хлорофилла, пигментов, воды, азота и углерода в тканях растений (Wu et al., 2023). Эти вегетационных индексы связаны с фотохимической активностью (PRI), изменением пигментов (PSSRa, PSSRb, CRI, ARI), содержанием азота (NRI), углерода (PSRI), хлорофилла (MCARI, TVI, VOG1, VOG2, VOG3) и общим физиологическим состоянием листьев растений (NDVI, RENDVI, RVSI, PhRI).

Методы моделирования и анализа данных. Для дифференциации здоровых и пораженных областей листьев земляники в нашем исследовании было рассмотрено пять методов машинного обучения (SVM, KNN, LDA, PLS-DA, RF), наиболее часто используемых в классификации гиперспектральных данных (Singh et al., 2016; Benos et al., 2021).

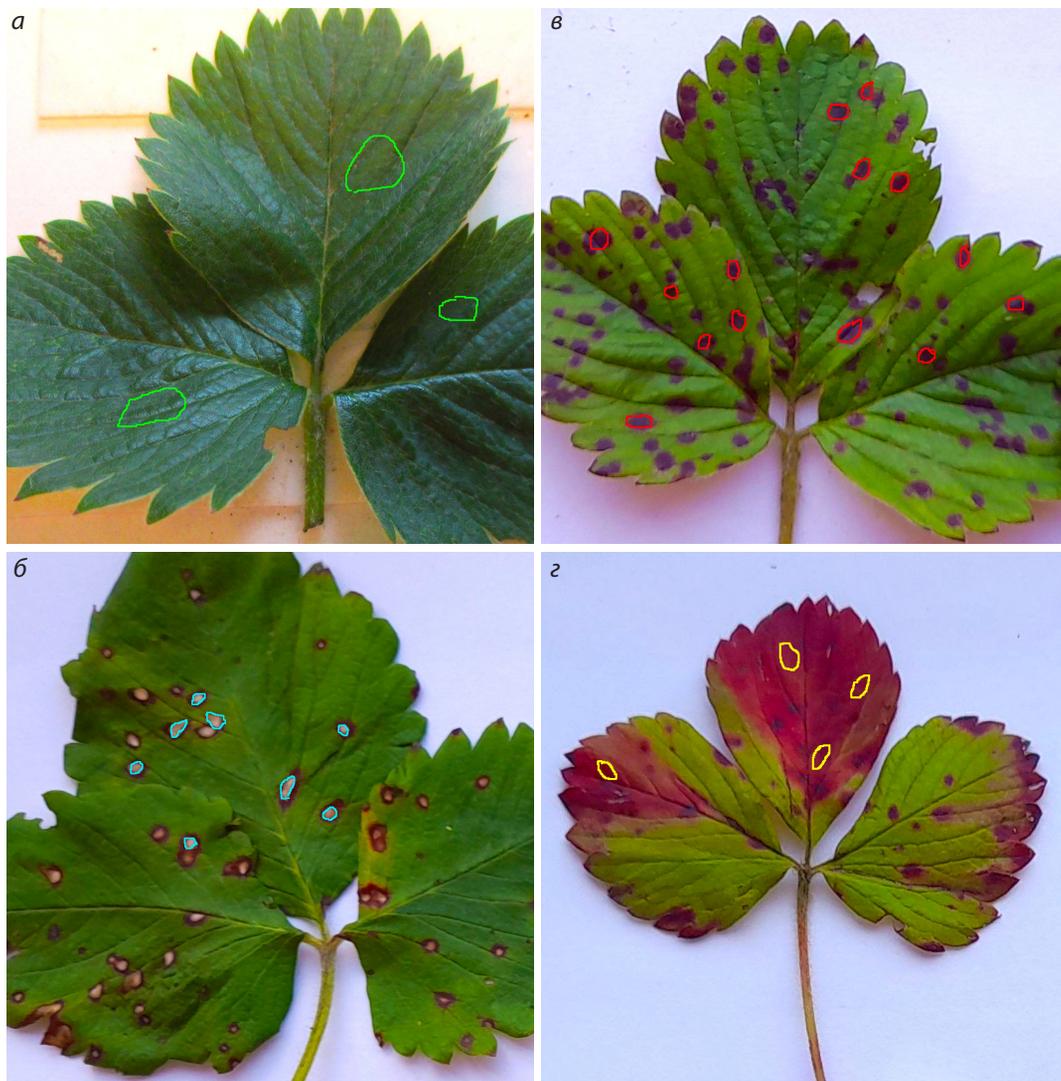


Рис. 1. Выделение ROI: а – здоровые области, б – области белой пятнистости, в – области бурой пятнистости, з – области угловой пятнистости.

Метод опорных векторов (support vector machine). Основная идея метода SVM – перевод исходных векторов в пространство более высокой размерности и поиск разделяющей гиперплоскости с наибольшим зазором в этом пространстве. В качестве ядра классификатора была взята радиальная базисная функция Гаусса.

Метод К-ближайших соседей (K-nearest neighbors). При классификации объект присваивается к классу, наиболее распространенному среди К-ближайших соседей этого элемента, классы которых уже известны. Близость объектов определяет значение функции расстояния. В нашем исследовании в качестве функции расстояния использована евклидова метрика.

Линейный дискриминантный анализ (linear discriminant analysis). Проецирует многомерные данные в пространство меньшей размерности, чтобы способствовать разделению классов. Оптимальная проекция в классическом LDA получается путем максимизации расстояния между разными классами и минимизации расстояния внутри одного класса.

Дискриминантный анализ частичных наименьших квадратов (partial least squares discriminant analysis). Является вариантом объединения регрессии PLSR в пространстве оптимальных латентных структур и дискриминантного анализа (DA). В отличие от классического дискриминантного анализа, в котором выполняется поиск гиперплоскостей максимальной дисперсии независимых предикторов, PLS-DA строит модель линейной регрессии, проецируя прогнозируемые и наблюдаемые переменные в новое редуцированное пространство.

Случайный лес (Random Forest). Нелинейная модель машинного обучения, основанная на использовании ансамбля решающих деревьев.

В качестве метрики оценки качества моделей используется общая точность классификации (overall accuracy), вычисляемая как процент отношения правильно классифицированных объектов к общему числу объектов.

Все расчеты и анализ данных были проведены в программной среде R с помощью пакетов caret, kernlab, randomForest, klaR, pls, CORElearn, class, MASS, terra.

Таблица 1. Вегетационные индексы, использованные в качестве информативных признаков

№	Индекс	Формула
1	NDVI (normalized difference vegetation index)	$(R_{800} - R_{670}) / (R_{800} + R_{670})$
2	RENDVI (red edge normalized difference vegetation index)	$(R_{750} - R_{705}) / (R_{750} + R_{705})$
3	PhRI (physiological reflectance index)	$(R_{550} - R_{531}) / (R_{550} + R_{531})$
4	RVSI (red-edge vegetation stress index)	$[(R_{712} + R_{752}) / 2] - R_{732}$
5	MCARI (modified chlorophyll absorption ratio index)	$[(R_{700} - R_{670}) - 0.2 \cdot (R_{700} - R_{550})] \cdot (R_{700} / R_{670})$
6	TVI (triangular vegetation index)	$0.5 \cdot [120 \cdot (R_{750} - R_{550}) - 200 \cdot (R_{670} - R_{550})]$
7	VOG1 (Vogelman index 1)	R_{740} / R_{720}
8	VOG2 (Vogelman index 2)	$(R_{734} - R_{747}) / (R_{715} + R_{726})$
9	VOG3 (Vogelman index 3)	R_{715} / R_{705}
10	PSRI (plant senescence reflectance index)	$(R_{680} - R_{500}) / R_{750}$
11	NRI (nitrogen reflectance index)	$(R_{570} - R_{670}) / (R_{570} + R_{670})$
12	PSSRa	R_{800} / R_{680}
13	PSSRb (pigments specific simple ratio)	R_{800} / R_{635}
14	CRI (carotenoid reflectance index)	$1 / R_{510} - 1 / R_{550}$
15	ARI (anthocyanin reflectance index)	$1 / R_{550} - 1 / R_{700}$
16	PRI (photochemical/physiological reflectance index)	$(R_{531} - R_{570}) / (R_{531} + R_{570})$

Примечание. NDVI – нормализованный разностный вегетационный индекс; RENDVI – нормализованный разностный вегетационный индекс в крайнем красном спектре; PhRI – индекс физиологического отражения; RVSI – вегетационный индекс состояния в крайнем красном спектре; MCARI – модифицированный относительный индекс поглощения в хлорофилле; TVI – треугольный вегетационный индекс; VOG1, VOG2, VOG3 – индексы Вогельмана; PSRI – индекс отражения огрубевшего углерода в растительных тканях; NRI – индекс отражения азота; PSSRa, PSSRb – индексы удельного соотношения пигментов; CRI – индекс отражения каротиноидов; ARI – индекс отражения антоцианов; PRI – фотохимический индекс отражения.

Результаты

Спектральные характеристики образцов

На рис. 2 представлены усредненные значения спектра отражения здоровых и пораженных грибными болезнями листьев земляники. Спектральные кривые имеют типичные для растительной ткани характеристики (Mishra et al., 2017). Общей чертой всех спектральных кривых является более низкий коэффициент отражения в видимом диапазоне длин волн по сравнению с ближним инфракрасным диапазоном. На длине волн около 670 нм наблюдается снижение коэффициента отражения, что связано с сильным поглощением света хлорофиллом в листьях. В диапазоне длин волн 670–760 нм отражательная способность листьев резко возрастает по причине рассеивания света в межклеточном пространстве. В диапазоне длин волн 760–900 нм коэффициент отражения остается высоким.

Наблюдаются определенные различия между спектрами. Так, у здоровых зеленых тканей листа отмечается характерный пик на длине волны 550 нм (зона поглощения азота), в то время как пораженные пятнистостями ткани имеют спад в этой области. В диапазоне 720–810 нм здоровая и пораженная бурой пятнистостью ткани имеют более высокий коэффициент отражения, по сравнению с бурой и угловатой пятнистостями. А в диапазоне 810–900 нм, наоборот, более низкий. Отражательная характеристика листьев, пораженных белой пятнистостью, равномерно растет на всем диапазоне длин волн.

Выбор оптимальных длин волн

Предварительно проведенный дисперсионный анализ (ANOVA) выявил значимость различий средних значений

коэффициентов отражения в исследуемых областях для каждой из длин волн согласно F-критерию с уровнем значимости $p < 0.001$. Кроме того, для каждой из рассматриваемых моделей был применен пошаговый метод сокращения размерности, в результате которого также было обнаружено, что все длины волн значимы для классификации.

Для сокращения размерности исходных данных были рассмотрены четыре различные методики, определившие разные наборы информативных длин волн (рис. S1–S4 Приложения)¹.

Методом анализа ROC-кривых были определены 23 длины волны (нм): [541.39, 545.04, 548.92, 550.41, 553.99, 557.94, 561.3, 565.18, 568.58, 745.48, 748.98, 751.75, 756.45, 759.36, 763.0, 765.97, 769.44, 772.39, 775.92, 778.56, 781.11, 784.53, 787.2], для которых AUC превысило пороговое значение 0.99.

Методом анализа производных при пороговом значении 1.0 выбраны следующие 15 длин волн (нм): [677.11, 680.47, 682.99, 685.28, 688.76, 691.62, 695.25, 697.97, 709.54, 712.19, 729.07, 732.25, 736.15, 739.20, 742.67].

Методом PLS-DA для порогового значения коэффициентов регрессии 0.4 выбраны следующие 16 длин волн (нм): [498.68, 502.7, 505.97, 510.11, 513.5, 517.33, 522.39, 526.49, 529.98, 533.99, 541.39, 680.47, 682.99, 688.76, 691.62, 722.02].

Методом ReliefF для порогового значения коэффициентов значимости 0.5 выбраны следующие 24 длины волны (нм): [537.27, 541.39, 545.04, 548.92, 550.41, 557.94,

¹ Рис. S1–S4 Приложения см. по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx10.pdf>

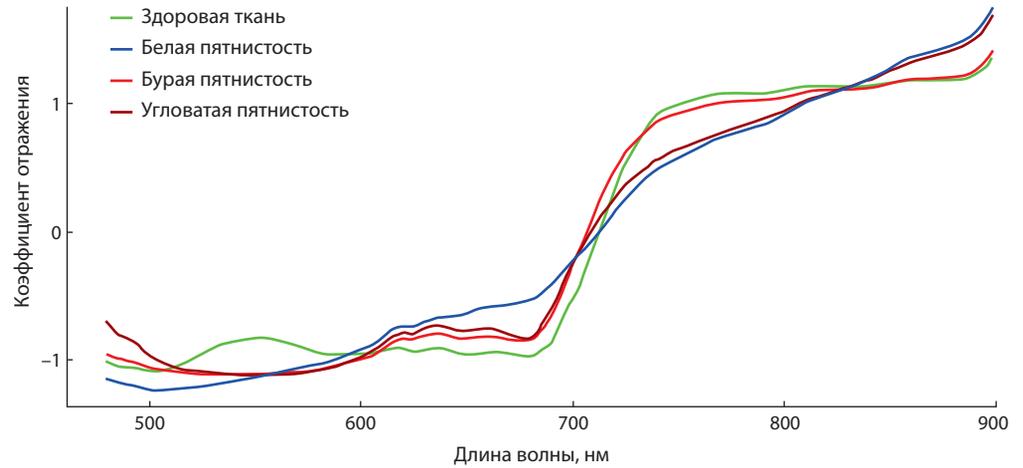


Рис. 2. Средний спектр отражения здоровых и инфицированных областей листьев земляники садовой.

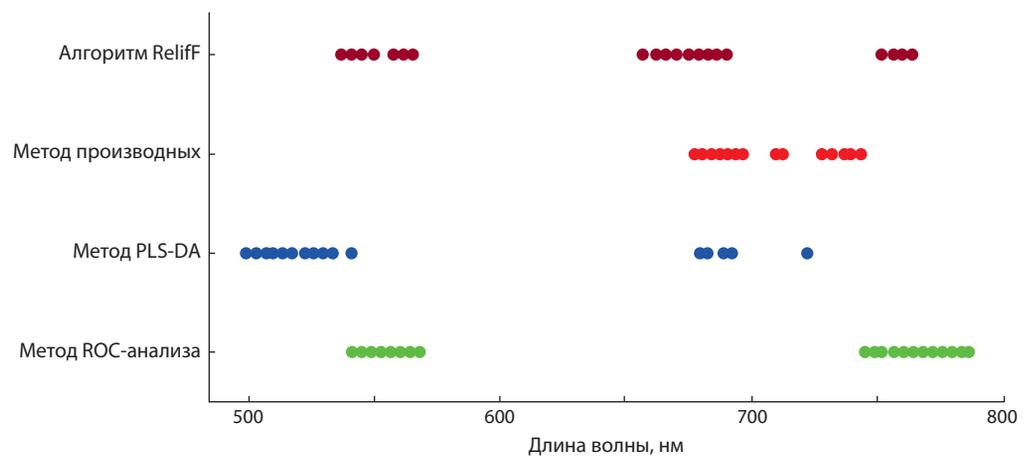


Рис. 3. Наборы оптимальных длин волн, определенных различными методами.

561.3, 565.18, 657.08, 662.06, 664.83, 668.35, 670.93, 674.46, 677.11, 680.47, 682.99, 685.28, 688.76, 691.62, 751.75, 756.45, 759.36, 763.00].

Сравнение между собой выбранных различными методами наборов оптимальных длин волн (рис. 3) позволяет сделать вывод, что наиболее информативны для классификации диапазоны длин волн [542–565 нм] и [680–691 нм].

Расчет вегетационных индексов

Шестнадцать вегетационных индексов были рассчитаны по соответствующим формулам (см. табл. 1) для каждого объекта в обучающей выборке. Для каждого индекса был выполнен дисперсионный анализ (ANOVA) с целью выявления значимости различий средних значений индексов по видам болезней. Все 16 индексов имели уровень значимости $p < 0.001$.

Результаты классификации на полном спектре значений

В нашем исследовании пять различных моделей, SVM, KNN, LDA, PLS-DA, RF, были применены для классификации здоровых и пораженных грибными болезнями листьев земляники. Сначала модели были построены для полного спектра длин волн (131 длина волны в диапазо-

не 470–900 нм). Методом кросс-валидации были подобраны следующие оптимальные гиперпараметры: SVM ($\sigma = 0.03$, $C = 6$), KNN ($K = 9$), RF ($mtry = 11$), PLS-DA ($ncomp = 38$). Результаты классификации приведены в табл. 2. Анализ данных показывает, что основные ошибки в классификации происходят при дифференциации бурой и угловатой пятнистостей, так как эти области имеют сходный спектр отражения.

Метод опорных векторов на полном спектре значений показал наибольшую точность классификации (90 %), а метод К-ближайших соседей – наименьшую (85 %).

Результаты классификации на наборах оптимальных длин волн и на вегетационных индексах

Каждая из пяти моделей классификации, SVM, KNN, LDA, PLS-DA, RF, была протестирована на наборах оптимальных длин волн, полученных в результате применения четырех различных методов сокращения размерности (анализа ROC-кривых, анализа производных, PLS-DA, ReliefF), а также на наборе значений 16 вегетационных индексов (табл. 3).

Как видно из табл. 3, общая точность классификации всех методов снизилась, по сравнению с классификацией

Таблица 2. Матрицы ошибок для классификации гиперспектральных изображений различными методами на полном спектре значений

Результат классификации	Реальные значения класса, %				Общая точность классификации, %
	Здоровые области	Белая пятнистость	Бурая пятнистость	Угловатая пятнистость	
SVM					89.90
Здоровые области	98.07	0.73	0.07	0.00	
Белая пятнистость	0.73	95.13	1.07	1.27	
Бурая пятнистость	0.33	3.20	92.67	25.00	
Угловатая пятнистость	0.87	0.93	6.20	73.73	
KNN					85.17
Здоровые области	98.73	1.13	0.33	0.00	
Белая пятнистость	0.27	90.80	1.27	1.73	
Бурая пятнистость	0.27	5.33	92.13	39.27	
Угловатая пятнистость	0.73	2.73	6.27	59.00	
RF					86.93
Здоровые области	98.20	0.87	0.20	0.00	
Белая пятнистость	0.40	93.27	0.67	0.47	
Бурая пятнистость	0.27	3.53	90.40	33.67	
Угловатая пятнистость	1.13	2.33	8.73	65.87	
LDA					89.15
Здоровые области	99.00	1.00	0.07	0.0	
Белая пятнистость	0.07	93.07	0.93	0.4	
Бурая пятнистость	0.93	3.53	89.53	24.6	
Угловатая пятнистость	0.00	2.40	9.47	75.0	
PLS-DA					87.63
Здоровые области	99.93	1.87	1.07	0.00	
Белая пятнистость	0.00	94.60	1.87	0.33	
Бурая пятнистость	0.00	1.47	81.13	24.80	
Угловатая пятнистость	0.07	2.07	15.93	74.87	

Примечание. SVM – метод опорных векторов; KNN – метод К-ближайших соседей; LDA – линейный дискриминантный анализ; PLS-DA – дискриминантный анализ частичных наименьших квадратов; RF – случайный лес.

Таблица 3. Общая точность классификации (%) гиперспектральных изображений различными методами на выбранных длинах волн и на вегетационных индексах

Модель	Метод сокращения размерности				На 16 вегетационных индексах
	анализа ROC-кривых	анализа производных	PLS-DA	ReliefF	
SVM	77.37	83.03	85.13	78.32	89.75
KNN	76.40	81.60	83.27	77.48	82.65
RF	77.55	82.67	83.50	78.57	84.25
LDA	74.32	80.55	85.88	76.93	84.62
PLS-DA	69.00	75.45	85.60	77.15	84.70

Примечание. SVM – метод опорных векторов; KNN – метод К-ближайших соседей; RF – случайный лес; LDA – линейный дискриминантный анализ; PLS-DA – дискриминантный анализ частичных наименьших квадратов.

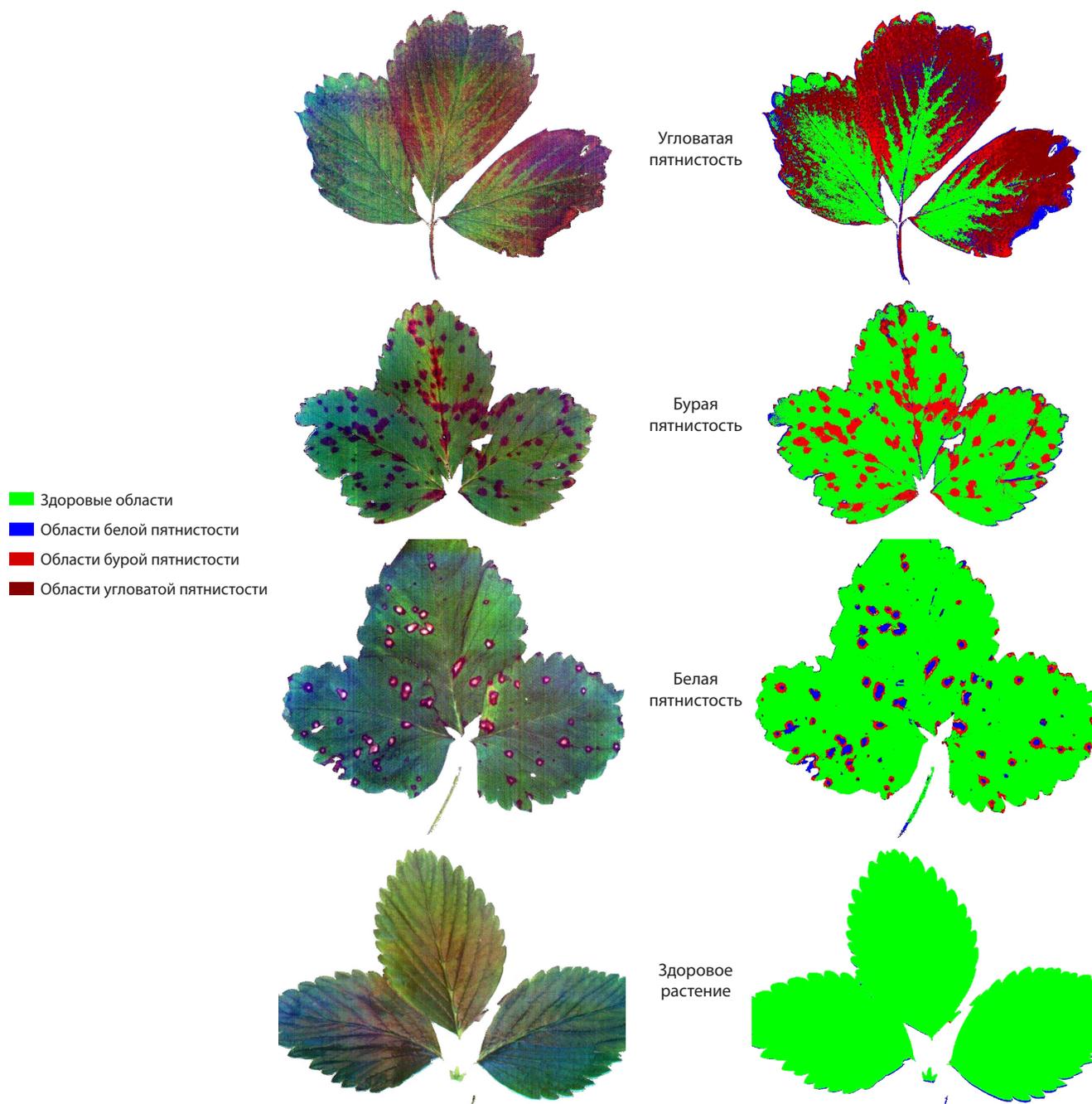


Рис. 4. Визуализация классификации видов болезней земляники методом опорных векторов на полном спектре значений.

на полном спектре значений. Наибольшая точность классификации для всех моделей получена для вегетационных индексов в качестве информативных признаков и для набора длин волн, выбранных методом PLS-DA.

Диагностика грибных болезней земляники с использованием оптимизированных моделей

Построенные оптимизированные модели могут быть использованы для обнаружения и дифференциации грибных болезней земляники. На рис. 4 представлен пример применения модели SVM для диагностики различных видов грибных болезней.

Обсуждение

Анализ гиперспектральных изображений методами машинного обучения уже успешно применялся в научных исследованиях для выявления болезней земляники. Так, G. Wu с коллегами (2023) изучали возможности использования гиперспектральной визуализации в сочетании со спектральными характеристиками, вегетационными индексами и текстурными характеристиками для обнаружения серой гнили на листьях земляники в лабораторных условиях. Были построены и оптимизированы три модели машинного обучения: ELM, KNN, SVM. Общая точность классификации моделей достигала 96 %.

В работе (Jiang et al., 2021) на основе выбранных спектральных признаков применено шесть методов машинного обучения, SVM, ELM, KNN, PLS-DA, RF, NB, для раннего обнаружения антракноза и серой гнили земляники в лабораторных условиях. Большинство классификационных моделей показали высокую точность (до 100 %), распознавая классы инфекций до появления видимых симптомов заболевания. В нашем исследовании полученная точность классификации заболеваний не превысила 90 %. Данный результат можно объяснить несколькими причинами. Во-первых, рассматривались сразу три вида заболеваний, а не одно или два, как в других исследованиях. Во-вторых, для успешной дифференциации заболеваний необходимо различие спектральных характеристик пораженных патогенами листьев растений. Мы выявили, что основные ошибки в классификации происходят при дифференциации бурой и угловатой пятнистостей, так как эти области имеют сходный спектр отражения. Возможный путь решения данной проблемы – использование сверточных нейронных сетей, учитывающих не только спектральные, но и текстурные характеристики пораженных листьев, такие как форма и расположение пятен.

Выбор метода классификации зависит от культуры и изучаемых болезней. Среди рассмотренных нами пяти популярных моделей машинного обучения, SVM, KNN, LDA, PLS-DA, RF, наилучшую точность классификации показал метод опорных векторов (SVM), что согласуется с результатами других работ (Benos et al., 2021).

Для снижения размерности и выбора оптимальных длин волн при построении моделей ученые применяют различные методы. Так, в работах (Luo et al., 2012; Jiang et al., 2021; Wu et al., 2023) задействованы алгоритмы CARS, CARS-RF, ReliefF и ROC. Сокращение размерности во многих исследованиях не снижает точности моделей, однако в нашем случае все исходные длины волн оказались информативными, и точность классификации незначительно снизилась по сравнению с полным спектром.

Полученные результаты лабораторных исследований говорят о перспективности применения методов гиперспектральной визуализации для диагностики грибных болезней земляники садовой в сельскохозяйственном производстве. В литературе уже описаны примеры успешного использования гиперспектральных сенсоров, установленных на БПЛА, для диагностики биотических и абиотических стрессов растений (Yang et al., 2017).

В дальнейшем мы планируем опробовать применение методов гиперспектральной визуализации в полевых условиях с целью автоматизации диагностики грибных болезней земляники.

Заключение

Анализ гиперспектральных изображений с использованием методов машинного обучения позволяет обнаружить и дифференцировать грибные болезни земляники (белую, бурую и угловатую пятнистости) при наличии видимых симптомов заболеваний. Для эффективного определения вида заболевания были построены и оценены пять различных моделей классификации: SVM, KNN, LDA, PLS-DA и RF. Наибольшую точность классификации, 89.9 %, на полном спектре значений (131 длина волны в диапазоне

470–900 нм) показал метод опорных векторов (SVM). С целью упрощения моделей и повышения скорости обработки данных было рассмотрено четыре различных метода сокращения размерности (анализа ROC-кривых, анализа производных, PLS-DA, ReliefF). Кроме того, модели были протестированы на наборе из 16 вегетационных индексов в качестве исходных признаков. Общая точность классификации всех методов снизилась незначительно по сравнению с классификацией на полном спектре значений. Набор из 16 оптимальных длин волн, полученный методом PLS-DA, и набор из 16 вегетационных индексов имели более высокую точность классификации, чем остальные наборы длин волн.

Список литературы / References

- Говорова Г.Ф., Говоров Д.Н. Грибные болезни земляники садовой, селекция на иммунитет и другие методы защиты. М.: РГАУ-МСХА, 2015
- [Govorova G.F., Govorov D.N. Fungal Diseases of Garden Strawberries: Breeding for Immunity and Other Methods of Protection. Moscow, 2015 (in Russian)]
- Максимов Л.В., Гурова Т.А., Елкин О.В. Разработка программно-аппаратного комплекса для фенотипирования стресса зерновых культур по гиперспектральным изображениям. В: Обработка пространственных данных в задачах мониторинга природных и антропогенных процессов (SDM-2023). Новосибирск: ФИЦ ИВТ, 2023;289-293. doi 10.25743/sdm.2023.42.73.049
- [Maximov L.V., Gurova T.A., Elkin O.V. Development of software and hardware complex for phenotyping of grain crop stress by hyperspectral images. In: Spatial Data Processing for Monitoring of Natural and Anthropogenic Processes (SDM-2023). Novosibirsk, 2023;289-293. doi 10.25743/sdm.2023.42.73.049 (in Russian)]
- Чешкова А.Ф. Обзор современных методов обнаружения и идентификации болезней растений на основе анализа гиперспектральных изображений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(2):202-213. doi 10.18699/VJGB-22-25
- [Cheshkova A.F. A review of hyperspectral image analysis techniques for plant disease detection and identification. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2022;26(2):202-213. doi 10.18699/VJGB-22-25]
- Benos L., Tagarakis A., Dolias G., Berruto R., Kateris D., Bochtis D. Machine learning in agriculture: a comprehensive updated review. *Sensors*. 2021;21:3758. doi 10.3390/s21113758
- Cheshkova A.F. Application of machine learning methods for the differentiation of fungal diseases in strawberry based on hyperspectral image analysis. *E3S Web Conf*. 2023;390:03018. doi 10.1051/e3s-conf/202339003018
- Cockerton H.M., Li B., Vickerstaff R.J., Eyre C.A., Sargent D.J., Armitage A.D., Marina-Montes C., Garcia-Cruz A., Passey A.J., Simpson D.W., Harrison R.J. Identifying *Verticillium dahlia* resistance in strawberry through disease screening of multiple populations and image based phenotyping. *Front Plant Sci*. 2019;10:924. doi 10.3389/fpls.2019.00924
- Garrido C., Carbu M., Fernandez-Acero J.F., Gonzalez-Rodriguez V.E., Cantoral J.M., New insights in the study of strawberry fungal pathogens. In: Husaini A.M., Mercado J.A. (Eds) Genomics, Transgenics, Molecular Breeding and Biotechnology of Strawberry. Global Science Books, UK, 2011;24-39
- Jiang Q., Wu G., Tian C., Li N., Yang H., Bai Y., Zhang B. Hyperspectral imaging for early identification of strawberry leaves diseases with machine learning and spectral fingerprint features. *Infrared Phys Technol*. 2021;118:103898. doi 10.1016/j.infrared.2021.103898
- Kononenko I. Estimating attributes: analysis and extensions of RELIEF. In: Bergadano F., De Raedt L. (Eds) Machine Learning: ECML-94. Lecture Notes in Computer Science. Vol. 784. Berlin: Springer, 1994;171-182. doi 10.1007/3-540-57868-4_57

- Liu D., Sun D.W., Zeng X.A. Recent advances in wavelength selection techniques for hyperspectral image processing in the food industry. *Food Bioprocess Technol.* 2014;7:307-323. doi 10.1007/s11947-013-1193-6
- Lu J., Ehsani R., Shi Y., Abdulridha J., de Castro A.I., Xu Y. Field detection of anthracnose crown rot in strawberry using spectroscopy technology. *Comput Electron Agric.* 2017;135:289-299. doi 10.1016/j.compag.2017.01.017
- Luo X., Takahashi T., Kyo K., Zhang S. Wavelength selection in vis/NIR spectra for detection of bruises on apples by ROC analysis. *J Food Eng.* 2012;109(3):457-466. doi 10.1016/j.jfoodeng.2011.10.035
- Mahlein A.-K., Rumpf T., Welke P., Dehne H.-W., Plümer L., Steiner U., Oerke E.-C. Development of spectral indices for detecting and identifying plant diseases. *Remote Sens Environ.* 2013;128:21-30. doi 10.1016/j.rse.2012.09.019
- Mahlein A.-K., Kuska M.T., Behmann J., Polder G., Walter A. Hyperspectral sensors and imaging technologies in phytopathology: state of the art. *Annu Rev Phytopathol.* 2018;56:535-558. doi 10.1146/annurev-phyto-080417-050100
- Mahmud M.S., Zaman Q.U., Esau T.J., Chang Y.K., Price G.W., Prithiviraj B. Real-time detection of strawberry powdery mildew disease using a mobile machine vision system. *Agronomy.* 2020;10:1027. doi 10.3390/agronomy10071027
- Mehmood T., Liland K.H., Snipen L., Sæbø S. A review of variable selection methods in Partial Least Squares Regression. *Chemom Intell Lab Syst.* 2012;118:62-69. doi 10.1016/j.chemolab.2012.07.010
- Mishra P., Asaari M., Herrero-Langreo A., Lohumi S., Diezma B., Scheunders P. Close range hyperspectral imaging of plants: a review. *Biosyst Eng.* 2017;164:49-67. doi 10.1016/j.biosystemseng.2017.09.009
- Nagaraju M., Chawla P. Systematic review of deep learning techniques in plant disease detection. *Int J Syst Assur Eng Manag.* 2020;11(3):547-560. doi 10.1007/s13198-020-00972-1
- Savitzky A., Golay M.J.E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal Chem.* 1964;36(8):1627-1639
- Singh A., Ganapathysubramanian B., Singh A.K., Sarkar S. Machine learning for high-throughput stress phenotyping in plants. *Trends Plant Sci.* 2016;21(2):110-124. doi 10.1016/j.tplants.2015.10.015
- Sun W., Du Q. Hyperspectral band selection: a review. *IEEE Geosci Remote Sens Mag.* 2019;7(2):118-139. doi 10.1109/MGRS.2019.2911100
- Urbanowicz R.J., Meeker M., Cava W., Olson R.S., Moore J.H. Relief-based feature selection: introduction and review. *J Biomed Inf.* 2018;85:189-203. doi 10.1016/j.jbi.2018.07.014
- Vidal M., Amigo J.M. Pre-processing of hyperspectral images. Essential steps before image analysis. *Chemom Intell Lab.* 2012;117:138-148. doi 10.1016/j.chemolab.2012.05.009
- Wu G., Fang Y., Jiang Q., Cui M., Li N., Ou Y., Diao Z., Zhang B. Early identification of strawberry leaves disease utilizing hyperspectral imaging combing with spectral features, multiple vegetation indices and textural features. *Comput Electron Agric.* 2023;204:107553. doi 10.1016/j.compag.2022.107553
- Yang G., Liu J., Zhao C., Li Z., Huang Y., Yu H., Xu B., Yang X., Zhu D., Zhang X., Zhang R., Feng H., Zhao X., Li Z., Li H., Yang H. Unmanned aerial vehicle remote sensing for field-based crop phenotyping: current status and perspectives. *Front Plant Sci.* 2017;8:1111. doi 10.3389/fpls.2017.01111
- Zheng C., Abd-Elrahman A., Whitaker V. Remote sensing and machine learning in crop phenotyping and management, with an emphasis on applications in strawberry farming. *Remote Sens.* 2021;13:531. doi 10.3390/rs13030531

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 27.04.2024. После доработки 07.11.2024. Принята к публикации 07.11.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-35

CropGene: программный комплекс анализа геномных и транскриптомных данных сельскохозяйственных растений

А.Ю. Прозозин ^{1,2} , Д.И. Каретников ^{1,2}, Н.А. Шмаков ^{1,2}, М.Е. Бочарникова ^{1,2}, С.Д. Афонникова ^{1,2},
Д.А. Афонников ^{1,2}, Н.А. Колчанов ^{1,2}

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

² Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

 PronozinAU@bionet.nsc.ru

Аннотация. В настоящее время селекция сельскохозяйственных растений все больше опирается на использование молекулярно-биологических данных о генетических последовательностях, что позволяет существенно ускорить селекционный процесс создания новых сортов растений за счет геномного редактирования. Эти данные имеют большой объем, разнообразны и требуют для анализа затрат большого количества ресурсов, как трудовых, так и вычислительных. Анализ данных с таким объемом и сложностью может быть эффективным лишь с применением современных методов биоинформатики, включающих алгоритмы идентификации генов, предсказания их функции, оценку влияния эффекта мутации на фенотип растений. Такой анализ в последнее время стал невозможным без использования интегрированных программных комплексов, решающих задачи разного уровня за счет выполнения вычислительных конвейеров. В статье описан программный комплекс CropGene, разработанный для комплексного анализа геномных и транскриптомных данных сельскохозяйственных растений. Система включает в себя несколько блоков биоинформатического анализа, таких как анализ вариаций генов, сборка геномов и транскриптомов, а также аннотация генов и белков. В комплексе реализованы новые методы анализа длинных некодирующих РНК, белковых доменов, поиска и анализа полиморфизмов и полногеномного исследования ассоциаций. В работе представлены примеры применения CropGene для анализа сельскохозяйственных организмов, таких как *Solanum tuberosum*, *Zea mays*. С помощью данного программного пакета найдены: генетические маркеры, объясняющие до 50 % изменчивости параметров окраски семян; потенциальные гены, которые могут стать перспективным материалом для получения сортов картофеля; более 100 тыс. новых длинных некодирующих РНК. Также обнаружены ортогруппы, доменная структура которых проявляет заметное сходство с доменной архитектурой характерных секретируемых фосфолипаз А2. Таким образом, CropGene представляет собой важный инструмент для ученых и практиков, работающих в области агробιοтехнологий и генетики растений.
Ключевые слова: биоинформатический конвейер; программный пакет; SNP; анализ полиморфизмов; идентификация генов

Для цитирования: Прозозин А.Ю., Каретников Д.И., Шмаков Н.А., Бочарникова М.Е., Афонникова С.Д., Афонников Д.А., Колчанов Н.А. CropGene: программный комплекс анализа геномных и транскриптомных данных сельскохозяйственных растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(2):320-329. doi 10.18699/vjgb-25-35

Финансирование. Работа по созданию программного комплекса CropGene выполнена при поддержке бюджетного проекта № FWNR-2022-0020.

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

CropGene: a software package for the analysis of genomic and transcriptomic data of agricultural plants

A.Yu. Pronozin ^{1,2} , D.I. Karetnikov ^{1,2}, N.A. Shmakov ^{1,2}, M.E. Bocharnikova ^{1,2}, S.D. Afonnikova ^{1,2},
D.A. Afonnikov ^{1,2}, N.A. Kolchanov ^{1,2}

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

² Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

 PronozinAU@bionet.nsc.ru

Abstract. Currently, the breeding of agricultural plants is increasingly based on the use of molecular biological data on genetic sequences, which makes it possible to significantly accelerate the breeding process, create new plant varieties through genomic editing. These data have a large volume, variety and require a large amount of resources, both labor and computing, to analyze the costs. Data analysis of such volume and complexity can be effective only when using modern bioinformatics methods, which include algorithms for identifying genes, predicting their function, and evaluating the effect of mutation on plant phenotype. Such an analysis has recently become impossible without the use of integrated software systems that solve problems of different levels by executing computational pipelines. The paper de-

scribes the CropGene software package developed for the comprehensive analysis of genomic and transcriptomic data of agricultural plants. CropGene includes several blocks of bioinformatic analysis, such as analysis of gene variations, assembly of genomes and transcriptomes, as well as annotation of genes and proteins. CropGene implements new methods for analyzing long non-coding RNAs, protein domains, searching and analyzing polymorphisms, and genome-wide association research. CropGene has a user-friendly interface and supports working with various types of data, which greatly simplifies its use for researchers who do not have deep knowledge in the field of bioinformatics. The paper provides examples of the use of CropGene for the analysis of agricultural organisms such as *Solanum tuberosum* and *Zea mays*. With CropGene, genetic markers have been identified that explain up to 50 % of the variability in seed color parameters; potential genes that may become promising material for producing potato varieties; more than 100 thousand new long non-coding RNAs. Orthogroups were also found, the domain structure of which shows a marked similarity with the domain architecture of characteristic secreted A2 phospholipases. Thus, CropGene is an important tool for scientists and practitioners working in the field of agrobiotechnology and plant genetics.

Key words: bioinformatics pipeline; software package; SNP; analyzing polymorphisms; identification of genes

For citation: Pronozin A.Yu., Karetnikov D.I., Shmakov N.A., Bocharnikova M.E., Afonnikova S.D., Afonnikov D.A., Kolchanov N.A. CropGene: a software package for the analysis of genomic and transcriptomic data of agricultural plants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(2):320-329. doi 10.18699/vjgb-25-35

Введение

В настоящее время селекция сельскохозяйственных растений все больше опирается на использование молекулярно-биологических данных о генетических последовательностях, что позволяет существенно ускорить селекционный процесс (Хлесткина, 2013) создания новых сортов растений за счет геномного редактирования. Эти данные имеют большой объем, разнообразны и требуют для анализа затрат большого количества ресурсов, как трудовых, так и вычислительных. Анализ данных такого объема и сложности может быть эффективным лишь с применением современных методов биоинформатики, которые включают алгоритмы идентификации генов, предсказания их функции, оценку влияния эффекта мутации на фенотип растений. Такой анализ в последнее время стал невозможным без использования компьютерного моделирования и алгоритмов глубокого машинного обучения. Для автоматизации обработки данных в биоинформатике разрабатываются технологии вычислительных конвейеров.

При анализе геномных и транскриптомных данных сельскохозяйственных растений можно выделить несколько важных задач. Одна из них – изучение генетического разнообразия, которое является важнейшей основой для поиска генов устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессам и создания новых высокоадаптивных и урожайных сортов сельскохозяйственных культур. Изучение генетического разнообразия осуществляется с применением различных методов генетического анализа. В частности, используются генетические маркеры (Хлесткина, 2013). Среди них важное место занимают маркеры, основанные на однонуклеотидных полиморфизмах (single-nucleotide polymorphism, SNP), это замены единичных нуклеотидов в геноме, которые в популяции растений встречаются с различными частотами (Сухарева, Кулуев, 2018). Анализ SNP широко применяют для изучения аллельного полиморфизма, анализа гаплотипа и родословных, а также для генотипирования и построения генетических карт.

Помимо анализа SNP, для исследования генетического разнообразия используется изучение вариаций числа копий (copy number variation, CNV). Это тип генетического полиморфизма, при котором определенные участки генома у разных особей демонстрируют различие в количестве

Ключевые понятия

Интронные днРНК – перекрываются с интроном гена
Антисмысловые днРНК – ориентированы против направления транскрипции гена, кодирующего белок
Межгенные днРНК – расположены между двумя локусами генов

Полногеномные ассоциации (Genome-Wide Association Studies, GWAS) – метод исследования геномов, целью которого является обнаружение статистических связей между генетическими вариациями и определенными фенотипическими признаками
Транскриптом – совокупность всех транскриптов, присутствующих в клетке на определенной стадии развития или в определенных физиологических условиях

Генная сеть – группа координированно функционирующих генов, взаимодействующих друг с другом как через свои первичные продукты (РНК и белки), так и через разнообразные метаболиты и другие вторичные продукты функционирования генных сетей

копий. Изменения включают делеции или дупликации генов или групп сцепленных генов. Такие вариации могут иметь протяженность до нескольких миллионов пар нуклеотидов.

Благодаря технологиям высокопроизводительного секвенирования нового поколения можно получить информацию об однонуклеотидных заменах в масштабе генома для популяции из сотен образцов. Идентификация SNP возможна с помощью стратегий полногеномного секвенирования (WGS) и генотипирования путем секвенирования (GBS) (Scheben et al., 2017). Метод GBS – более быстрый и экономически эффективный по сравнению с WGS. Протокол GBS позволяет секвенировать фрагменты геномной ДНК лишь вблизи сайтов рестрикции. За счет этого процесс секвенирования существенно удешевляется. При этом покрытие генома фрагментарно, а количество SNP оказывается меньше, чем при полногеномном секвени-

ровании. Тем не менее данных, полученных при помощи протокола GBS, оказывается вполне достаточно, чтобы с приемлемой точностью характеризовать генетическое разнообразие популяций сельскохозяйственных растений. Данные, полученные методом GBS, применяются также для полногеномных исследований ассоциаций (GWAS). Этот инструмент разработан для выявления генов, влияющих на сложные количественные признаки (Burghardt et al., 2017).

Помимо фундаментальных результатов о генетических механизмах формирования интересующих признаков, полногеномное исследование ассоциаций также позволяет найти генетические маркеры, которые в дальнейшем можно использовать непосредственно в селекционных программах (Tsai et al., 2010; Zatybekov et al., 2017; Larkin et al., 2019; Muqaddasi et al., 2020).

Еще один блок биоинформатических задач для сельскохозяйственных растений – это сборка последовательностей геномов, транскриптомов. Реконструкция генома представляет собой первый и основной этап при геномном анализе. Сборки геномов позволяют получить информацию о белок-кодирующих генах, мобильных генетических элементах. Транскриптом, в свою очередь, выполняет роль связующего звена между геномом организма и его фенотипическими признаками (Velculescu et al., 1997). На сегодняшний день самым популярным методом транскриптомных исследований является технология RNA-seq – массовое высокопроизводительное секвенирование транскриптома с помощью платформ для секвенирования нового поколения (Shendure, 2008).

Наиболее распространенное применение RNA-seq – идентификация дифференциальной экспрессии генов в экспериментах типа «опыт-контроль» (Drewe et al., 2013). Однако, помимо этого, технология имеет и другие важные применения: реконструкция транскриптома *de novo* (Cardoso-Silva et al., 2014), обнаружение полиморфизмов (Piskol et al., 2013) и поиск неизвестных вариантов сплайсинга. Секвенирование и реконструкция геномов немодельных организмов чаще всего сопровождается также секвенированием транскриптома, что облегчает аннотацию генома, предсказание и функциональную аннотацию белок-кодирующих генов. Однако за счет высокого геномного и морфологического разнообразия у видов, вызванного структурными вариациями, один референсный геном не способен охватить все изоформы гена одного вида. Для решения данной проблемы используется концепция пангенома и пантранскриптома.

Реконструкция геномов и транскриптомов для популяции позволяет получить и исследовать пангеномы или пантранскриптомы растений (Пронозин и др., 2021). Концепция пангенома подразумевает охват последовательностей, подверженных структурным вариациям и, возможно, отсутствующих в референсной последовательности каждого представителя вида (Vernikos et al., 2015). Во многих работах отмечается, что анализ пангеномов и пантранскриптомов повышает эффективность исследования и общее количество предсказанных генов по сравнению с использованием генома одного представителя вида (Jin et al., 2016). Это позволило повысить точность и полноту исследуемого набора генов.

Еще одно направление биоинформатического анализа – аннотация генома и транскриптома. Для генов, кодирующих белки, при аннотации их важную часть составляет идентификация белковых доменов, структурный фрагмент белка, выступающий в качестве независимой функциональной единицы. Он может образовывать уникальную структуру или быть частью мультидоменных белков, функционируя как самостоятельно, так и в сочетании с другими доменами. Для функциональной идентификации белков также важно производить поиск ортологов в уже известных геномах, белков, которые в разных организмах выполняют одинаковые функции.

Отметим также, что более 90 % всех транскриптов не транслируются в белки (Carninci et al., 2005) и являются некодирующими последовательностями. Некодирующие РНК (нкРНК) выполняют в геномах растений ряд важнейших функций, связанных с регуляцией экспрессии генов, гомеостазом физиологических параметров растений. Один из важных классов нкРНК – длинные некодирующие РНК (днРНК) (Назипова, 2021). ДнРНК представляют собой класс линейных или кольцевых молекул РНК длиной от 200 нуклеотидов, не кодирующих белок (Kim, Sung, 2012). Участие днРНК обнаружено в регуляции экспрессии генов, формировании структуры макромолекулярных комплексов, во взаимодействии с белками, в патогенезе. К настоящему времени идентифицировано более полумиллиона последовательностей днРНК для различных организмов.

Данные об уровнях экспрессии генов, полученные из транскриптомных экспериментов, широко используются для реконструкции генных сетей (Johnson, Krishnan, 2022). Генные сети, в свою очередь, позволяют моделировать динамику конкретных процессов в организме и прогнозировать его поведение в различных условиях.

В настоящей работе представлена система CropGene для комплексного анализа геномных, транскриптомных данных, особенностей молекулярной эволюции генов сельскохозяйственных растений. В систему входят следующие блоки биоинформатического анализа данных: анализ вариаций генов, сборка геномов и транскриптомов, аннотация генов и белков.

Материалы и методы

Программный комплекс CropGene включает программные пакеты, представленные на рис. 1.

В структуру программного комплекса входят блоки для решения задач:

Программный модуль анализа полногеномных ассоциаций реализует следующие этапы анализа:

- анализ данных фенотипирования. Обработка данных фенотипирования производится с использованием пакетов R, pastecs, psych (Grosjean et al., 2018),
- обработка данных генотипирования. Этот этап направлен на процессинг данных генотипирования, полученных методом генотипирования на микрочипах и методом GBS. Обработка включает в себя проверку качества сырых прочтений, картирование на референсный геном с помощью BWA-MEM (Li, 2013) и поиск полиморфизмов с использованием vcftools (Danecek et al., 2011). Варианты, определенные вышеуказанными мето-

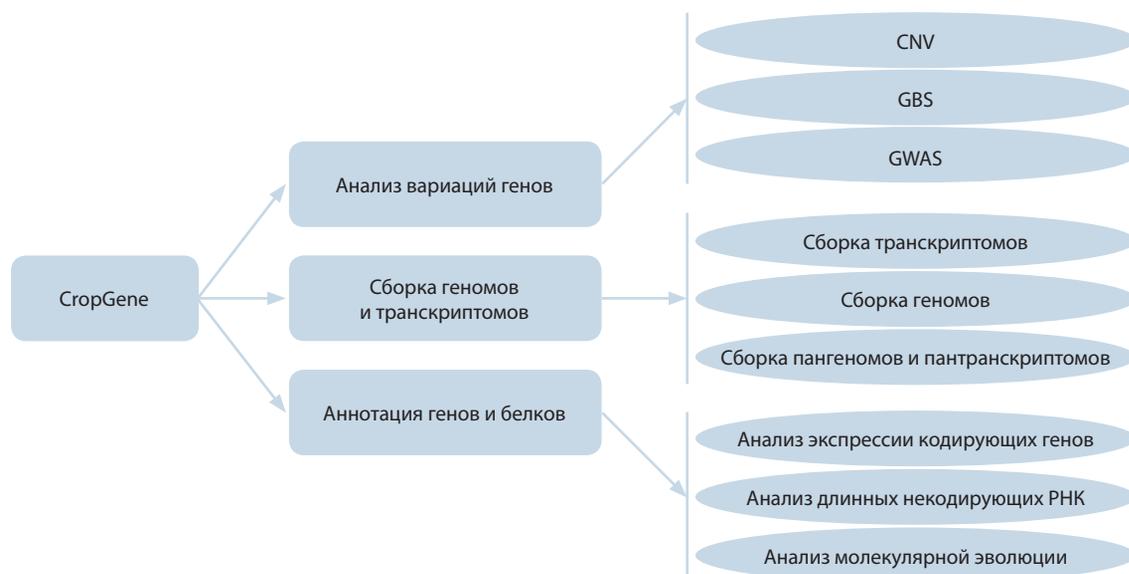


Рис. 1. Схема программного комплекса CropGene с указанием основных блоков анализа (скругленные прямоугольники в центре) и конкретных решаемых задач (овалы справа).

дами генотипирования, фильтруют по качеству, частоте минорного аллеля, гетерозиготности и количеству пропущенных данных. Этот этап осуществляется инструментом bcftools (Danecek et al., 2021). Для восстановления пропущенных данных генотипирования используют BEAGLE 5.2 (Browning et al., 2018),

- полногеномный анализ ассоциаций. На данном этапе осуществляется непосредственно полногеномный анализ ассоциаций, реализуемый на языке программирования R при помощи функций пакета “GAPIT3” (Wang, Zhang, 2021),
- приоритизация генов в обнаруженных локусах. Модуль полногеномного анализа ассоциаций направлен на выявление генов-кандидатов, связанных с интересующими признаками. Прежде всего с использованием функций пакета R “genetics” определяются границы локусов, которые включают в себя значимо ассоциированные с фенотипом варианты. Далее, основываясь на опубликованных данных по экспрессии генов у исследуемого организма и на ресурсах платформы Knetminer (Hassani-Pak et al., 2021), проводят приоритизацию генов среди обнаруженных локусов.

Программный модуль анализа CNV направлен на решение задач по оценке и анализу вариаций количества копий в геноме. Он реализует несколько этапов анализа:

- наборы сырых прочтений фильтруются по качеству и длине с помощью программы fastp (Chen et al., 2018). Далее фильтрованные и обработанные наборы прочтений картируются на референсный геном картофеля с помощью программы BWA (Li, Durbin, 2009). Дубликаты в картированных прочтениях маркируются, удаляются, после чего происходят сортировка и индексирование прочтений с помощью программы SAMtools (Li et al., 2009),
- полученные файлы формата BAM используются как входные данные в программе CNVpytor (Suvakov et al., 2021). Вариации количества копий выявлялись на всех

хромосомах референсного генома. Найденные CNV фильтруются следующим образом: длина более 1 т. п. н., p -value < 0.01, $q0$ < 50 % и pN < 50 %. Для сопоставления обнаруженных CNV с генами референсного генома используется R пакет intansv (Jia et al., 2020),

- для последующей обработки список CNV представлен в виде матрицы, в которой строки соответствуют конкретному генотипу, а столбцы – гену референсного генома. Каждый элемент матрицы представлен в трех вариантах: +1 (потенциальная дупликация), -1 (потенциальная делеция) и 0 (отсутствие значимого CNV). Далее проводится анализ главных компонент (PCA) с помощью пакета Scikit-learn v1.1.2, что позволяет оценить генетическое разнообразие (Pedregosa et al., 2011).

Биоинформатический конвейер GBS-DP направлен на анализ данных, полученных методом GBS, состоит из трех основных этапов (Pronozina et al., 2023):

- предобработка данных включает проверку качества сырых прочтений FastQC, удаление адаптеров fastp (Chen et al., 2018) и построение индекса референсного генома,
- поиск полиморфизмов состоит из картирования предобработанных прочтений на референсный геном Bwa-Mem2 (Li, Durbin, 2009), сортировки картированных прочтений Samtools (Li et al., 2009) и поиска однонуклеотидных полиморфизмов Bcftools (Li, 2011),
- анализ генетического разнообразия разделяется на два варианта обработки данных: если полученные данные превышают занимаемый объем памяти в 1 Тб и если полученные данные не превышают занимаемый объем памяти в 1 Тб. Выбор соответствующей опции осуществляется автоматически и связан с увеличенной нагрузкой на оперативную память компьютера при работе с большими данными. Для анализа главных компонент и построения филогенетического дерева на основе фильтрованных SNP применяется пакет R – SNPrelate (Zheng, 2013).

Программный модуль по реконструкции транскриптома реализует следующие этапы анализа:

- непосредственно сборка последовательностей контигов из прочтений библиотек RNA-seq. На этой стадии используются программы: Trinity (Grabherr et al., 2011), Trans-ABYSS (Robertson et al., 2010), rnaSpades (Bushmanova et al., 2019),
- объединение полученных наборов контигов и удаление избыточности программой tr2aacds.pl из конвейера EvidentialGene,
- оценка качества полученных последовательностей; программа BUSCO (Simão et al., 2015) используется для определения полноты транскриптома; программа kallisto (Bray et al., 2016) показывает, насколько полно исходные библиотеки прочтений были задействованы для реконструкции транскриптома; rnaQUAST (Bushmanova et al., 2016) оценивает различные метрики качества полученного транскриптома, в том числе наличие гомологии с последовательностью генома организма, или генома близкородственного организма в случае работы с немодельным видом.

Программный модуль реконструкции и анализа пангенома реализует следующие шаги анализа:

- реконструкция каждого генома на основе парных коротких прочтений с помощью геномного сборщика MaSuRCA (Zimin et al., 2013),
- маскирование мобильных генетических элементов с использованием RepeatMasker и дальнейшая *de novo* аннотация реконструированных маскированных геномов с трансляцией открытых рамок считывания с помощью программы AUGUSTUS (Stanke et al., 2004),
- выявление ортологических групп в наборе аминокислотных последовательностей, полученных на основе открытых рамок считывания, с помощью OrthoFinder (Emms, Kelly, 2019).

Программный модуль оценки экспрессии генов.

В этом модуле оценка экспрессии генов может проводиться на основе как референсного генома, так и транскриптома, реконструированного *de novo*:

- для подсчета экспрессии генов референсного генома выполняется выравнивание прочтений библиотек RNA-seq на последовательность генома с помощью программы Dart (Lin, Hsu, 2018). Далее применяется разметка генома с позициями известных генов для подсчета количества прочтений, картированных на каждый ген, с помощью программы featureCounts (Liao et al., 2014),
- для оценки экспрессии транскриптов из реконструированного ранее транскриптома используется программа kallisto, которая проводит так называемые псевдовыравнивания прочтений для определения, к какому транскрипту они принадлежат, на основании чего далее подсчитываются уровни экспрессии.

Биоинформатический конвейер ICAnnoLncRNA направлен на выявление и аннотацию днРНК, реализует три этапа обработки транскриптомных последовательностей (Pronozin, Afonnikov, 2023):

- 1) контроль качества. Данный этап включает две операции: построение индексного файла для геномной последовательности программой gmap (Wu, Watanabe, 2005)

и обучение модели распознавания днРНК программой LncFinder v1.1.4 (Han et al., 2019),

- 2) идентификация днРНК. Этот блок состоит из трех этапов: предсказание кандидатов в днРНК из входного набора транскриптов с помощью метода LncFinder; фильтрация полученных последовательностей-кандидатов на основе идентификации трансмембранных сегментов в OPC; выравнивание фильтрованных последовательностей-кандидатов днРНК на референсный геном,
- 3) анализ пантранскриптомов. Аннотация включает определение типов последовательностей днРНК по выравниванию на гены, кодирующие белок, выявление консервативных днРНК, анализ структурных особенностей днРНК и их экспрессии.

Программный модуль анализа эволюции белков OrthoDOM реализует четыре ключевых этапа анализа белковых последовательностей:

- 1) проводятся валидация входных данных и проверка наличия функциональных доменов, заданных пользователем у референсных белков,
- 2) проверяется наличие ключевых доменов в референсных последовательностях,
- 3) выполняется работа программы Orthofinder для исследуемых протеомов,
- 4) производится проверка выявленных ортологов по наличию в их последовательности наборов заданных доменов.

Результаты и обсуждение

Модули программного комплекса CropGene были применены при решении различных задач биоинформатического анализа геномов и транскриптомов сельскохозяйственных растений.

Программный конвейер, выявляющий CNV на основе полногеномных данных, был использован ранее в работе по анализу структуры геномов картофеля отечественных сортов (Karetnikov et al., 2023). Он позволил найти все вариации количества копий в геномах картофеля и провести сравнительный анализ количества копий генов с южноамериканским картофелем. Анализ дал возможность обнаружить, что частота встречаемости CNV в 4 из 48 известных генов, связанных с формированием клубней и реакцией на фотопериод, различается между геномами российских сортов, адаптированных к длинному световому дню в северных широтах, и местных андских сортов, приспособленных к короткому световому дню.

С помощью GBS-DP в настоящей работе было проанализировано 219 сортов ячменя. Обнаружено 61 620 SNP. На основе найденных полиморфизмов построены кластеризация – методом главных компонент (рис. 2) и дендрограмма – методом иерархической кластеризации (рис. 3).

Модуль полногеномного анализа ассоциаций был использован в работе по поиску генов-кандидатов мягкой озимой пшеницы, связанных с предуборочным прорастанием и красной окраской зерна (Afonnikova et al., 2024). Помимо обнаружения генетических маркеров, которые объясняют до 50 % изменчивости красноты зерна, в работе удалось выявить два гена-кандидата, которые связаны с формированием окраски зерна. Первый ген,

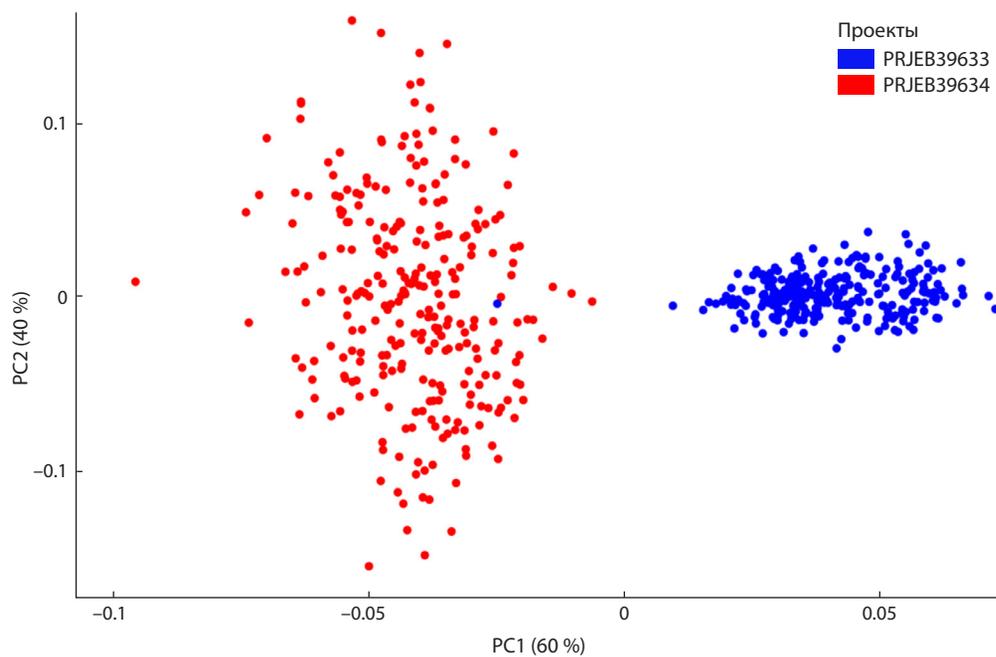


Рис. 2. Визуализация генетического разнообразия 219 библиотек ячменя методом PCA на основе выявленных однонуклеотидных полиморфизмов.

По осям X и Y направлены первая и вторая главные компоненты соответственно.

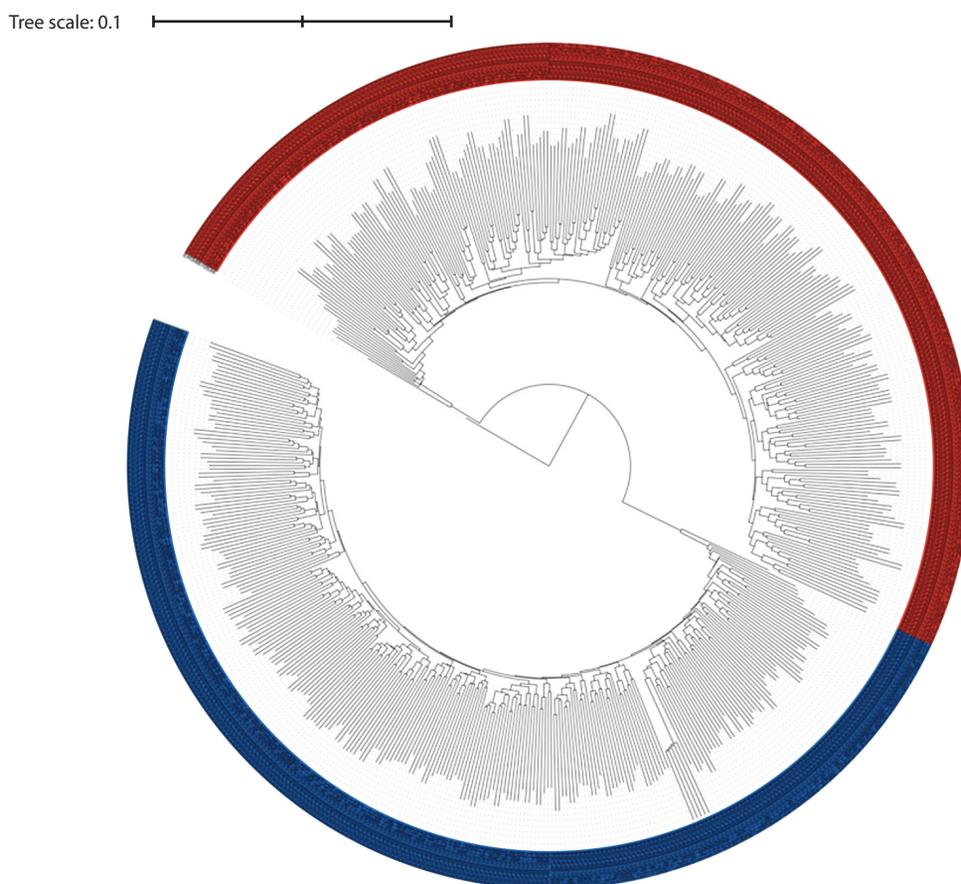


Рис. 3. Дендрограмма, характеризующая генетическое разнообразие 219 библиотек ячменя, построенная методом иерархической кластеризации по данным GBS.

Дендрограмма построена на основе найденных однонуклеотидных полиморфизмов.

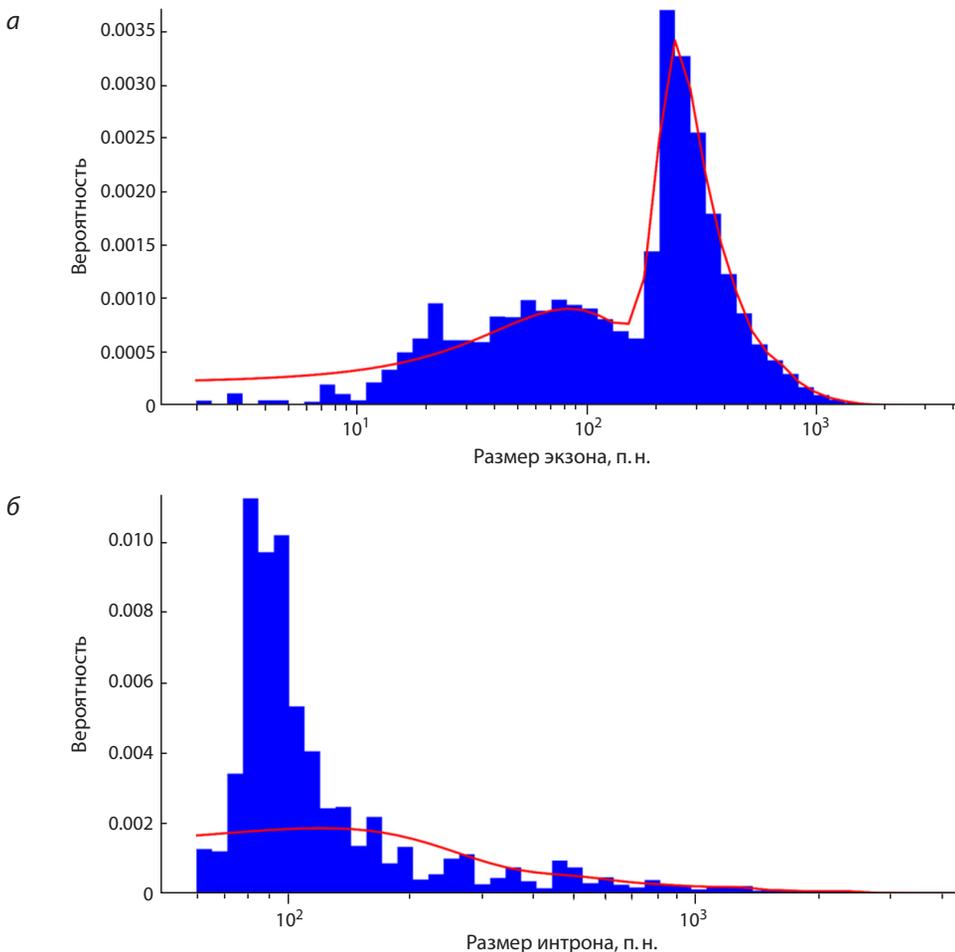


Рис. 4. Отношение количества экзонов, приходящихся на одну днРНК (а), и распределение размера интронов относительно днРНК (б).

TraesCS1D02G319700, расположен на хромосоме 1D, участвует в синтезе флавонолов и биосинтезе флавоноидов. Другой ген, TraesCS7B02G482000, локализуется на хромосоме 7B и кодирует фитоен синтазу, вовлеченную в один из начальных этапов синтеза каротиноидов. Для устойчивости мягкой пшеницы к предуборочному прорастанию главным геном-кандидатом является ген TraesCS6B02G147900, кодирующий белок морфогенеза алейронового слоя. Также были обнаружены генетические маркеры, которые объясняют до 50 % изменчивости параметров окраски «светлота», «краснота» и «синева» и до 25.3 % изменчивости оценки предуборочного прорастания – индекса прорастания на молочной/восковой стадии развития зерна.

На основе модуля транскриптомного анализа ранее была проведена сборка транскриптома четырех сортов картофеля *Solanum tuberosum* group *phureja* (Бинтье, Сиверский, Сударыня, Евразия) и дикорастущего *S. stoloniferum* L. Обнаружены гены, кодирующие белки семейства Nucleotide-binding site – Leucine rich repeats (NBS-LRR), участвующие в формировании иммунного ответа растений (Kochetov et al., 2021). Установлено, что репертуары этих генов у исследованных сортов картофеля и у дикорастущего пасленового существенно различаются, что согласуется с имеющими данными о быстрой эволюции

этих генов. Некоторые из генов семейства NBS-LRR, наблюдаемых в этой работе, ранее не были обнаружены у *Solanaceae* и у картофеля в частности. Эти гены могут стать перспективным материалом для получения сортов картофеля, более устойчивого к воздействию различных патогенов и паразитов.

С помощью конвейера ICAAnnoLncRNA проанализировано 54 транскриптома ячменя. Выявлено 143 279 новых днРНК, из них 29 987 принадлежат к классу интронных днРНК, 48 369 – межгенных, 64 923 – антисмысловых днРНК. Анализ структуры днРНК показал, что большинство из них (60 %) содержат лишь один экзон. При этом средняя длина экзона составляет 371 нуклеотид, небольшая доля экзонов имеет длину до 10 п. н., основная часть имеет длины от 10 до 1000 п. н., и их распределение имеет два характерных пика, один, широкий, с максимумом в области 100 п. н., а другой, узкий, в области 250–300 п. н. (рис. 4). Анализ тканеспецифичности показал, что большинство днРНК экспрессируется в тканях ростков (seedling) ячменя (рис. 5, а). Это наблюдается как для консервативных, так и для неконсервативных днРНК, а также характерно для мРНК (см. рис. 5, а).

Применение конвейера OrthoDOM для выявления белков семейства фосфолипаз А2 в ячмене и пшенице позволило подтвердить наличие их в геномах этих растений.

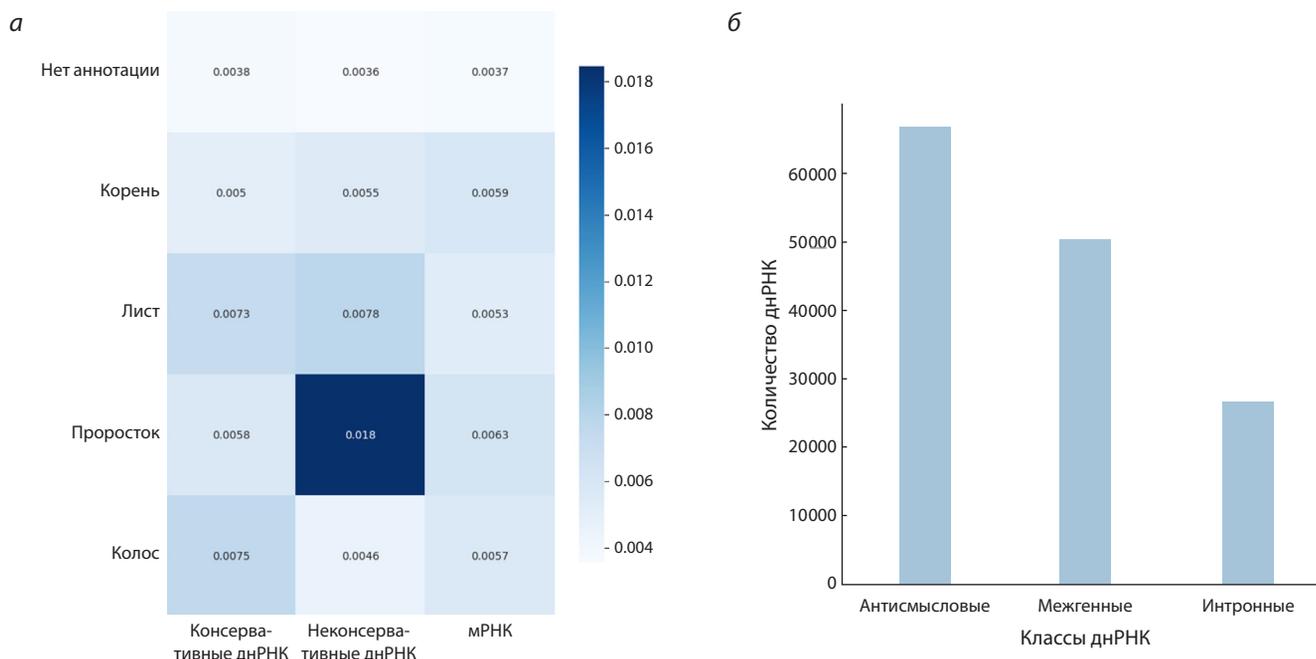


Рис. 5. Специфичность экспрессии днРНК по отношению к различным тканям ячменя, представленная в виде тепловой диаграммы.

По оси X приведены данные для двух классов днРНК (консервативные и неконсервативные) и мРНК. Соответствие цвета ячейки и величины специфичности показано шкалой справа от диаграммы. По оси X направлены классы днРНК (консервативные и неконсервативные) и мРНК, по оси Y – ткани, специфичные данному классу транскриптов (чем выше значение в ячейке, тем большему количеству транскриптов специфична данная ткань) (а), и распределение классов днРНК ячменя (б).

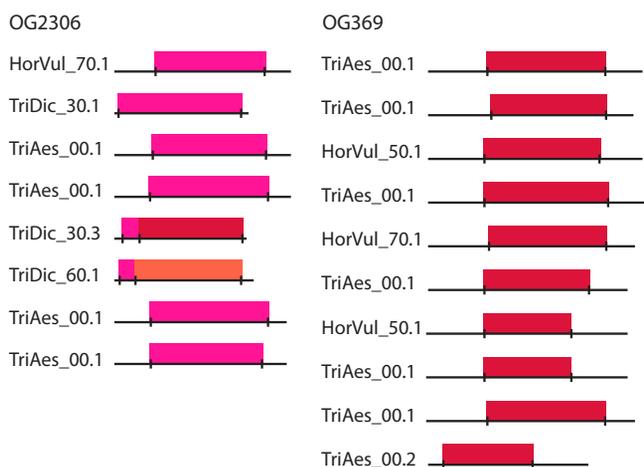


Рис. 6. Доменная структура последовательностей из ортогрупп 2306, 369, слева направо.

Красным цветом отмечен домен ФА2 бета, розовым – ФА2 альфа, оранжевым – ФА2 G12.

В ходе исследования было обнаружено две ортогруппы. Доменная структура (рис. 6) этих групп демонстрирует заметное сходство с доменной архитектурой характерных секретируемых фосфолипаз А2 (Larkin et al., 2019). Длину последовательностей фосфолипаз А2 в ортогруппах можно оценить приблизительно в 150 аминокислот, при этом преобладающая часть последовательностей – домен ФА2, что соответствует известной структуре секретируемых форм ФА2.

Заключение

Разработанный программный комплекс CropGene включает основные блоки программ, необходимых для анализа геномных и транскриптомных данных сельскохозяйственных растений. Эти блоки связаны со сборкой и анализом генома и транскриптома, включают формирование пангенома и пантранскриптома, анализ данных GBS, анализ экспрессии генов, распознавание длинных некодирующих РНК в транскриптомах растений, а также они позволяют производить анализ геномных, транскриптомных данных, особенностей молекулярной эволюции генов сельскохозяйственных растений. Использование указанных модулей позволило решить ряд важных задач по анализу геномных и транскриптомных данных для таких культур, как картофель, пшеница и ячмень.

Список литературы / References

- Назипова Н.Н. Разнообразие некодирующих РНК в геномах эукариот. *Математическая биология и биоинформатика*. 2021; 16(2):256-298. doi 10.17537/2021.16.256
[Nazipova N.N. Variety of non-coding RNAs in eukaryotic genomes. *Matematicheskaya Biologiya i Bioinformatika = Mathematical Biology Bioinformatics*. 2021;16(2):256-298. doi 10.17537/2021.16.256 (in Russian)]
- Пронозин А.Ю., Брагина М.К., Салина Е.А. Пангеномы сельскохозяйственных растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(1):57-63. doi 10.18699/VJ21.007
[Pronozin A.Yu., Bragina M.K., Salina E.A. Crop pangenomes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov J Genet Breed*. 2021;25(1):57-63. DOI 10.18699/VJ21.007]
- Сухарева А.С., Кулуев Б.Р. ДНК-маркеры для генетического анализа сортов культурных растений. *Биомика*. 2018;10(1):69-84. doi 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-15

- [Sukhareva A.S., Kuluev B.R. DNA markers for genetic analysis of crops. *Biomika = Biomics*. 2018;10(1):69-84. doi 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-15 (in Russian)]
- Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(4/2):1044-1054
[Khlestkina E.K. Molecular markers in genetic studies and breeding. *Russ J Genet Appl Res*. 2014;4:236-244. doi 10.1134/S2079059714030022]
- Afonnikova S.D., Kiseleva A.A., Fedyaeva A.V., Komyshev E.G., Koval V.S., Afonnikov D.A., Salina E.A. Identification of novel loci precisely modulating pre-harvest sprouting resistance and red color components of the seed coat in *T. aestivum* L. *Plants*. 2024;13(10):1309. doi 10.3390/plants13101309
- Bray N.L., Pimentel H., Melsted P., Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol*. 2016;34(5):525-527. doi 10.1038/nbt.3519
- Browning B.L., Zhou Y., Browning S.R. A one-penny imputed genome from next-generation reference panels. *Am J Hum Genet*. 2018;103(3):338-348. doi 10.1016/j.ajhg.2018.07.015
- Burghardt L.T., Young N.D., Tiffin P. A guide to genome-wide association mapping in plants. *Curr Protoc Plant Biol*. 2017;2(1):22-38. doi 10.1002/cppb.20041
- Bushmanova E., Antipov D., Lapidus A., Suvorov V., Prjibelski A.D. rnaQUAST: a quality assessment tool for *de novo* transcriptome assemblies. *Bioinformatics*. 2016;32(14):2210-2212. doi 10.1093/bioinformatics/btw218
- Bushmanova E., Antipov D., Lapidus A., Prjibelski A.D. rnaSPAdes: a *de novo* transcriptome assembler and its application to RNA-Seq data. *GigaScience*. 2019;8(9):giz100. doi 10.1093/gigascience/giz100
- Cardoso-Silva C.B., Costa E.A., Mancini M.C., Balsalobre T.W.A., Canesin L.E.C., Pinto L.R., Carneiro M.S., Garcia A.A.F., de Souza A.P., Vicentini R. *De novo* assembly and transcriptome analysis of contrasting sugarcane varieties. *PLoS One*. 2014;9(2):e88462. doi 10.1371/journal.pone.0088462
- Carninci P., Kasukawa T., Katayama S., Gough J., Frith M.C., Maeda N., Oyama R., ... Watahiki A., Okamura-Oho Y., Suzuki H., Kawai J., Hayashizaki Y. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*. 2005;309(5740):1559-1563. doi 10.1126/science.1112014
- Chen S., Zhou Y., Chen Y., Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*. 2018;34(17):i884-i890. doi 10.1093/bioinformatics/bty560
- Danecek P., Auton A., Abecasis G., Albers C.A., Banks E., DePristo M.A., Handsaker R.E., Lunter G., Marth G.T., Sherry S.T., McVean G., Durbin R.; 1000 Genomes Project Analysis Group. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*. 2011;27(15):2156-2158. doi 10.1093/bioinformatics/btr330
- Danecek P., Bonfield J.K., Liddle J., Marshall J., Ohan V., Pollard M.O., Whitwham A., Keane T., McCarthy S.A., Davies R.M., Li H. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience*. 2021;10(2):giab008. doi 10.1093/gigascience/giab008
- Drewe P., Stegle O., Hartmann L., Kahles A., Bohnert R., Wachter A., Borgwardt K., Rätsch G. Accurate detection of differential RNA processing. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(10):5189-5198. doi 10.1093/nar/gkt211
- Emms D.M., Kelly S. OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics. *Genome Biol*. 2019;20(1):238. doi 10.1186/s13059-019-1832-y
- Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M., Levin J.Z., Thompson D.A., Amit I., Adiconis X., ... Birren B.W., Nusbaum C., Lindblad-Toh K., Friedman N., Regev A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol*. 2011;29(7):644-652. doi 10.1038/nbt.1883
- Grosjean P., Ibanez F., Etienne M., Grosjean M.P. Package 'Pastecs'. 2018. Available online: <http://masterdlistfiles.gentoo.org/pub/cran/web/packages/pastecs/pastecs.pdf>
- Han S., Liang Y., Ma Q., Xu Y., Zhang Y., Du W., Wang C., Li Y. LncFinder: an integrated platform for long non-coding RNA identification utilizing sequence intrinsic composition, structural information and physicochemical property. *Brief Bioinform*. 2019;20(6):2009-2027. doi 10.1093/bib/bby065
- Hassani-Pak K., Singh A., Brandizi M., Hearnshaw J., Parsons J.D., Amberkar S., Phillips A.L., Doonan J.H., Rawlings C. KnetMiner: a comprehensive approach for supporting evidence-based gene discovery and complex trait analysis across species. *Plant Biotechnol J*. 2021;19(8):1670-1678. doi 10.1111/pbi.13583
- Jia L., Liu N., Huang F., Zhou Z., He X., Li H., Wang Z., Yao W. intansv: an R package for integrative analysis of structural variations. *PeerJ*. 2020;8:e8867. doi 10.7717/peerj.8867
- Jin M., Liu H., He C., Fu J., Xiao Y., Wang Y., Xie W., Wang G., Yan J. Maize pan-transcriptome provides novel insights into genome complexity and quantitative trait variation. *Sci Rep*. 2016;6(1):18936. doi 10.1038/srep18936
- Johnson K.A., Krishnan A. Robust normalization and transformation techniques for constructing gene coexpression networks from RNA-seq data. *Genome Biol*. 2022;23(1):1. doi 10.1186/s13059-021-02568-9
- Karetnikov D.I., Vasiliev G.V., Toshchakov S.V., Shmakov N.A., Genayev M.A., Nesterov M.A., Ibragimova S.M., Rybakov D.A., Gavrilenko T.A., Salina E.A., Patrushev M.V., Kochetov A.V., Afonnikov D.A. Analysis of genome structure and its variations in potato cultivars grown in Russia. *Int J Mol Sci*. 2023;24(6):5713. doi 10.3390/ijms24065713
- Kim E.-D., Sung S. Long noncoding RNA: unveiling hidden layer of gene regulatory networks. *Trends Plant Sci*. 2012;17(1):16-21. doi 10.1016/j.tplants.2011.10.008
- Kochetov A.V., Afonnikov D.A., Shmakov N., Vasiliev G.V., Antonova O.Y., Shatskaya N.V., Glagoleva A.Y., Ibragimova S.M., Khiutti A., Afanasenko O.S., Gavrilenko T.A. NLR genes related transcript sets in potato cultivars bearing genetic material of wild Mexican *Solanum* species. *Agronomy*. 2021;11(12):2426. doi 10.3390/agronomy11122426
- Larkin D.L., Lozada D.N., Mason R.E. Genomic selection – considerations for successful implementation in wheat breeding programs. *Agronomy*. 2019;9(9):479. doi 10.3390/agronomy9090479
- Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*. 2011;27(21):2987-2993. doi 10.1093/bioinformatics/btr509
- Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *ArXiv*. 2013;1303.3997
- Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754-1760. doi 10.1093/bioinformatics/btp324
- Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R.; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078-2079. doi 10.1093/bioinformatics/btp352
- Liao Y., Smyth G.K., Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 2014;30(7):923-930. doi 10.1093/bioinformatics/btt656
- Lin H.-N., Hsu W.-L. DART: a fast and accurate RNA-seq mapper with a partitioning strategy. *Bioinformatics*. 2018;34(2):190-197. doi 10.1093/bioinformatics/btx558
- Muqaddasi Q.H., Brassac J., Ebmeyer E., Kollers S., Korzun V., Argillier O., Stiewe G., Plieske J., Ganai M.W., Röder M.S. Prospects of GWAS and predictive breeding for European winter wheat's grain protein content, grain starch content, and grain hardness. *Sci Rep*. 2020;10(1):12541. doi 10.1038/s41598-020-69381-5
- 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;12:2825-2830
- Piskol R., Ramaswami G., Li J.B. Reliable identification of genomic variants from RNA-seq data. *Am J Hum Genet.* 2013;93(4):641-651. doi 10.1016/j.ajhg.2013.08.008
- Pronozin A.Yu., Afonnikov D.A. ICAnnoLncRNA: A Snakemake pipeline for a long non-coding-RNA search and annotation in transcriptomic sequences. *Genes.* 2023;14(7):1331. doi 10.3390/genes14071331
- Pronozin A.Yu., Salina E.A., Afonnikov D.A. GBS-DP: a bioinformatics pipeline for processing data coming from genotyping by sequencing. *Vavilov J Genet Breed.* 2023;27(7):737-745. doi 10.18699/VJGB-23-86
- Robertson G., Schein J., Chiu R., Corbett R., Field M., Jackman S.D., Mungall K., ... Hirst M., Marra M.A., Jones S.J., Hoodless P.A., Birrol I. *De novo* assembly and analysis of RNA-seq data. *Nat Methods.* 2010;7(11):909-912. doi 10.1038/nmeth.1517
- Scheben A., Batley J., Edwards D. Genotyping-by-sequencing approaches to characterize crop genomes: choosing the right tool for the right application. *Plant Biotechnol J.* 2017;15(2):149-161. doi 10.1111/pbi.12645
- Shendure J. The beginning of the end for microarrays? *Nat Methods.* 2008;5(7):585-587. doi 10.1038/nmeth0708-585
- 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
- Stanke M., Steinkamp R., Waack S., Morgenstern B. AUGUSTUS: a web server for gene finding in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(Suppl. 2):W309-W312. doi 10.1093/nar/gkh379
- Suvakov M., Panda A., Diesh C., Holmes I., Abyzov A. CNVpytor: a tool for copy number variation detection and analysis from read depth and allele imbalance in whole-genome sequencing. *GigaScience.* 2021;10(11):giab074. doi 10.1093/gigascience/giab074
- Tsai M.-C., Manor O., Wan Y., Mosammaparast N., Wang J.K., Lan F., Shi Y., Segal E., Chang H.Y. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science.* 2010;329(5992):689-693. doi 10.1126/science.1192002
- Velculescu V.E., Zhang L., Zhou W., Vogelstein J., Basrai M.A., Bassett D.E., Hieter P., Vogelstein B., Kinzler K.W. Characterization of the yeast transcriptome. *Cell.* 1997;88(2):243-251. doi 10.1016/S0092-8674(00)81845-0
- Vernikos G., Medini D., Riley D.R., Tettelin H. Ten years of pan-genome analyses. *Curr Opin Microbiol.* 2015;23:148-154. doi 10.1016/j.mib.2014.11.016
- Wang J., Zhang Z. GAPIT version 3: boosting power and accuracy for genomic association and prediction. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2021;19(4):629-640. doi 10.1016/j.gpb.2021.08.005
- Wu T.D., Watanabe C.K. GMAP: a genomic mapping and alignment program for mRNA and EST sequences. *Bioinformatics.* 2005;21(9):1859-1875. doi 10.1093/bioinformatics/bti310
- Zatybekov A., Abugalieva S., Didorenko S., Gerasimova Y., Sidorik I., Anuarbek S., Turuspekov Y. GWAS of agronomic traits in soybean collection included in breeding pool in Kazakhstan. *BMC Plant Biol.* 2017;17(S1):179. doi 10.1186/s12870-017-1125-0
- Zheng X. A tutorial for the R Package SNPRelate. Washington, USA: University of Washington, 2013
- Zimin A.V., Marçais G., Puiu D., Roberts M., Salzberg S.L., Yorke J.A. The MaSuRCA genome assembler. *Bioinformatics.* 2013;29(21):2669-2677. doi 10.1093/bioinformatics/btt476

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 27.11.2024. После доработки 15.01.2025. Принята к публикации 15.01.2025.

Прием статей через электронную редакцию на сайте <http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour>
Предварительно нужно зарегистрироваться как автору, затем в правом верхнем углу страницы выбрать «Отправить рукопись». После завершения загрузки материалов обязательно выбрать опцию «Отправить письмо», в этом случае редакция автоматически будет уведомлена о получении новой рукописи.

«Вавиловский журнал генетики и селекции (Vavilov Journal of Genetics and Breeding)»
до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС»/
“The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists”.

Сетевое издание «Вавиловский журнал генетики и селекции (Vavilov Journal of Genetics and Breeding)» – реестровая запись СМИ Эл № ФС77-85772, зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 14 августа 2023 г.

Издание включено ВАК Минобрнауки России в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, Russian Science Citation Index, Российский индекс научного цитирования, ВИНТИ, Web of Science CC, Scopus, PubMed Central, DOAJ, ROAD, Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar.

Открытый доступ к полным текстам:
русскоязычная версия – на сайте <https://vavilovj-icg.ru/>
и платформе Научной электронной библиотеки, elibrary.ru/title_about.asp?id=32440
англоязычная версия – на сайте vavilov.elpub.ru/index.php/jour
и платформе PubMed Central, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/3805/>

При перепечатке материалов ссылка обязательна.

✉ email: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Издатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Адрес редакции: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Секретарь по организационным вопросам С.В. Зубова. Тел.: (383)3634977.

Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Тел.: (383)3634963*5218.

Начальник отдела: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: В.Д. Ахметова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич.

Компьютерная графика и верстка: Т.Б. Коняхина, О.Н. Савватеева.

Дата публикации 31.03.2025. Формат 60 × 84 1/8. Уч.-изд. л. 21.5.

